

UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR
FERMENTAÇÃO DE *Streptococcus zooepidemicus* EM
SUBSTRATO DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.)**

André Casimiro de Macedo

Autor

Maria Helena Andrade Santana, D Sc.

Orientadora

Luciana Rocha Barros Gonçalves, D Sc.

Co-Orientadora

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas, 2006

UNIDADE BC
Nº CHAMADA: _____
T/UNICAMP M151 e
V. _____ EX. _____
TOMBO BCCL 74004
PROC 16.145-09
C _____ D X
PREÇO 11,00
DATA 04/09/05
BIB-ID _____



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

M151e Macedo, André Casimiro de
Estudo da produção de ácido hialurônico por fermentação
de *Streptococcus zooepidemicus* em substrato de caju
(*Anacardium pccidentale* L.) / André Casimiro de Macedo.-
-Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadores: Maria Helena Andrada Santana, Luciana
Rocha Barros Gonçalves

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Polissacarídeos. 2. Fermentação. 3. Caju. I. Santana,
Maria Helena Andrade. II. Gonçalves, Luciana Rocha
Barros. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Study of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*
fermentation in cashew (*Anacardium pccidentale* L.) substrate

Palavras-chave em Inglês: Hyaluronic acid, Fermentation, Cashew

Área de concentração: Desenvolvimento de processos Biotecnológicos

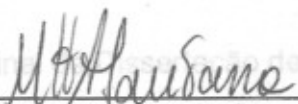
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Maria da Graça Stupiello Andrietta, Flavio Luis Schmidt

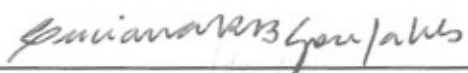
Data da defesa: 17/05/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por André Casimiro de Macedo e aprovada em 17 de maio de 2007 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana



Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana (orientadora)



Profa. Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta



Prof. Dr. Flávio Luís Schmidt

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana (orientadora)

“Messieurs, c'est les microbes qui auront le dernier mot.”

Louis Pasteur
(Dole, 1822 - Villeneuve-L'Étang, 1895)

"Cem vezes por dia eu me lembro de que minha vida interior e exterior dependem do trabalho de outros homens, que estão vivos e mortos, e que eu devo me esforçar para me manifestar na mesma medida em que recebi." (Albert Einstein)

**Aos meus pais, Francisco Fachine e Ana Célia,
Alexandre, meu irmão e à memória daqueles a quem muito
devo do que hoje sou e que prematuramente partíram para
a casa do Pai Eterno, dedico estas linhas.**

Agradecimentos

"Se consegui ver mais além, é porque subi aos ombros de gigantes."

Sir Isaac Newton

[Woolsthorpe, 1643 - Londres, de 1727]

À Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana, não só pela orientação e amizade, mas sobretudo pela paciência e confiança demonstrados durante os dois anos de execução deste trabalho, na certeza de que os frutos das discussões ao longo dos experimentos renderam não só essas páginas mas muito daquilo que hoje tenho comigo em *marcas* indelévels do aprendizado. Minha sincera gratidão.

À Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela co-orientação e pela amizade, na gratidão por me ter apresentado o ácido hialurônico.

Ao Prof. Dr. César Costapinto Santana, pela valiosa contribuição durante discussões a respeito da caracterização do ácido hialurônico, na certeza de que seria impossível realizar este trabalho sem o suporte instrumental de seu Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas. A sincera gratidão pela amizade e respeito durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Flávio Luiz Schmidt (DTA/FEA) pela valiosa cooperação no desenvolvimento da metodologia de clarificação do suco de caju, na gratidão pela confiança do sistema de microfiltração do DTA/FEA.

À Profa. Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta (CPQBA/UNICAMP) pela construtiva participação no exame de qualificação e pelas sugestões passadas naquela ocasião.

Aos meus queridos amigos, Ivanildo Jr. e Amaro Jr., companheiros de tantas *batalhas*, e de tantas discussões, com quem muito aprendi nesses dois anos de mestrado e sem os quais esse trabalho não seria o mesmo. Minha dívida e minha sincera gratidão pelas valiosas contribuições e o reconhecimento pela valiosa e afetiva colaboração durante a execução dos experimentos e amadurecimento das idéias.

Ao Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, de quem “*herdei*” as colunas de *Raimbault* e todo o equipamento para FSS, quem procuro “*parafrasear*” no exercício de meu trabalho com FSS, na grata certeza de que suas observações enriqueceram muito este trabalho.

Ao Ricardo Pereira, técnico do laboratório de cromatografia líquida e gasosa do Instituto de Química da UNICAMP, e ao amigo Francisco Wendel Batista de Aquino (doutorando IQ/USP) pela valiosa contribuição no desenvolvimento das metodologias analíticas.

Ao Prof. Dr. Célio Loureiro Cavalcante Jr. e à Profa. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo em nome de quem faço meus sinceros agradecimentos aos esforços do Grupo de Pesquisas em Separação por Adsorção no desenvolvimento da metodologia de fracionamento de AH, que teve importante contribuição para o fechamento deste trabalho.

À Anayla Sousa, co-responsável pelo desenvolvimento do método de fracionamento do AH, pelos esforços empenhados na caracterização da massa molar do AH produzido durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao colega e amigo Ronaldo Gonçalves pela singular contribuição na tentativa de completar estas linhas com informações sobre o comportamento reológico do meio de fermentação.

Ao Prof. Dr. Antônio Renato Soares de Casimiro, com quem aprendi as *primeiras letras* em fermentação, que me fez olhar a biotecnologia com olhos mais afetivos e à tia Mirian, com quem aprendi, pelo convívio diário dos cinco anos da

graduação, que o grande valor de um bom engenheiro não está só na eficácia de suas ações e decisões, mas também na dignidade de seus atos. Meu afeto e minha gratidão.

Ao Prof. João Osvaldo Silva Campos (CEFET/CE), pela colaboração no início deste trabalho e pela contínua participação neste projeto.

Ao Pesquisador Fernando Antônio Pinto de Abreu (CNPAT/EMBRAPA) pela valiosa colaboração e atenção ao longo da minha caminhada com o caju neste mestrado.

Ao amigo Gilson Jr., técnico do LDPB, na dívida por todo o auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À colega Aline Pires, com quem tive o prazer de dividir as alegrias e tristezas que uma fermentação pode proporcionar, na certeza de que lhe devo parte de meu crescimento dentro dos processos fermentativos.

Ao Adriano Oliveira e à Christiane Ogradowski, pelas contribuições deixadas à produção do ácido hialurônico. Meu respeito e minha amizade.

Às minhas queridas tias Maria e Ivaniza Soares.

Aos Primos e agregados Vitor, Lígia, Davi, Ludmila, Ana Maria, Sílvia, Carlos, João Pedro, Guilherme e Mariana pelo apoio e amizade nesta primeira fase de *exílio voluntário* em Campinas.

Ao Dr. Eugênio Santana, dileto amigo/irmão, companheiro em meu voluntário exílio em Campinas e a quem devo tantas observações e considerações sobre esse trabalho.

Ao Daniel Pordeus, amigo/irmão de sempre, a minha gratidão pela afetiva recepção durante os dias que me “*enclausurei*” em seu apartamento, onde, sob às mãos do Redentor e às vistas da enseada de Botafogo, busquei tranquilidade para aprender mais sobre biotecnologia e escrever estas linhas.

Aos amigos/irmãos que, de perto, acompanharam meu voluntário exílio na paulicéia, Mattos Brito Júnior, Remo Holanda, João Paulo Pordeus e João Francisco Santana e Alex Maia na certeza de que sem eles o viver por essas plagas não seria tão leve.

Aos amigos que de longe acompanharam meus dias por essas plagas, J. Pimentel Jr., Jefferson Norões, Rafael T. Silva, Levy Rebelo de Carvalho e Kendra Rothbrust.

Aos colegas e amigos da FEQ, Igor T. L. Bresolin, Edgar Silveira, Goran Robic e João Paulo Sartor, Fernando Serenotti e Jean Pierre Lang e Ivan Carlos Franco pelos momentos de descontração nos intervalos dos cafés e nos tantos momentos informais que foram meu *substrato* nesses dois anos de trabalho.

Aos Colegas do LDPB, Amós, Lucimara, Luciana, Amanda, Giuliana, Fernanda, Beatriz, Chris, Humberto, Pablo, Thaís, Luíza, Sônia, Rafaela e Danilo, pela amizade.

Deixo aqui registrado, nessas linhas, a minha gratidão àqueles que, de alguma forma, participaram deste trabalho. Meu respeito e minha gratidão.

Sumário

Lista de Figuras	xxi
Lista de Tabelas	xxxv
Resumo	xxxvii
Abstract	xxxviii
Nomenclatura	xxxix
Capítulo 1- Introdução	1
1.1. Ácido Hialurônico: características e aplicações.....	1
1.2. Fontes e Produção do Ácido Hialurônico	3
1.3. Objetivo	5
1.4. Estrutura da Pesquisa	6
1.4.1. Etapa 1: Implementação e Adaptação de Metodologias Analíticas.....	6
1.4.2. Etapa 2: Clarificação do Suco de Caju.....	7
1.4.3. Etapa 3: Ensaio e Estudos Comparativos do efeito da Clarificação na Produção do AH por Fermentação Submersa	7
1.4.4. Etapa 4: Estudos Iniciais da Fermentação Semi-Sólida como Proposta ao aproveitamento do Bagaço úmido de Caju	7
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	8
2.1. Breve Histórico	8
2.2. Ácido Hialurônico: Estrutura e Propriedades.....	9

2.2.1. Estrutura.....	9
2.2.2. Comportamento do Ácido Hialurônico em Solução.....	10
2.3. Fontes de Ácido Hialurônico.....	14
2.4. Biossíntese de AH.....	15
2.5. Produção de AH por Processos Fermentativos.....	21
2.5.1. Microrganismos Empregados e Condições do Processo	22
2.5.2. Meio de Cultura	23
2.5.3. Processo de Clarificação do Suco de Caju por Membranas	25
2.6. Fermentação em Estado Sólido	30
2.6.1 Caracterização do cultivo	30
2.6.2. Biorreatores Usados em FSS.....	32
2.6.3. Fenômenos de Transferência de Massa no Cultivo em Estado Sólido	36
2.6.4. Transferência de Oxigênio no Cultivo	39
2.7. Separação e Purificação de AH	43
2.8. Caracterização do AH	44
2.8.1. Caracterização da Concentração e da Massa Molar do AH.....	44
2.8.2. Propriedades Reológicas	46
2.8.2.1. Viscosidade	46
2.8.2.2. Viscoelasticidade Linear	49
2.8.2.2.1. Modelos Mecânicos	50
2.9. Aplicações	56
2.9.1. Cirurgia de Catarata	58
2.9.2. Ressecção Endoscópica da Mucosa (EMR)	59
2.9.3. Efeitos de Oligossacarídeos de AH em Tumores.....	59
2.9.4. Tratamento da Osteoartrose (OA).....	59
2.9.5. Engenharia de Tecidos	61
2.8.6. Tratamento de Feridas e Queimaduras.....	61
2.9.7. Adesões Pós-Operatórias	62
2.9.8. Medicina Estética	63
Capítulo 3- Material e Métodos.....	64
3.1. Produção de Ácido Hialurônico.....	64

3.1.1.	Microrganismo	64
3.1.2.	Manutenção da Cultura.....	65
3.1.3.	Obtenção do Substrato da Fermentação Submersa.....	66
3.1.3.2.	Extração do Suco de Caju	67
3.1.3.3.	Filtração do Suco.....	67
3.1.3.4.	Clarificação do Suco de Caju.....	68
3.1.3.4.1.	Cálculo do Fluxo Permeado	68
3.1.3.4.2.	Cálculo das Resistências	69
3.1.3.5.	Meio de Propagação e Fermentação	70
3.1.4.	Ensaio de Preparo e Padronização do Inóculo da Fermentação.....	72
3.1.5.	Ensaio de Fermentação Submersa.....	73
3.1.5.1.	Ensaio em Frascos de Erlenmeyer	73
3.1.5.2.	Ensaio em Reator BIOFLO III®	76
3.1.5.3.	Ensaio de Fermentação Semi-Sólida.....	77
3.1.5.3.1.	Preparo do Substrato/Suporte	77
3.1.5.3.2.	Preparo do Inóculo.....	77
3.1.5.3.3.	Inoculação	77
3.1.5.3.4.	Empacotamento da Coluna.....	78
3.1.5.3.5.	Sistema de Colunas de Leito Fixo e Condições Operacionais.....	79
3.1.5.3.6.	Extração dos Produtos obtidos na FSS.....	80
3.2.	Recuperação do Ácido Hialurônico Produzido por Fermentação Submersa	80
3.3.	Recuperação do Ácido Hialurônico Produzido por Fermentação Semi-Sólida.....	82
3.4.	Estudo da Transferência de Oxigênio.....	83
3.4.1.	Fermentação Submersa.....	83
3.4.2.	Fermentação Semi-Sólida.....	84
3.4.2.1.	Caracterização do Processo.....	84
3.4.2.2.	Cálculo da Taxa Global de Transferência de Oxigênio.....	84

3.4.2.5. Cálculo do Perfil de Oxigênio no Interior do Poro do Sólido Intumes - cido.....	86
3.4.2.6. Cálculo do Coeficiente Global de Transferência de Oxigênio Gás - Líquido ($K_L a$) para a FSS	86
3.5. Métodos Analíticos.....	87
3.5.1. Determinação da Concentração Celular	87
3.5.2. Conteúdo de Açúcares	89
3.5.3. Concentração de Ácido Hialurônico.....	89
3.5.4. Determinação da Massa Molar do AH Produzido	90
3.5.4.1. Determinação da Distribuição de Massa Molar	91
3.5.5. Determinação do Conteúdo de Polifenóis.....	92
3.5.6. Validação dos Métodos Analíticos de Quantificação	93
3.5.6.1. Linearidade	93
3.5.6.2. Precisão.....	93
3.5.6.3. Repetitividade	94
3.5.6.4. Sensibilidade do Método (S).....	94
3.5.6.5. Limite de Detecção (LD)	95
3.5.6.6. Limite de Quantificação	96
3.6. Análise Química Qualitativa por FTIR.....	96
3.7. Determinação da Espessura Média do Filme Líquido Externo no Bagaço de Caju.....	97
3.8. Metodologia de Caracterização da Fermentação.....	97
3.8.1. Velocidade Específica de Crescimento Celular	97
3.8.2. Fatores de Rendimento $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ e $Y_{P/X}$	98
3.8.3. Produtividades em Produto (P_p) e em Células (P_x).....	99
Capítulo 4- Resultados e Discussão.....	100
4.1. Padronização do Inóculo para a Produção de Ácido Hialurônico.....	100
4.1.1. Preservação da Cultura.....	100
4.1.2. Pré-Cultivo	101

4.1.3. Padronização do Preparo do Inóculo	103
4.1.3.1. Determinação do tempo de propagação.....	103
4.2. Ensaio de Fermentação Submersa sem Aeração Forçada.....	104
4.3. Ensaios de Fermentação Submersa com Aeração Forçada	106
4.3.1. Ensaios com Suco de Caju <i>In Natura</i>	106
4.3.1.1. Caracterização da Fermentação.....	106
4.3.1.2. Transferência de Oxigênio.....	111
4.3.2. Ensaios com Suco de Caju Clarificado	112
4.3.2.1. Caracterização da Fermentação.....	112
4.3.2.2. Transferência de Oxigênio.....	116
4.4. Ensaios de Fermentação Em Estado Sólido	118
4.4.1. Caracterização da Fermentação	118
4.4.1.1. Suporte/Substrato	118
4.4.1.2. Processo.....	119
4.4.1.2.1. Umidade e Espessura do Filme Líquido Externo.....	119
4.4.1.2.2. Acompanhamento do pH no Extrato.....	122
4.4.1.2.3. Produção de Biomassa, AH e Consumo de Açúcares	123
4.4.2. Transferência de Oxigênio	124
4.4.2.1. Taxa de Transferência de Oxigênio (N) e Taxa de Consumo de Oxigênio (R_{O_2})	124
4.4.2.2. Perfis de Oxigênio no Filme Externo e no Interior do Bagaço	126
4.4.2.3. Perfil de K_La ao longo do Cultivo	129
4.4.2.4. Reprodutibilidade do Processo de Produção de AH em FSS.	131
4.5. Caracterização da Massa Molar do AH Produzido.....	132
4.6. Análise Química por Espectroscopia no Infravermelho	147
4.7. Caracterização Reológica	151
4.8. Clarificação do Suco de Caju	156
 Capítulo 5 - Conclusões.....	 160
5.1. Conclusões.....	160
5.2. Sugestões para Futuros Trabalhos	163

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas	165
Anexo.....	177
A. Adequação e Validação da Metodologia Analítica.....	177
A.1. Determinação Quantitativa de Açúcares.....	178
A.2. Determinação da Concentração Celular.....	183
A.3. Determinação da Concentração de AH.....	185
A.4. Determinação da Massa Molar do AH Produzido.....	189
A.5. Determinação do Teor de Polifenóis.....	192

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Estrutura do Ácido Hialurônico	10
Figura 2.2 – Modelos para o comportamento de AH em Solução (Hardingham, 2004)	11
Figura 2.3 – A figura mostra os hidrogênios axiais formando a face apolar (adaptado de Hascall & Laurent, 1997).	12
Figura 2.4 – Estrutura de <i>fita torcida</i> para o comportamento do AH em solução (adaptado de Hascall & Laurent, 1997).	12
Figura 2.5 – Modelos de condensação do AH em Solução (adaptado de Cowman <i>et al.</i> , 2005)	13
Figura 2.6 – Fluxo metabólico do <i>S. zooepidemicus</i> (adaptado de Chong & Nielsen, 2002)	17
Figura 2.7 – Rota de síntese de ácido hialurônico (adaptado de Chong <i>et al.</i> , 2005)	19

Figura 2.8 – Esquema simplificado para representação da síntese de AH. (adaptado de Yamada <i>et al.</i> , 2005)	21
Figura 2.9- Comparação entre a massa celular seca obtida com suco de caju puro e suplementado. (Oliveira, 2004)	24
Figura 2.10. Ilustração da filtração estática (a) e tangencial (b) (adaptado de Cheryan,1998).....	26
Figura 2.11- Ilustração dos perfis de Fluxo permeado e resistência causada pela torta na filtração estática (a) e tangencial (b) (adaptado de Cheryan,1998).....	27
Figura 2.12 – Faixas de Separação e fatores que afetam a separação	27
Figura 2.13. Reator de Bandejas do Tipo Koji (adaptado de Durand, 2003).....	33
Figura 2.14. Reator de tambor rotativo (adaptado de Durand, 2003).....	34
Figura 2.15 . Reator de misturador horizontal de pás (adaptado de Durand, 2003)	34
Figura 2.16. Sistema de Reatores do tipo leito fixo em escala laboratorial (adaptado de Durand, 2003)	35
Figura 2.17. Esquema de coluna esterilizável para escala laboratorial (adaptado de Durand, 2003)	36
Figura 2.18. Fenômenos Macroscópicos que ocorrem em biorreatores.	38
Figura 2.19. Transferência de Oxigênio em Sistemas sólidos porosos.....	40

Figura 2.20. Representação geral da teoria do Filme e do transporte de oxigênio em FES.	41
Figura 2.21. Representação geral da teoria do Filme e do Transporte de Oxigênio no sistema mostrado na figura 2.19	42
Figura 2. 22 – Representação do comportamento Newtoniano de um Fluido.....	46
Figura 2.23 – Comportamento de Fluidos não Newtonianos	47
Figura 2.24 – Representação dos elementos mecânicos. (a) Elemento Hookeano, (b) Elemento Newtoniano.	50
Figura 2.25 – Representação dos elementos mecânicos.....	52
Figura 2. 26 – Três tipos de aplicações médicas do AH (adaptado de Asari, 2004)	57
Figura 2. 27 - Injeção de AH no tratamento de OA do joelho	60
Figura 3.1 - Sistema de prensagem usado para extração do suco de Caju.....	67
Figura 3.2 - Sistema de Microfiltração Usado para Clarificar o suco de Caju.....	68
Figura 3.3 - Fluxograma ilustrativo das rotas de preparo do meio de propagação e fermentação com clarificação do suco e sem clarificação do suco.....	75
Figura 3.4 - Reator tipo BIOFLO III.....	76
Figura 3.5 - Fluxograma de operações na fermentação Submersa e Semi-sólida.....	78

Figura 3.6 - Sistema de Coluna de <i>Raimbault</i> de leito fixo.....	79
Figura 3.7 - Fluxograma ilustrativo do processo de recuperação do AH produzido por fermentação submersa.....	81
Figura 3.8 - Fluxograma das etapas de recuperação de AH e Células adotadas para a FSS.....	82
Figura 3.9 - Perfil de oxigênio dissolvido durante o experimento para determinação do K_La no método dinâmico.....	83
Figura 3.10 - Fluxograma ilustrativo da metodologia usada para determinação do conteúdo em biomassa bacteriana.....	88
Figura 4.1 - Detalhe das placas contendo as culturas pré-cultivadas em BHI e em TSA usadas no ensaio de determinação da forma de pré-cultivo da cepa. (a) TSA e (b) BHI.....	102
Figura 4.2 - Gráficos para crescimento celular e produção de AH ao final da fermentação para os tratamentos 1, 2 e 3.....	103
Figura 4.3 -Gráfico para a evolução da biomassa bacteriana e crescimento celular obtido para a cultura de <i>Streptococcus</i> na etapa de propagação.....	104
Figura 4.4 - Perfis médios de concentração de substrato, produto e biomassa ao longo da fermentação.....	105

Figura 4.5 - Curva de crescimento da biomassa bacteriana para a fermentação em frascos de Erlenmeyer (10% Inóculo v/v, $X_0=0,09$).....	105
Figura 4.6 - Perfil médio do consumo de açúcares e evolução da biomassa bacteriana e AH para a fermentação em reator de suco de caju in natura (10% Inóculo v/v, $X_0=0,038\text{g/L}$).....	107
Figura 4.7 - Perfil de Crescimento celular e concentração de oxigênio dissolvido na fermentação em reator de suco de caju in natura (10% Inóculo v/v, $X_0=0,038\text{g/L}$).....	108
Figura 4.8 - Comparação entre parâmetros cinéticos para sistemas com e sem aeração forçada na produção de AH com suco de caju in natura.....	110
Figura 4.9 - Perfil de pH do meio de fermentação no ensaio em biorreator com aeração forçada na produção de AH com suco de caju in natura.....	110
Figura 4.10 - Perfil de oxigênio dissolvido no método dinâmico de cálculo do K_La para o meio de suco in natura.....	111
Figura 4.11 - Perfil médio do consumo de açúcares e evolução da biomassa bacteriana e AH para a fermentação em reator de suco clarificado de caju (10% Inóculo v/v, $X_0=0,05\text{g/L}$).....	113

Figura 4.12 - Perfil de Crescimento celular e concentração de oxigênio dissolvido na fermentação em reator de suco de caju clarificado (10% Inóculo v/v, $X_o=0,05\text{g/L}$).....	113
Figura 4.13 - Perfis de Crescimento celular e produção de AH para ensaios em meio de suco in natura com e sem suprimento de oxigênio e para meio de suco clarificado.....	114
Figura 4.14 - Comparação entre parâmetros cinéticos para sistemas com aeração forçada na produção de AH com suco de caju in natura e clarificado.....	115
Figura 4.15 - Perfil de pH do meio de fermentação no ensaio em biorreator com aeração forçada na produção de AH com suco de clarificado.....	116
Figura 4.16 - Perfil de oxigênio dissolvido no método dinâmico de cálculo do K_{La} para o meio de suco clarificado.....	117
Figura 4.17 - Comparação entre os valores obtidos para o K_{La} e perfis de oxigênio dissolvido em processos com meio de suco de caju in natura, clarificado e meio sintético.....	118
Figura 4.18 - Fibra do bagaço de caju (partícula).....	119
Figura 4.19 - Perfil da umidade ao longo do cultivo semi-sólido.....	119
Figura 4.20 - Filme líquido externo formado na partícula (mostrado pela seta) durante o cultivo (A) 4 h, (B) 8 h, (C) 12 h e (D) 24 h.....	120

Figura 4.21 - Aumento da espessura do filme líquido e da umidade ao longo do tempo.....	121
Figura 4.22 - Correlação entre Aumento da espessura do filme líquido e a umidade.....	121
Figura 4.23 - Perfil de pH no extrato bruto ao longo do cultivo semi-sólido.....	122
Figura 4.24 - Crescimento celular ao longo do cultivo semi-sólido.....	123
Figura 4.25 - Perfil do Consumo de açúcar, produção de AH e evolução de biomassa ao longo do cultivo semi-sólido.....	124
Figura 4.26 - Perfil da taxa de transferência de Oxigênio ao longo do cultivo semi-sólido.....	125
Figura 4.27 - Perfil da taxa de consumo de Oxigênio ao longo do cultivo semi-sólido.....	125
Figura 4.28 - Perfis de Oxigênio no filme líquido externo ao longo do cultivo semi-sólido.....	126
Figura 4.29 - Perfis de Oxigênio no interior do bagaço.....	128

Figura 4.30 - Perfil de K_La ao longo do cultivo semi-sólido.....	130
Figura 4.31 - Perfil de K_La e umidade do bagaço e correlação entre essas duas variáveis.....	130
Figura 4.32 - Perfis de produção de AH e Biomassa para os experimentos 1 e 2 em colunas de leito fixo.....	131
Figura 4.33 - Acompanhamento da massa molar do AH produzido por fermentação ao longo do tempo.....	133
Figura 4.34 - Sobreposição dos cromatogramas das amostras de AH produzidas em Fermentação do suco in natura solubilizadas em NaNO_3 0,1 M após uma (1 ^a —), duas (2 ^a —) e três (3 ^a —) precipitações em EtOH.....	134
Figura 4.35 - Cromatograma da amostra de AH produzida em Fermentação Submersa em meio de suco de caju in natura solubilizada em NaNO_3 0,1 M após uma precipitação. RI (IR —) e UV/Vis em 280 nm (UV —).....	134
Figura 4.36 -Cromatograma da amostra de AH produzida por fermentação submersa utilizando suco de caju in natura como meio após três precipitações em EtOH. RI (IR —) e UV/Vis em 280 nm (UV —).....	135
Figura 4.37 - Fracionamento polimérico da amostra de AH produzida fermentação submersa utilizando suco de caju in natura como meio após uma precipitação em EtOH.....	135

Figura 4.38 - Fracionamento polimérico da amostra de AH produzida em fermentação submersa após três precipitações em EtOH no intervalo de 8 a 10,4 mL de volume de eluição (tempo de retenção de 10 a 13 minutos).....136

Figura 4.39 - Distribuição da massa molar da amostra de AH produzida por fermentação de suco in natura com aeração após uma precipitação em EtOH com relação ao percentual da área de fracionamento polimérico.....136

Figura 4.40 - Distribuição da massa molar da amostra de AH por fermentação de suco in natura com aeração após três precipitações em EtOH com relação ao percentual da área de fracionamento polimérico.....137

Figura 4.41 - Sobreposição dos cromatogramas das amostras de AH produzidas em fermentação submersa com suco de caju clarificado em reator com aeração após uma (1ª —), duas (2ª —) e três (3ª —) precipitações em EtOH,. Uma ampliação do pico cromatográfico de AH é mostrado no canto superior esquerdo.....138

Figura 4.42 - Cromatograma da amostra de AH produzida em fermentação submersa com suco de caju clarificado após uma precipitação em EtOH. RI (IR—)e UV/Vis em 280 nm(UV—).....139

Figura 4.43 - Cromatograma da amostra de AH produzida em fermentação submersa com suco de caju clarificado após três precipitações em EtOH .RI (IR—)e UV/Vis em 280 nm(UV—). Uma ampliação do pico cromatográfico de AH é ilustrado no canto superior esquerdo.....139

Figura 4.44 - Fracionamento polimérico da amostra de AH produzida em fermentação submersa com suco de caju clarificado após uma precipitação em EtOH no intervalo de 8,0 a 12,0 mL de volume de eluição (correspondente ao intervalo de tempo de retenção de 10 a 15 minutos).....	140
Figura 4.45 - Fracionamento polimérico da amostra de AH produzida em Fermentação submersa com suco de caju clarificado após três precipitações em EtOH no intervalo de 7,2 a 10,4 mL de volume de eluição (correspondente ao intervalo de tempo de retenção de 9 a 13 minutos).....	140
Figura 4.46 - Distribuição da massa molar da amostra de AH produzida em fermentação submersa com suco de caju clarificado após uma precipitação em EtOH com relação ao percentual da área de fracionamento polimérico.....	141
Figura 4.47 - Distribuição da massa molar da amostra de AH produzida em fermentação submersa com suco de caju clarificado após três precipitações em EtOH com relação ao percentual da área de fracionamento polimérico.....	141
Figura 4.48 - Sobreposição dos cromatogramas das amostras de AH produzidas em FES após uma (1 ^a —), duas (2 ^a —) e três (3 ^a —) precipitações em EtOH, Uma ampliação do pico cromatográfico de AH é mostrado no canto superior esquerdo.....	142
Figura 4.49 - Cromatograma de uma amostra de etanol 10%, utilizando coluna Shodex, fluxo de 0,8 mL/min, solução de 0,1 M de NaNO ₃ como fase móvel, temperatura ambiente, pressão na coluna de 220 psi, volume de injeção de 20µL e o RI como sistema de detecção.....	143

Figura 4.50 - Cromatograma da amostra de AH produzida em FSS uma precipitação em EtOH. RI (IR—) e UV/Vis em 280 nm (UV—). 143

Figura 4.51 - Cromatograma da amostra de AH produzida em FSS após três precipitações em EtOH. RI (IR—) e UV/Vis em 280 nm (UV—). Uma ampliação do pico cromatográfico de AH é ilustrado no canto superior esquerdo. 144

Figura 4.52 - Fracionamento polimérico da amostra de AH produzida em FES solubilizada em NaNO_3 0,1 M após uma precipitação em EtOH no intervalo de 7,2 a 10,4 mL de volume de eluição (correspondente ao intervalo de tempo de retenção de 9 a 13 minutos). 144

Figura 4.53 - Fracionamento polimérico da amostra de AH produzida em FES após três precipitações em EtOH no intervalo de 7,2 a 10,4 mL de volume de eluição (correspondente ao intervalo de tempo de retenção de 9 a 13 minutos). 145

Figura 4.54 - Distribuição da massa molar da amostra de AH produzida em FES após uma precipitação em EtOH com relação ao percentual da área de fracionamento polimérico. 146

Figura 4.55 - Distribuição da massa molar da amostra de AH produzida em FES após três precipitações em EtOH com relação ao percentual da área de fracionamento polimérico. 146

Figura 4.56 - Representação do AH e os respectivos comprimentos de onda identificados para cada grupo na molécula. 148

Figura 4.57 - Espectro no infravermelho obtido para a amostra de AH produzida em fermentação submersa com suprimento de aeração utilizando como substrato meio de suco de caju in natura.....	149
Figura 4.58 - Espectro no infravermelho obtido para a amostra de AH produzida em fermentação submersa com suprimento de aeração utilizando como substrato meio de suco de caju clarificado.....	149
Figura 4.59 - Espectro no infravermelho obtido para a amostra de AH produzida em fermentação semi-sólida em reator de leito fixo.....	150
Figura 4.60 - Espectro no infravermelho característico do AH obtido por Haxaire et al. (2002).....	150
Figura 4.61 - Comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento ao longo do processo fermentativo (suco de caju in natura).....	152
Figura 4.62 - Comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento ao longo do processo fermentativo (suco de caju clarificado).....	152
Figura 4.63 - Comportamento da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento ao longo do processo fermentativo (suco de caju in natura).....	153
Figura 4.64 - Comportamento da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento ao longo do processo fermentativo (suco de caju clarificado).....	154

Figura 4.65 - Perfil do fluxo acumulado (J_a) ao longo do tempo de processamento.....	156
Figura 4.66 - Perfil do fluxo pontual (J_p) ao longo do tempo de processamento.....	156
Figura 4.67 - Ajuste linear de $\ln(J_a)$ ao longo do tempo.....	158
Figura 4.68 - Comportamento da massa permeada e do fator de concentração ao longo do tempo de processamento	159
Figura A.1 - Cromatograma característico para a mistura de açúcares.....	179
Figura A.2 - Curva da resposta analítica em função da concentração do analito na calibração do método de análise de açúcares.....	180
Figura A.3 - Curva da resposta analítica em função da concentração de sacarose, glicose e frutose nas calibrações individuais.....	181
Figura A.4 - Curva de ajuste médio e curva de valores preditos vs. Valores observados.....	182
Figura A.5 - Curva da resposta analítica em função da concentração do analito na calibração do método de análise do conteúdo em biomassa correlacionando com Densidade óptica.....	184
Figura A.6 - Curva de ajuste médio e curva de valores preditos vs. valores observados.....	185

Figura A.7 - Cromatograma obtido para a calibração do método de determinação da concentração de AH.....	186
Figura A.8 - Curva da resposta analítica em função da concentração do analito na calibração do método de análise da concentração de AH (concentração nominal e concentração real).....	187
Figura A.9 - Dispersão de valores obtidos para a calibração do método de análise da concentração de AH.....	188
Figura A.10. Curva de ajuste médio e curva de valores preditos vs. valores observados.....	188
Figura A.11. . Comportamento da massa molar de dextrana em função do tempo de retenção da amostra.....	190
Figura A.12. . Curva linearizada para a calibração do método de determinação da massa molar do AH.....	190
Figura A.13. Valores observados vs. valores preditos para a calibração do método de determinação da massa molar.....	191
Figura A.14. . Curva de calibração do método de determinação de polifenóis no suco de caju.....	192

Lista de Tabelas

Tabela 2.1- Comparação entre as massas molares do AH em diversas fontes	14
Tabela 2.2. Aplicações industriais da FES (adaptado de <i>Raimbault</i> , 1997).....	31
Tabela 2.3. - Exemplos de AH comercial Usados em oftalmologia	58
Tabela 2.4. - Exemplos de AH comercial Usados no tratamento de OA	61
Tabela 3.1 - Teor médio dos principais componentes físico-químicos do caju	66
Tabela 3.2 - Suplementação do Suco de Caju usado como substrato na fermentação (adaptada de Swann <i>et al.</i> , 1990).....	71
Tabela 3.3 - Tratamentos usados no experimento de adequação do pré-cultivo e propagação da cepa <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920. ...	72
Tabela 3.4 -Tipos de Correlação de acordo com o intervalo de R.	93
Tabela 4.1 - Tratamentos usados no experimento de adequação do pré-cultivo e propagação da cepa <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 39920. ...	102

Tabela 4.2 - Parâmetros cinéticos obtidos para a fermentação submersa em frascos de <i>Erlenmeyer</i> sem suprimento de oxigênio.....	106
Tabela 4.3 - Parâmetros cinéticos obtidos para a fermentação submersa de suco de caju <i>in natura</i> em Reator com suprimento de oxigênio	109
Tabela 4.4 - Parâmetros cinéticos obtidos para a fermentação submersa de suco clarificado de caju em Reator com suprimento de oxigênio	115
Tabela 4.5 - Parâmetros cinéticos obtidos para a fermentação semi-sólida em reator de leito fixo.....	124
Tabela 4.6 - Módulo de Thiele observado (Φ) ao longo do cultivo semi-sólido ...	129
Tabela 4.7 - Parâmetros do modelo de Ostwald- Waele para meio de suco de caju <i>in natura</i> fermentado.	155
Tabela 4.8 - Parâmetros do modelo de Ostwald- Waele para meio de suco de caju <i>clarificado</i> fermentado.	155
Tabela A.1 - Coeficientes de Correlação (R^2) para as Calibrações Obtidas.....	182

Resumo

O ácido hialurônico (AH) é um mucopolissacarídeo presente nos tecidos conjuntivos de animais. Possui aplicações nas áreas médico-farmacêutica, como veículo para encapsulação e liberação de bioativos, além de aplicações em cosméticos. Este trabalho, apresenta um estudo da produção de AH utilizando suco de caju como substrato em processos de fermentação submersa (FS) e bagaço de caju como substrato/suporte em cultivo no estado sólido (FES). Em ambos os casos o inóculo foi preparado com cepa de *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39920), cultivado em suco de caju *in natura* enriquecido com extrato de leveduras. Os ensaios em FS foram feitos utilizando suco de caju *in natura* e suco de caju clarificado através de microfiltração tangencial em sistema de membranas cerâmicas (0,2 µm), à 250 rpm e 2 vvm de ar. Ensaios de FES foram feitos em sistemas de colunas de leito fixo (colunas de *Raimbault*), com altura de leito 3 cm e vazão de ar 0,4 L/min. Os processos foram caracterizados com base nos parâmetros cinéticos, produtividades em AH e em biomassa bacteriana, transferência de oxigênio e evolução da viscosidade do meio. O AH produzido foi identificado por FTIR e caracterizado através da sua massa molar e distribuição. Os resultados mostraram que em ambos os processos a aeração é fundamental para o crescimento celular e produção de AH. Não houve diferenças expressivas nos parâmetros do processo para a fermentação submersa conduzida com suco de caju *in natura* ou clarificado. A máxima concentração de AH obtida na FES foi de 0,007 g/g de bagaço e na FS 2,61 g/L. As distribuições de massa molar mostram que o AH produzido em FES encontra-se nas faixas de 10^4 e 10^5 Da, enquanto que para a FS prioritariamente é produzido AH na faixa de 10^3 e 10^4 Da.

Abstract

Hyaluronic acid (HA) is a mucopolysaccharide component of animal connective tissues. It has been reported important applications of HA in medical, pharmaceutical and cosmetic area as well as a vehicle for encapsulation and delivery of bioactive products. This work presents a study of HA production using cashew apple juice as substrate in submerge fermentation (SF) and cashew apple bagasse as substrate/support in solid state fermentation (SSF). In both cases the inoculum was prepared from a *Streptococcus zooepidemicus* strain (ATCC 39920), cultured in the *in natura* juice enriched with yeast extract. *In natura* or clarified juices were used in SF assays at 250 rpm and 2 vvm of air. The clarification was carried out through tangential microfiltration in ceramic membrane system (0,2 μm). Fixed bed columns (*Raimbault's* columns) at 3 cm bed height and air flow rate 0.4 L/min were used in FES assays. The Processes were characterized based on the kinetic, HA and biomass productivities, oxygen transfer and medium viscosity parameters. The produced HA was identified by FTIR and characterized through its molecular weight and distribution. The experimental results showed that aeration is fundamental for cell growth and HA production in both processes. There were no significant differences in the parameters for SF using *in natura* or clarified juices. The maximum HA concentration obtained by SSF was 0.007 g/(g of bagasse) and 2.61 g/L for SF. The main distribution of molecular weight was 10^4 to 10^5 Da for SSF and 10^3 to 10^4 Da for SF.

Nomenclatura

Apresenta a nomenclatura adotada para as abreviaturas contidas no texto em ordem alfabética.

[η]		viscosidade intrínseca
A		Adenina
ACE		Acetato
AcoA		Acetil-CoA
ADP		Adenosina Difosfato
AH		Ácido Hialurônico
ALA		Alanina
ATCC		American Type Culture Collection
ATP		Adenosina Trifosfato
ATP		Adenosina Trifosfato
ATPN		Adenosida Trifosfato Incorporado A Biomassa
AWALL		Polissacarídeo Antigênico de Parede
BIOM		Biomassa
CO₂		Dióxido de carbono
CoA		Coenzima A
CTP		Citidina Trifosfato

D.O.	Densidade Ótica
Da	Daltons
DATP	Desoxiadenosina Trifosfato
DCTP	Desoxicitidina Trifosfato
DGTP	Desoxiguanosina Trifosfato
DHAP	Desoxiacetona Trifosfato
DHF	Dihidrofolato
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DTTP	Desoxitimidina Trifosfato
<i>dvx</i>	Gradiente de Velocidade
ETOH	Etanol
FOR	Formato
FRU6P	Frutose 6-fosfato
G	Guanina
G'	Módulo de Rigidez (componente elástica)
G''	Módulo de Dissipação (componente viscosa)
GLC	Glicose
GLC6P	Glicose 6-fosfato
GlcNAc	N-acetil-glicosamina
GlcUA	Ácido D-glicurônico
GLN	Glutamina
GLY	Glicina
GTP	Guanosina Trifosfato
H₂O	Água
HA	Acido Hialuronico
LAC	Lactato
LIP	Lípido
LYS	Lisina
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MQD	Meio Quimicamente Definido
M_w	Massa Molar do Polímero

<i>n</i>	Índice de Escoamento
NaAH	Hialuronato de Sódio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídio
NADPH	NAD Fosfato (reduzida)
O₂	Oxigênio
OD	Oxigênio Dissolvido
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPG	Peptidoglicano
PI	Ortofosfato
PPI	Pirofosfato
PROT	Proteína
PSE	Polissacarídeo Extracelular
PYR	Piruvato
R5P	Ribose-5-Fosfato
RNA	Ácido Ribonucleico
TEIC	Ácido Teicóico
U	Uracila
UDPG	UDP-Glicose
UDPNAG	UDP-N-Acetilglicosamina
UTP	Uridina Trifosfato
τ	Tensão de Cisalhamento

CAPÍTULO 1

Introdução

Este capítulo apresenta uma introdução sobre o ácido hialurônico e suas características, suas principais aplicações. Apresenta, também, a justificativa e a relevância das pesquisas desenvolvidas e do presente trabalho, bem como os objetivos e a estruturação do trabalho de pesquisa e da presente dissertação.

1.1. Ácido Hialurônico: características e aplicações

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear de alta massa molar pertencente à família dos glicosaminoglicanos e consiste em unidades dissacarídicas polianiónicas de *ácido D-glicurônico* (GlcUA) e *N-acetil-glicosamina* (GlcNAc) unidas alternadamente por ligações β (1 $\rightarrow$ 3) e β (1 $\rightarrow$ 4) (**Chong**, 2004).

O AH foi descoberto em 1934 por *Karl Meyer* e *John Palmer*, que descreveram o procedimento para isolamento de um novo glicosaminoglicano procedente do humor vítreo bovino. No trabalho, *Meyer* e *Palmer* apresentam esse novo composto como um polissacarídeo que continha ácido urônico e um amino-açúcar, mas não apresentava nenhum sulfoéster.

O nome, ácido hialurônico, originou-se da junção entre o termo grego *hialóide* (vítreo) e *ácido urônico*. (**Yamada et al.**, 2005).

A solução de ácido hialurônico tem consistência gelatinosa, alta viscoelasticidade e alto grau de hidratação devido às suas características estruturais. Esta substância está presente em vários tecidos conectivos de animais, tais como pele e cartilagem e possui importantes funções como flexibilidade e manutenção da estrutura dos tecidos. Alguns órgãos são especificamente ricos em ácido hialurônico, tais como o cordão umbilical, fluido sinovial e o humor vítreo. Na pele e em cartilagens, a sua função é ligar-se à água, manter a tonicidade e elasticidade dos tecidos. Nos fluidos das juntas, serve como lubrificante proporcionando um meio protetivo para as células (**Kim et al.**,1996).

O ácido hialurônico (AH) é não-imunogênico e, portanto, possui um grande potencial de aplicações médicas e cosméticas nas áreas de oftalmologia, ortopedia, implante de próteses, cicatrização de feridas, terapia de artrite, prevenção de adesão de cirurgias, oncologia e dermatologia (**Holmström et al.**,1967).

Kim e colaboradores (1996) relatam o uso, por vários anos, de soluções de AH, extraídas de crista de galo, ultrapuras, como suporte em cirurgias oftálmicas. Preparações similares também têm sido utilizadas em doenças degenerativas e inflamatórias das juntas de animais e humanos.

O AH tem importante papel na propriedade viscoelástica do fluido sinovial. Injeções locais intra-articulares de várias formas de AH vêm sendo usadas como uma alternativa à administração de drogas não esteroidais e às injeções de corticóide, já que atuam como lubrificante e amortecedor, protegendo as superfícies das cartilagens, melhorando a mobilidade e reduzindo a dor. (**Brandt et al.**, 1999 e **Altman et al.**, 1999).

Haney et al. (1998) demonstraram que barreiras compostas por derivados de ácido hialurônico ligados quimicamente reduzem a formação de adesão no período pós-operatório sem nenhum impacto adverso no fluido peritoneal e peritônio. Aplicações mais recentes,conforme nos mostra **Suzuki et al** (2001), utilizam o AH não somente como fluido lubrificante, mas também como sistema de liberação controlada de fármacos, tais como no tratamento de artropatia e

liberação de agentes quimioterápicos em implantes cirúrgicos, conforme cita **Jernberg** (1994) e reforça **Aebischer et al.** (2001).

Dentro do seu espectro de aplicações, o AH tem sido aplicado na oftalmologia, ortopedia, implante de próteses, cicatrização de feridas, terapia de artrite, prevenção de adesão cirúrgica, oncologia, dermatologia e preenchimento facial.

O número de aplicações dadas ao ácido hialurônico e o seu elevado valor agregado, que pode chegar a U\$ 150/100 mL, justificam os esforços em elaborar alternativas à sua produção.

1.2. Fontes e Produção do Ácido Hialurônico

O AH pode ser extraído do fluido sinovial, pele, tendões, do corpo vítreo dos olhos, do cordão umbilical e de crista de galo. Porém, a associação do AH de origem animal a antígenos limita as suas aplicações na área médica. A produção deste polímero por processos fermentativos vem sendo estudada e proposta como opção aos processos convencionais de extração. Em geral, esses processos envolvem microrganismos do gênero *Streptococcus* sob condições controláveis, apresentando, assim, possibilidade de obtenção de maiores rendimentos ao passo que se pode impor otimizações ao processo.

O processo de produção em via fermentativa apresenta também um aspecto importante em relação aos processos de extração, que é a obtenção de um produto livre de característica antigênica, tornando os esforços na sua purificação menos onerosos.

O meio de cultura é fundamental para o desempenho de microrganismos em processos fermentativos. *Streptococcus* dos grupos A e C apresentam requerimentos nutricionais fastidiosos com relação a nitrogênio orgânico. De modo geral, os meios incluem extrato de levedura, peptonas ou hidrolisado de caseína como fonte de nitrogênio e fatores de crescimento assim como magnésio e sais fosfato (**Armstrong et al.**, 1997).

As fontes de nitrogênio orgânico são consideradas essenciais para um bom crescimento das células, visto que existem evidências que esses componentes fornecem grande parte do carbono para biossíntese celular (**O'Regan et al.**, 1994).

Visando a substituição do meio BHI no cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* por um meio de origem vegetal, **Oliveira** (2004) utilizou substrato de caju (*Anacardium occidentale L.*) para a preparação do inóculo e produção de AH por via fermentativa. Os resultados mostraram crescimento equivalente ao meio BHI quando o suco de caju foi enriquecido com extrato de leveduras, e a produção de AH com esse novo meio também foi promissora. **Oliveira** (2004) justifica seu trabalho apoiado no elevado teor de açúcares, sais e fonte de nitrogênio orgânico presentes no suco de caju, bem como a facilidade de obtenção e seu baixo custo.

O caju é uma fruta tropical, cuja produção, no Brasil, está concentrada no Nordeste. As atividades agroindustriais apresentam grande importância social e econômica. A agroindústria do caju no Nordeste produz cerca de 217.062 toneladas de castanha e 2 milhões de toneladas de pseudofruto por ano (**Andrade et al.**, 2004). Mesmo apresentando uma grande potencialidade como matéria-prima para diversos produtos, o pseudofruto tem cerca de 90% da sua produção descartada a cada ano, isso se dá em função da sua alta perecibilidade. Outra justificativa para esse desperdício é o fato da comercialização ou aproveitamento do pedúnculo não ser o principal negócio para a agroindústria do caju e sim o processamento e comercialização da amêndoa.

Dados para o mercado interno mostram que o consumo de suco de caju oscila em torno de 40 mil toneladas, o que ainda é muito discreto em relação à produção.

Anualmente, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística apresenta valores, em hectares, para áreas destinados à colheita de caju, distribuídas pelas unidades federativas. Observamos, em 2004, que o Brasil possui 691.331 ha que se destinam à colheita de caju. Esta área está distribuída, prioritariamente, pelas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste do país, sendo a região Nordeste possuidora de 688.562 ha. Ao passo que confirmamos a concentração da área de

plântio na região Nordeste, observamos também o grande potencial para aproveitamento dessa matéria-prima com uso de processos alternativos e que agreguem valor ao produto final obtido nesses processos, visto que parte dessa produção será desperdiçada como resíduo da agroindústria.

Considerando as potencialidades do caju como matéria-prima e sua disponibilidade, propõe-se neste trabalho estudar a produção e a caracterização do AH produzido por via fermentativa com meio de cultura à base de caju, em continuidade dos trabalhos desenvolvidos por **Oliveira** (2004) e **Ogrodowski** (2006). A relevância deste trabalho se justifica com base no crescente mercado para o ácido hialurônico, no baixo custo e no discreto aproveitamento do pedúnclo (pseudofruto) do caju.

1.3. Objetivo

O objetivo deste trabalho é estudar a produção e caracterizar o AH obtido por fermentação submersa e em estado sólido utilizando linhagem de *Streptococcus zooepidemicus* e meio de cultura à base de caju (*Anacardium occidentale* L.).

As etapas e aspectos abordados na pesquisa foram:

- Implementação de metodologias analíticas para análise do conteúdo em açúcares, concentração e massa molar do AH, massa celular produzida na fermentação, observando critérios analíticos;
- Caracterização do comportamento cinético, fatores de rendimento e a evolução da massa molar do ácido hialurônico ao longo da fermentação em frascos agitados e em fermentador com aeração forçada;
- Caracterização dos aspectos tecnológicos da clarificação do suco de caju em sistemas de microfiltração em membranas cerâmicas;

- Estudo do efeito da clarificação do suco de caju na produção do AH em fermentação submersa como estudo comparativo ao da produção de AH em suco de caju *in natura* (não clarificado);
- Caracterização da produção de AH por fermentação em estado sólido utilizando o bagaço úmido do caju.

1.4. Estrutura da Pesquisa

O presente trabalho de pesquisa foi composto de 4 etapas distintas:

1.4.1. Etapa 1: Implementação e Adaptação de Metodologias Analíticas

O esforço inicial do presente trabalho foi voltado à avaliação, adaptação e proposição de metodologias analíticas seguindo os critérios analíticos de calibração e validação para cada tipo de análise.

O principal enfoque na adaptação das metodologias aqui apresentadas foi o tempo, a praticidade e a precisão.

Metodologias cromatográficas foram testadas e adaptadas para análises em substituição aos métodos químicos anteriormente usados. Com utilização de técnicas cromatográficas simples e acessíveis, foi otimizada a determinação analítica de açúcares e ácido hialurônico.

A adaptação da leitura direta da densidade óptica simplificou e otimizou o tempo gasto na análise do conteúdo em biomassa.

A proposição de uma metodologia analítica para determinação da massa molar, por cromatografia de exclusão em gel, do AH produzido na fermentação, como alternativa ao método viscosimétrico, permitiu a determinação e o acompanhamento da massa molar ao longo do tempo de fermentação com boa precisão e com redução no tempo das análises.

A implementação de métodos clássicos, tais como o método gravimétrico na determinação do conteúdo em massa seca de células e

método químico como o método do carbazol, para determinação de ácido hialurônico permitiu analisar melhor os resultados.

1.4.2. Etapa 2: Clarificação do Suco de Caju

A clarificação do suco foi conduzida em sistema de microfiltração com membranas cerâmicas. Na clarificação observou-se também os aspectos tecnológicos do emprego de processos de tratamento do substrato visando a sua inclusão no processo de produção de AH por fermentação.

1.4.3. Etapa 3: Ensaios e Estudos Comparativos do efeito da Clarificação na Produção do AH por Fermentação Submersa

Ensaios fermentativos sob condições de presença ou ausência aeração forçada foram realizados no intuito de se fazer uma comparação entre a produção de AH entre o suco de caju clarificado e *in natura*.

1.4.4. Etapa 4: Estudos Iniciais da Fermentação em Estado Sólido como Proposta ao aproveitamento do Bagaço úmido de Caju

A carência de informações e estudos em fermentação em estado sólido (FES) como alternativa ao aproveitamento do bagaço úmido do caju, fazem desse trabalho, além de pioneiro na avaliação e no levantamento de dados da FES na produção de AH, um ponto inicial para futuras pesquisas.

Ensaios de fermentação em estado sólido foram conduzidos em biorreatores do tipo Colunas de *Raimbault* com o objetivo de levantar dados iniciais que venham a contribuir, sob o aspecto tecnológico, com o estudo da produção de AH e do aproveitamento do pedúnculo de caju integralmente.

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica

Este capítulo traz uma revisão atualizada da literatura sobre o ácido hialurônico, apresentando um breve histórico da sua descoberta, sua estrutura e propriedades, fontes de extração, a sua biossíntese e a produção por via fermentativa e suas aplicações médicas.

2.1. Breve Histórico

Em 1934, *Karl Meyer* e seu assistente, *John Palmer*, trabalhando no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Oftalmologia da Universidade de Columbia, descreveram o procedimento para isolamento de um novo glicosaminoglicano procedente do humor vítreo de boi. Em seu trabalho, *Meyer* e *Palmer* apresentam esse novo composto como um polissacarídeo que continha ácido urônico e um amino-açúcar, mas não apresentava nenhum sulfoéster.

Meyer e *Palmer* propuseram o nome *Ácido Hialurônico* para aquela substância. O nome veio da junção entre o termo grego *hialóide* (vítreo) e *ácido urônico*. (**Yamada et al.**, 2005).

Nos dias atuais, o ácido hialurônico é freqüentemente referenciado por *hialuronato* (**Yamada et al.**, 2005). **Kakehi et al.** (2003) justificam essa referência pelo fato desta molécula estar presente na natureza ou em condições fisiológicas, segundo afirma **Laurent** (2002), em forma de um poliânion e não na forma de ácido.

O uso do nome *ácido hialurônico* é comum, no entanto, na área farmacêutica (**Kakehi et al., 2003**).

A descoberta do *ácido hialurônico*, em 1934, marca o nascimento de uma das mais versáteis e fascinantes macromoléculas naturais.

Na década seguinte, *Meyer* e outros colaboradores se dedicaram a isolar o AH de fluido das articulações, da pele, cordão umbilical e crista de galo.

Em 1937, *Kendall, Heidelberger e Dawson* observaram a semelhança entre um polissacarídeo da cápsula de *Streptococcus* do grupo A hemolítico e o ácido hialurônico.

O procedimento de preparo original do ácido hialurônico incluía remoção de proteínas por desnaturação ou digestão proteolítica e, então, uma precipitação dos polissacarídeos com álcool ou acetona. Uma importante melhoria foi introduzida por *John Scott* quando desenvolveu a precipitação fracionada com uso de detergente catiônico (**Laurent, 2002**).

Atualmente, muitas técnicas mais sofisticadas como eletroforese e separação cromatográfica são freqüentemente empregadas na separação em menores escalas dessa substância.

A estrutura do ácido hialurônico foi elucidada por *Karl Meyer* e seus assistentes na década de 50.

2.2. Ácido Hialurônico: Estrutura e Propriedades

2.2.1. Estrutura

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear de alta massa molar pertencente à família dos glicosaminoglicanos e consiste em unidades dissacarídicas polianiónicas de *ácido D-glicurônico* (GlcUA) e *N-acetil-glicosamina* (GlcNAc) unidas alternadamente por ligações β (1 $\rightarrow$ 3) e β (1 $\rightarrow$ 4) (**Chong, 2004**).

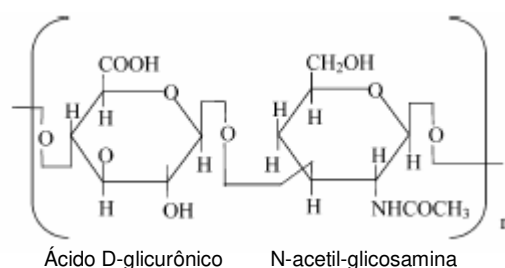


Figura 2.1 – Estrutura do Ácido Hialurônico

O AH pode conter em torno de 30.000 unidades dissacarídicas repetidas na molécula extraída de tecidos animais, o que significaria uma massa superior a 10^7 Da (**Weigel et al.**, 1997).

Estudos com espalhamento de luz mostram que o AH é um novelo randomicamente curvado com um pouco de polidispersidade e rigidez.

Em condições fisiológicas, o AH apresenta-se carregado negativamente.

2.2.2. Comportamento do Ácido Hialurônico em Solução

Soluções de AH apresentam propriedades viscoelásticas e a base biofísica de seu comportamento *não-ideal* tem sido fonte de muito estudo.

Em soluções diluídas, o AH comporta-se como um novelo aleatório e rígido. A presença de segmentos conectados agiriam opondo-se ao enrijecimento da cadeia. Em soluções concentradas, os segmentos rígidos e enrolados mostram-se interligados e formam soluções viscoelásticas. A presença de segmentos conectados pode levar à formação de uma rede e, conseqüentemente, à formação de géis. (**Hardingham**, 2004)

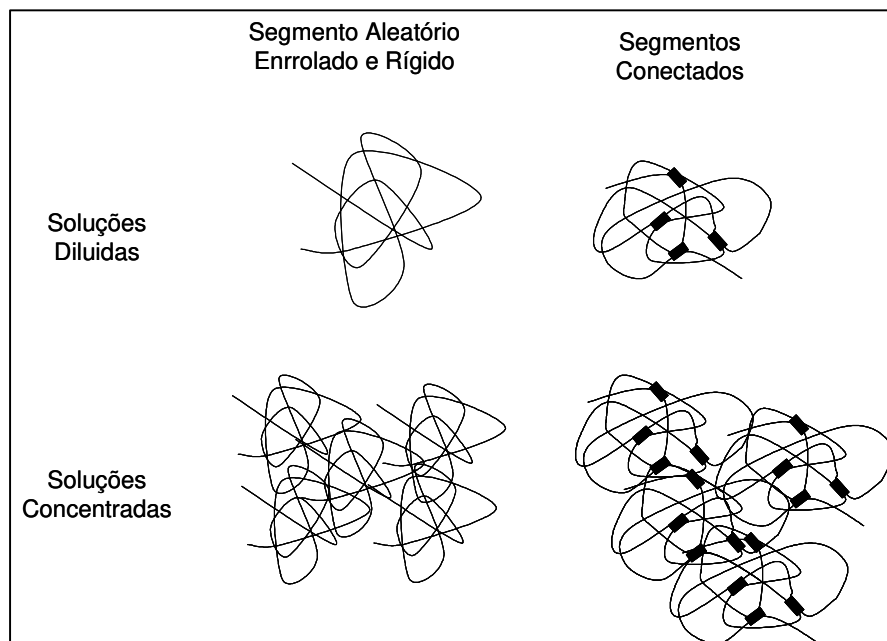


Figura 2.2 – Modelos para o comportamento de AH em Solução (Hardingham, 2004)

O seu comportamento em solução aquosa, portanto, é bem peculiar e a sua rigidez pode ser justificada, em parte, devido às ligações de hidrogênio entre os sacarídeos adjacentes, combinado com algum efeito de repulsão eletrostática mútua entre grupos carboxila (**Hardingham**, 2004). Os átomos axiais de hidrogênio (indicados na Figura 4.3) formam uma face apolar, relativamente hidrofóbica enquanto as cadeias equatoriais dão forma a uma face mais polar, mais hidrofílica, criando, desse modo, uma estrutura de torção (Figura 4.4). Conseqüentemente, uma molécula de AH apresenta uma estrutura randômica e expandida em soluções fisiológicas, ocupando um grande espaço (**Hascall & Laurent**, 1997).

Estudos das propriedades de soluções de AH prurificado fornecem uma vista de conformações moleculares relevantes ao comportamento hidrodinâmico e suas propriedades mecânicas. (**Fouissac et al.**, 1993)

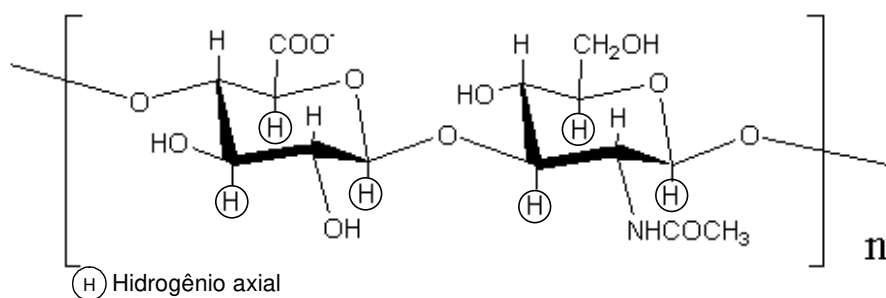


Figura 2.3 – A figura mostra os hidrogênios axiais formando a face apolar (adaptado de Hascall & Laurent, 1997).

Assim, as interações entre as moléculas da água e os grupos carboxila e N-acetila conferem ao polímero a capacidade de retenção de água e certa rigidez conformacional, limitando a sua flexibilidade.

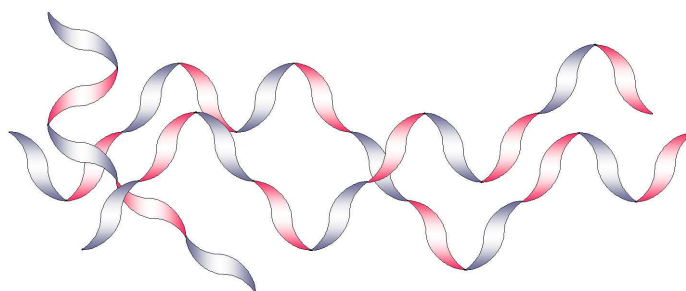


Figura 2.4 – Estrutura de *fita torcida* para o comportamento do AH em solução (adaptado de Hascall & Laurent, 1997).

A capacidade de ligação com a água está diretamente ligada à massa molar desse polímero. Assim, estudos sobre a capacidade de hidratação do AH mostram que 100 vezes a sua massa em água podem se prender à sua estrutura. (Scott, 1989; Laurent, 1970; Hoekstra, 1999)

Cowman *et al.* (2005) sugerem que as funções biológicas do AH estão vinculadas à existência de inúmeras conformações e de interações específicas. É provável que as conformações são afetadas pelo ambiente, desse modo, a ação de forças como força iônica e interações específicas do íon, constante dielétrica local, efeitos de exclusão de volume exposição a forças mecânicas, e presença substâncias que proporcionem interação (por exemplo, proteínas e aos lipídios).

Cowman *et al.* (2005), através de microscopia de força atômica, elucidaram o comportamento do AH microbiano em faixas de massa molar entre 10^5 a 10^6 Da e discriminaram inúmeras estruturas para estas duas classes de AH, baixa e alta massa molar. Como resultado, Cowman *et al.* (2005) mostraram prováveis formas para condensação do AH. (figura 2.5)

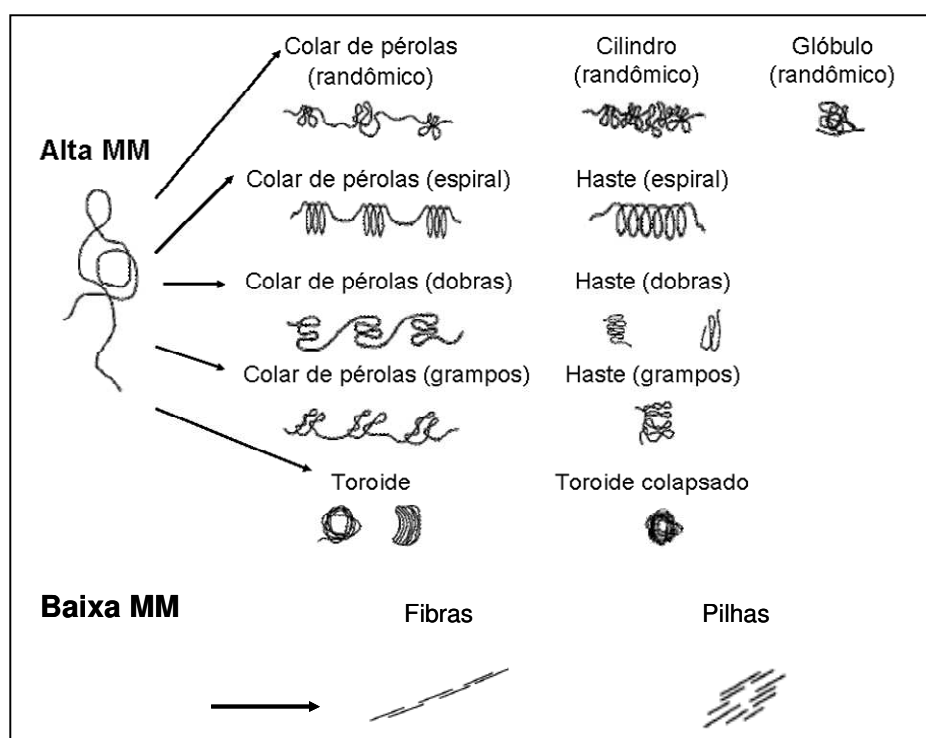


Figura 2.5 – Modelos de condensação do AH em Solução (adaptado de Cowman *et al.*, 2005)

2.3. Fontes de Ácido Hialurônico

O AH está presente nos tecidos conjuntivos de mamíferos, preenchendo assim espaços intercelulares. Suas funções estão ligadas à flexibilidade e manutenção da estrutura dos tecidos.

Este mucopolissacarídeo está presente no fluido sinovial, pele, tendões, corpo vítreo ocular e cordão umbilical.

Na pele, bem como nas cartilagens, a função do AH é ligar-se à água, manter a tonicidade e a elasticidade desses tecidos. No fluido sinovial das juntas, sua função básica é o de manter um suporte protetivo e lubrificante para as células (**Kim et al.**,1996)

Pela extração do AH presente nesses tecidos é que, tradicionalmente, vêm se produzindo essa substância disponível no mercado.

Em alguns casos, o AH é o maior constituinte desses tecidos, como por exemplo humor vítreo do olho humano (0.1-0.4 mg/g massa úmida) ou em fluido sinovial nas juntas (3-4 mg/ml). (**Hascall & Laurent**, 1997)

As principais fontes, no entanto, de AH comercial é crista de galo e cordão umbilical.

Com relação à massa molar do AH, observamos que há uma variância de acordo com a fonte da qual o AH fora extraído (Tabela 2.1).

Tabela 2.1- Comparação entre as massas molares do AH em diversas fontes

Fonte	Massa Molar
Fluido sinovial	1- 8 milhões de Da
Cordão umbilical	3,6-4,5 milhões de Da
Crista de galo	12-14 milhões de Da

Há, no entanto, restrições ao AH extraído e purificado desses tecidos animais, segundo **Chong** (1998) que são:

- Redução da massa molar após os processos de extração e purificação;
- Dificuldades de isolamento de moléculas com alto peso molar devido a formação de complexos com proteoglicanos;
- Controle da massa molar do polímero;
- Questões éticas e argumentos morais à utilização bioquímica dessa substância devido ao risco de infecções virais.

A produção do ácido hialurônico por via fermentativa é uma alternativa aos processos clássicos, que contorna as restrições acima citadas.

2.4 Biossíntese de AH

O ácido hialurônico é sintetizado no interior da membrana plasmática como um polímero linear. A enzima responsável pela síntese desse glicosaminoglicano é a hialuronato sintase (HAS) (**Yamada & Kawasaki**, 2005).

HAS era uma enzima de difícil solubilização e purificação, assim, foi preciso um intervalo de 65 anos desde a identificação do AH e a primeira purificação de uma sintase ativa, que aconteceu em 1999 (**Weigel**, 2004).

Observa-se que a síntese dessa molécula ocorre na extremidade redutora por transferência alternada dos substratos UDP-GlcNAc e UDP-GlcAc para o

UDP-hialuronato. Esse mecanismo difere das sínteses de glicopeptídeos e proteoglicanos, os quais são alongados na extremidade não redutora (**Prehm**, 1984).

A respeito do mecanismo de formação de AH e da elongação de sua cadeia, **Weigel** e colaboradores (1997) estudaram o crescimento dessas cadeias de AH em sistemas enzimáticos livres de células obtidos de *Streptococcus piogenese* do grupo A.

Chong e **Blank** (1998) apresentaram o esquema da rota metabólica para a síntese de AH por *Streptococcus* (Figura 2.6).

O ácido D-glicurônico e a N-acetil glicosamina são derivados da glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato. Assim, segundo a rota metabólica para o *Streptococcus* apresentada, a primeira reação é a que leva à glicose-6-fosfato. α -fosfoglicomutase converte a glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato em uma reação reversível. UDP-glicose fosforilase catalisa a reação de UTP e glicose -1-fosfato para a produção de UDP-glicose. UDP-ácido glicurônico é obtido por oxidação específica do grupo álcool do UDP-glicose através da ação da UDP-glicose desidrogenase. A rota originada da frutose-6-fosfato é envolvida na produção de amino-açúcares. Grupos amino transferidos da glutamina para a frutose-6-fosfato por uma amidotransferase leva à glicosamina-6-fosfato. Grupos acetila transferidos por uma acetiltransferase formam N-acetil glicosamina-6-fosfato. Rearranjo de grupos fosfato por mutase geram a N-acetil glicosamina-1-fosfato a partir de N-acetil glicosamina-6-fosfato. Por fim, a pirofosforilase adiciona UDP para obtenção de UDP-N-acetilglicosamina. A participação de UTP nestas reações geram doadores glicosil ativados que podem ser polimerizados em AH por AH sintase (**Chong et al.**,2005).

Chong & Nilsen (2002) propuseram o modelo de fluxo metabólico para o metabolismo de carbono em *Streptococcus zooepidemicus*. Esses autores estimaram os fluxos intracelulares e validaram a consistência de suas medições na determinação dos metabólitos. A estrutura base do modelo proposto foi composta das seguintes rotas: *Embden-Meyerhof-Parnas* (v_1 - v_5), pentose fosfato

(v_{12} e v_{13}) e as reações responsáveis pela fermentação observada em *S. zooepidemicus*. Os produtos metabólicos (lactato, formato, acetato e etanol) são produzidos pelo lactato desidrogenase (LDH, v_6), piruvato formato liase (PFL, v_7), acetato quinase (AK, v_{10}) e álcool desidrogenase (ADH, v_9). Sob condições aeróbicas, a enzima piruvato desidrogenase (PFH, v_8) supostamente domina a conversão do piruvato a acetil-CoA devido à extrema sensibilidade do PFH ao oxigênio (Figura 2.6).

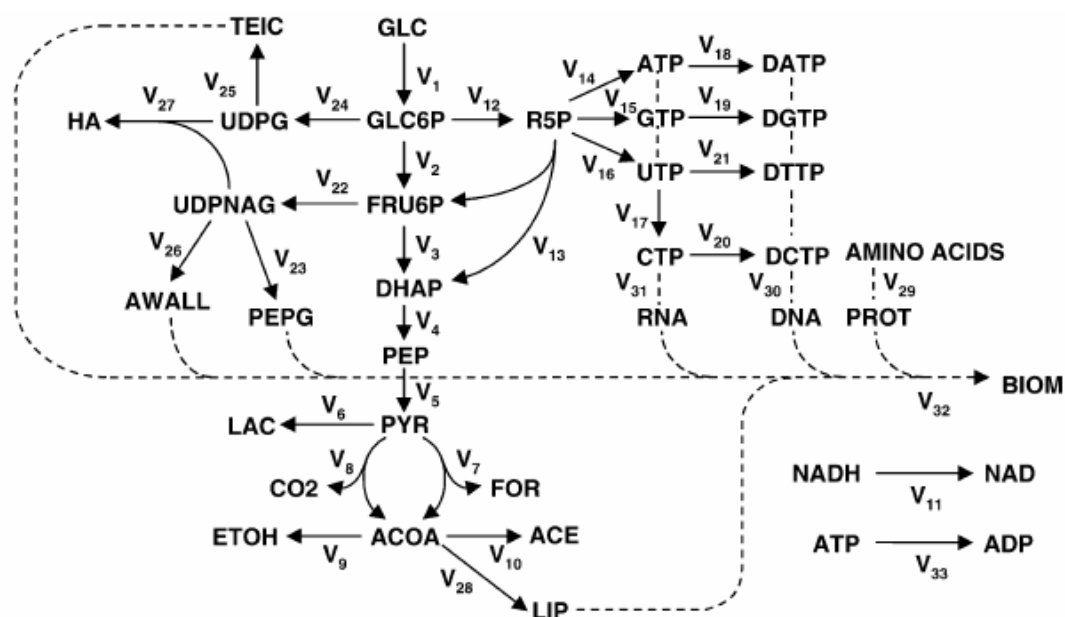


Figura 2.6 – Fluxo metabólico do *S. zooepidemicus* (adaptado de Chong & Nielsen, 2002) .

V_1	$GLC(E) + PEP \rightarrow GLC6P + PYR$
V_2	$GLC6P \rightarrow FRU6P$
V_3	$FRU6P + ATP \rightarrow 2DHAP + ADP$
V_4	$DHAP + NAD + ADP + PI \rightarrow PEP + NADH + ATP$
V_5	$PEP + ADP \rightarrow PYR + ATP$
V_6	$PEP + NADH \rightarrow \underline{LAC} + NAD$
V_7	$PYR + CoA \rightarrow \underline{FOR} + ACoA$
V_8	$PYR + CoA + NAD \rightarrow ACoA + NADH + CO_2$
V_9	$ACoA + 2NADH \rightarrow \underline{ETOH} + CoA + 2NAD$
V_{10}	$ACoA + 2NADH \rightarrow \underline{ACE} + CoA + ATP$
V_{11}	$2NADH + O_2 \rightarrow 2NAD + 2H_2O$
V_{12}	$GLC6P + 2NADP \rightarrow R5P + 2NADPH + CO_2$
V_{13}	$3R5P \rightarrow 2FRU6P + DHAP$
V_{14}	$A + R5P + 4ATP \rightarrow ATPN + 4ADP + PPI$
V_{15}	$G + R5P + 4ATP \rightarrow GTP + 4ADP + PPI$
V_{16}	$U + R5P + 4ATP \rightarrow UTP + 4ADP + PPI$
V_{17}	$UTP + GLN + ATP \rightarrow CTP + GLU + ADP + PI$
V_{18}	$ATPN + NADPH \rightarrow DATP + NADP$
V_{19}	$GTP + NADPH \rightarrow DGTP + NADP$
V_{20}	$UTP + NADPH \rightarrow DGTP + NADP$
V_{21}	$ATPN + MTHF + 2ATP + NADPH \rightarrow UDPNAG + GLU$ $+ CoA + PPI$
V_{22}	$FRU6P + GLN + ACoA + UTP \rightarrow DTTP + DHF + 2ADP +$ $+ NADP + PPI$
V_{23}	$UDPNAG + PEP + 3,5ALA + GLU + LYS + 8ATP + NADPH \rightarrow PEPG +$ $+ 2UTP + 8ADP + 7PI + NADP$
V_{24}	$GLC6P + UTP \rightarrow UDPG + PPI$
V_{25}	$UDPG + 3DHAP + 3NADH + 5ATP \rightarrow TEIC + 3NAD + 5ADP + UTP + 2PPI$
V_{26}	$UDPNAG + 2G6P + 2NADPH + 3ATP \rightarrow AWALL + UTP + 2NADP + 3ADP + 2PPI$
V_{27}	$UDPG + UDPNAG + 2NAD + 2ATP \rightarrow \underline{HA} + 2UTP + 2NADH + 2ADP$
V_{28}	$23,9ACoA + 2,1DHAP + 0,65UDPG + 43,5NADPH + 24,3ADP + 2,1NAD \rightarrow LIP +$ $+ 23,9CoA + 43,5NADP + 24,3ADP + 2,1NAD + 0,65UTP + 1,1PPI + 2,2PI + 2,1H_2O$
V_{29}	$100AMINAc + 430,6ATP \rightarrow 100PROT + 430,6ADP + 430,6PI$
V_{30}	$29DATP + 29DTTP + 21DGTP + 21DCTP + 137,2ATP \rightarrow 100DNA + 137,2ADP + 137,2PI + 10PPI$
V_{31}	$26,2ATPN + 21,6UTP + 32,2GTP + 20CTP + 40ATP \rightarrow 100RNA + 40ADP + 40PI + 100PPI$
V_{32}	$86,7PROT + 2PEPG + 1,6TEIC + 0,7AWALL + 1,1DNA + 7,6RNA + 0,5LIP \rightarrow \underline{100BIOM}$
V_{33}	$ATP \rightarrow ADP + PI$

Reações do fluxo metabólico do *S.zooepidemicus* (adaptado de Chong & Nielsen , 2002)

Chong & Blank (1998) ainda observaram que a massa molar do AH produzido na fermentação é inversamente relacionada com a taxa de crescimento celular da bactéria. A afirmação de **Chong** e **Blank** apóia-se, também, na observação de que a parede celular de bactérias gram positivas é construída a partir de um dissacarídeo que contem um dos precursores da síntese do AH, o *N-acetil-glocasamina*, que une-se por meio de ligações β 1-4 ao *N-acetilmuramico*, formam a molécula *glicano* que varia no comprimento (de 5 a 30 unidades) dependendo do tipo de bactéria utilizada (**Navarre et al.**, 1999).

Portanto, a taxa específica de produção do AH ($\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) aumenta com a diminuição da taxa de crescimento específica, de modo que maiores taxas de produção podem ser atribuídas a maiores taxas de polimerização através da AH sintase (Figura 2.7)

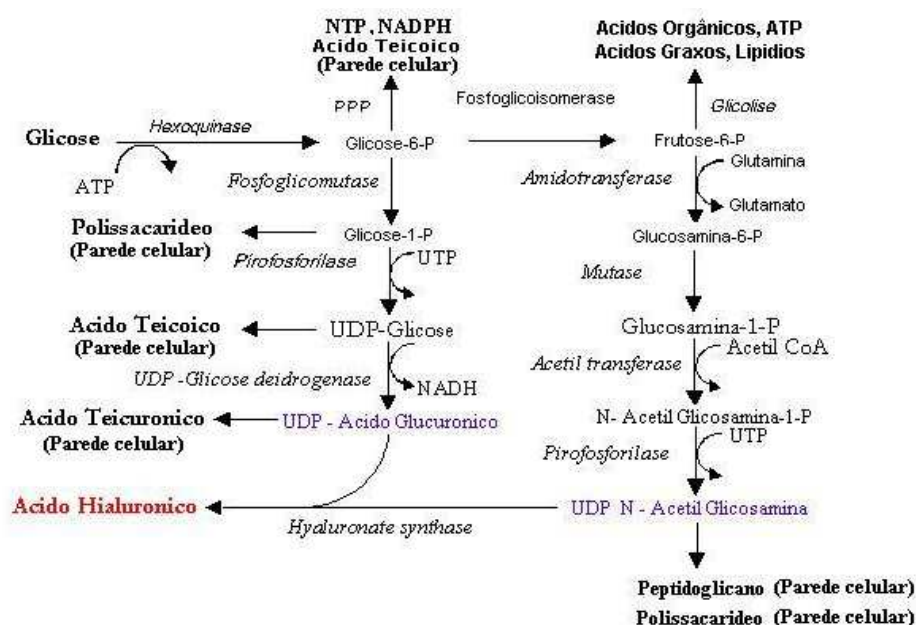


Figura 2.7 – Rota de síntese de ácido hialurônico (adaptado de Chong *et al.*, 2005) .

A massa molecular do AH produzido é determinada pelo número de precursores que a sintase pode polimerizar durante a sua meia vida (2 a 4 horas).

Baseando-se na similaridade entre os tempos de produção de uma cadeia de AH e o período de vida da sintase, é proposto que a mesma produza apenas uma cadeia, desse modo, a sintase não aumentará a massa molar do AH sintetizado, mas poderá reduzir a massa molecular média em caso de competição (**Chong**, 1998).

Assim, o mecanismo fundamental de síntese de AH é descrito por **Weigel** (2004) como sendo o seguinte:



As interações e reações envolvidas na formação de ligações glicosídicas determinam a natureza das relações entre doador/receptor e os substratos. Assim, os mecanismos para a biossíntese de um polissacarídeo são fundamentalmente diferenciadas.

O primeiro modelo teórico para a biossíntese de AH propunha que três sítios ativos estavam envolvidos na transferência de açúcares dos precursores para o terminal não redutor da cadeia alternadamente (**DeAngelis**, 1999).

DeAngelis (1999) ainda afirma que o mecanismo de controle do tamanho da cadeia ainda não é conhecido.

Yamada & Kawasaki (2005) apresentaram em seus estudos um modelo teórico para a síntese e alongação da cadeia do AH no interior da membrana plasmática, que é apresentado na figura 2.8.

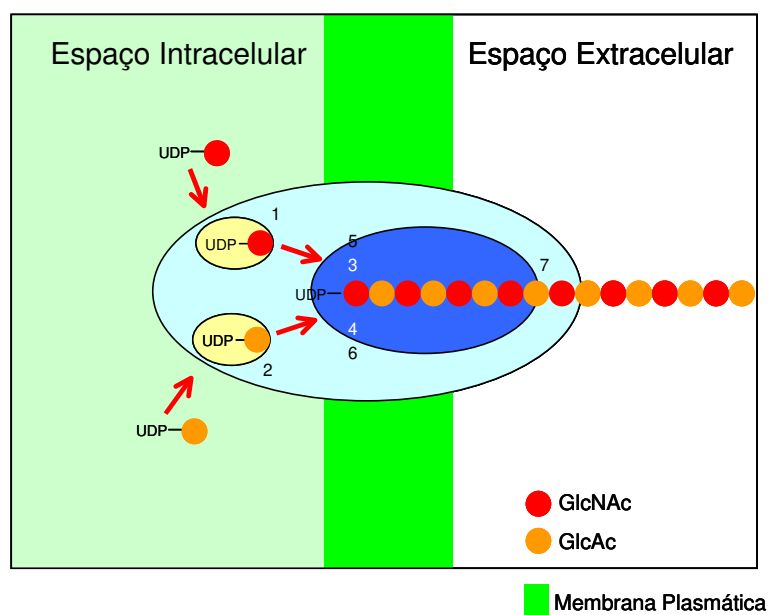


Figura 2.8 – Esquema simplificado para representação da síntese de AH. (adaptado de **Yamada et al.**, 2005)

2.5. Produção de AH por Processos Fermentativos

Muitos são os esforços empenhados no desenvolvimento de sistemas para produção de ácido hialurônico em via fermentativa. Assim, apresentando-se com uma viável alternativa aos processos convencionais de extração dessa substância de tecidos, os processos fermentativos apresentam aspectos importantes, que incluem processos de purificação menos laboriosos (**Chong & Blank**, 1998).

Parte dos esforços no desenvolvimento de sistemas fermentativos têm sido direcionados para a seleção da bactéria e do meio de cultura adequados ao processo. **Johns & Armstrong** (1997) mencionaram que processos em batelada são empregados mais freqüentemente para a produção de polímero com uma massa molar que varia entre 1 a 2,5 MDa.

2.5.1. Microrganismos Empregados e Condições do Processo

O AH tem sido produzido comercialmente, desde os anos 80, através de sistemas fermentativos com uso de *Streptococcus* do grupo C, em particular *Streptococcus equi* das subespécies *equi* e *zooepidemicus* (**Chong et al.**, 2005). *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* é um importante patógeno de eqüinos, segundo nos reporta **Lammler** e colaboradores (1999).

Kendall, Heindelberg e Danson obtiveram em torno de 100 mg de AH por litro de cultura líquida, sendo esta a primeira vez que se isolou o AH produzido por microrganismos do grupo A de *Streptococcus*.

A literatura reporta ainda a possibilidade de produção de AH utilizando linhagens de *Streptococcus*, tais como *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equi* e *Streptococcus dysgalactiae*.

Condições aeróbias e anaeróbias foram também empregadas, conforme menciona **Nimrod et al.** (1988). **Nimrod** e colaboradores ainda mencionam a obtenção de um produto com concentração de 1,02 g/ cm³ em massa molar que excedia 6 MDa. Entretanto, mesmo podendo ser produzido por via aeróbia e anaeróbia, condições de aerobiose favorecem o aumento da massa molar desse biopolímero.

Processos em batelada e batelada alimenta podem ser empregados nessa finalidade, no entanto, processos contínuos também podem ser empregados. (**Chong et al.**, 2005). O cultivo contínuo pode reduzir a polidispersidade observada durante a produção de AH em processos em batelada devido às mudanças na taxa de crescimento (**Johns & Armstrong**, 1997). Há restrições aos processos contínuos no que diz respeito à sua baixa produtividade volumétrica, o que poderia justificar o amplo emprego de processos em batelada na produção industrial do AH. (**Chong et al.**, 2005, **Ellwood et al.**, 1996). Assim, a literatura reporta diversos estudos para a otimização de processos em batelada.

Johns & Armstrong (1997) apresentam como condições ótimas para o cultivo uma temperatura variando entre 30 e 37 °C e pH entre 6,5 e 7,5.

O que é reforçado por **Chong et al.** (2005) pela observação de que quando o crescimento se dá a um pH neutro e de uma temperatura de 37°C, a produtividade de AH é elevada.

Uma vigorosa agitação faz-se necessária para o processo de transferência de oxigênio no meio.

Ogrodowski (2006), estudou a influência da aeração forçada e da agitação acompanhando perfis de oxigênio dissolvido, massa celular, concentração de glicose e concentração de AH, em diversos níveis de agitação e aeração em um reator do tipo Bioflo III. Assim, para menores níveis de agitação as fermentações são mais controladas quando comparadas a níveis elevados como 400 rpm. **Ogrodowski** ainda apresentou que em agitação em níveis elevados pode acarretar o cisalhamento da célula e que o oxigênio deverá ser disponibilizado à célula em níveis médios para evitar a ação tóxica do mesmo sobre o microrganismo.

A relação negativa entre a taxa de crescimento, a produtividade específica e massa molar somente é verdadeira quando a inibição do crescimento não é associada com redução de glicose. (**Chong et al.**, 2005)

2.5.2. Meio de Cultura

Streptococcus dos grupos A e C são, sob o aspecto nutricional, exigentes no que diz respeito ao nitrogênio orgânico, conforme nos reporta **Johns et al.**(1997). Assim, as fontes de nitrogênio são consideravelmente importantes para que haja um bom crescimento dessas linhagens.

A literatura menciona meios sintéticos usados no crescimento de cepas de *Streptococcus*, no entanto, não reporta meios complexos utilizados nessa finalidade.

Oliveira (2004) apresentou a utilização de suco de caju como meio de cultura em processos de produção de AH, visando a substituição do meio BHI (*Brain Heart Infusion*), recomendado pela ATCC para o cultivo de *S. zooepidemicus*. Desse modo, pode-se eliminar a presença de antígenos que, por

ventura, possam estar nos meios de cultura de origem animal, reduzindo, assim, as contaminações no produto.

Os experimentos de **Oliveira** apresentam resultados da suplementação do meio de suco de caju puro com BHI, para o preparo do inóculo, nas concentrações de 10,20,30 e 37 g/L, sendo que, nesta última o cultivo foi feito, também, por 24 horas.

Dessa forma, observa-se que a crescente adição de BHI ao meio de cultivo gera um aumento na concentração celular final.

A suplementação com extrato de leveduras também é proposta por **Oliveira** como alternativa ao uso do BHI. Os significativos resultados de seu trabalho mostram que, semelhante ao que ocorre com o BHI, a concentração celular cresce com a crescente adição de extrato de levedura ao meio de suco de caju (Figura 2.9).

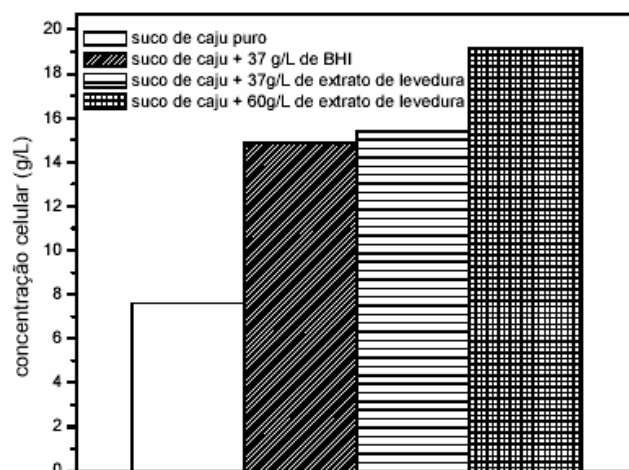


Figura 2.9- Comparação entre a massa celular seca obtida com suco de caju puro e suplementado. (Oliveira, 2004)

2.5.3. Processo de Clarificação do Suco de Caju por Membranas

2.5.3.1. Processo de Separação por Membranas

A filtração é uma operação de separação de dois ou mais componentes de uma mistura, que em seu uso convencional, refere-se, geralmente, à separação de partículas sólidas, imiscíveis, a partir de um fluxo fluido (líquido ou gasoso). Segundo define **Cheryan** (1986), a filtração por membranas estende esta aplicação incluindo a separação de solutos dissolvidos em líquidos e para a separação de misturas gasosas.

A membrana age como uma barreira seletiva, isto permite a passagem de certos componentes, retraindo outros, de uma mistura.

Hwang & Kammermeyer (1975), conforme cita **Cheryan** (1986), definiram uma membrana como uma fase que age como uma barreira para prevenir o movimento de massa, mas admitindo a passagem restrita ou regulada de uma ou mais espécies por ela. Há, portanto, segundo essa definição, que se mencionar que uma membrana pode ser gasosa, líquida, sólida ou uma combinação entre elas.

Cheryan (1986), ainda menciona a possibilidade das membranas modificarem o permeado física ou quimicamente, como vemos em membranas de troca iônica ou bifuncionais, conduzir corrente elétrica, prevenir o transporte, como no caso de embalagens e revestimentos ou apresentarem permeabilidade seletiva. Desse modo, as membranas podem ser passivas ou reativas quanto à sua habilidade para alterar a natureza química das espécies.

Duas configurações podem ser utilizadas no processo, a filtração estática, também denominada de *dead-end*, e a filtração tangencial, conforme podemos ver na ilustração (Figura 2.10).

Na filtração estática, a solução é alimentada perpendicularmente à membrana, gerando uma única corrente que se denomina de filtrado ou permeado. As partículas que ficam retidas na membrana formam uma torta na zona superficial, acarretando a diminuição considerável do fluxo permeado o que

exige freqüentes paradas para limpeza ou troca da membrana, conforme menciona **Dziedzak** (1990).

Na filtração tangencial, a solução é alimentada em fluxo tangencial à membrana, por sua vez, duas correntes distintas são geradas, a corrente de permeado e a corrente de retentado. O permeado é a corrente constituída por componentes de tamanho menor que o dos poros da membrana. A corrente de retentado é rica em solutos maiores e que não passaram através dos poros da membrana. (**Paulson et al.**,1984)

O perfil para o fluxo permeado e para a resistência causada pela torta são ilustrados na Figura 2.11.

Nota-se que, para o caso da filtração estática, rapidamente há uma diminuição no fluxo permeado (J) em virtude da formação da torta, há, portanto, um rápido aumento na resistência atribuída à formação e retenção da torta na superfície da membrana.

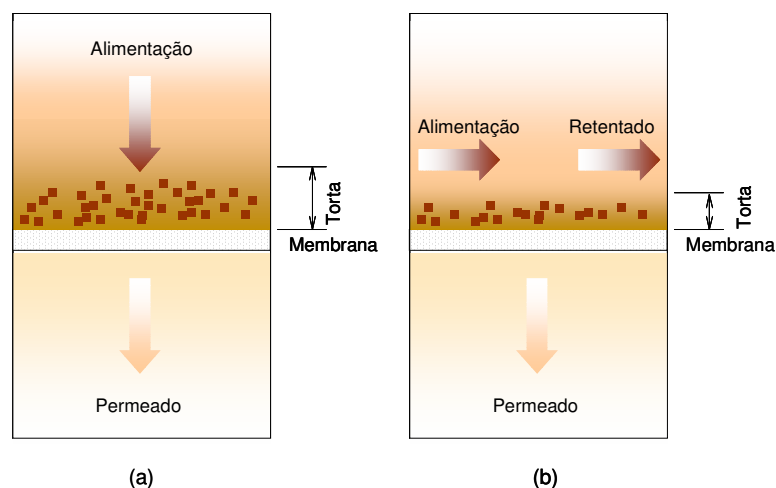


Figura 2.10- Ilustração da filtração estática (a) e tangencial (b) (adaptado de **Cheryan**,1998)

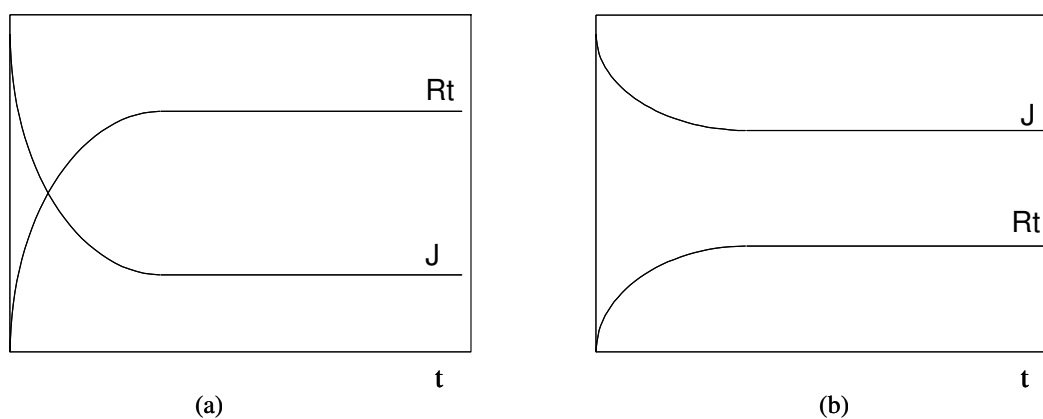


Figura 2.11- Ilustração dos perfis de Fluxo permeado e resistência causada pela torta na filtração estática (a) e tangencial (b) (adaptado de **Cheryan**,1998).

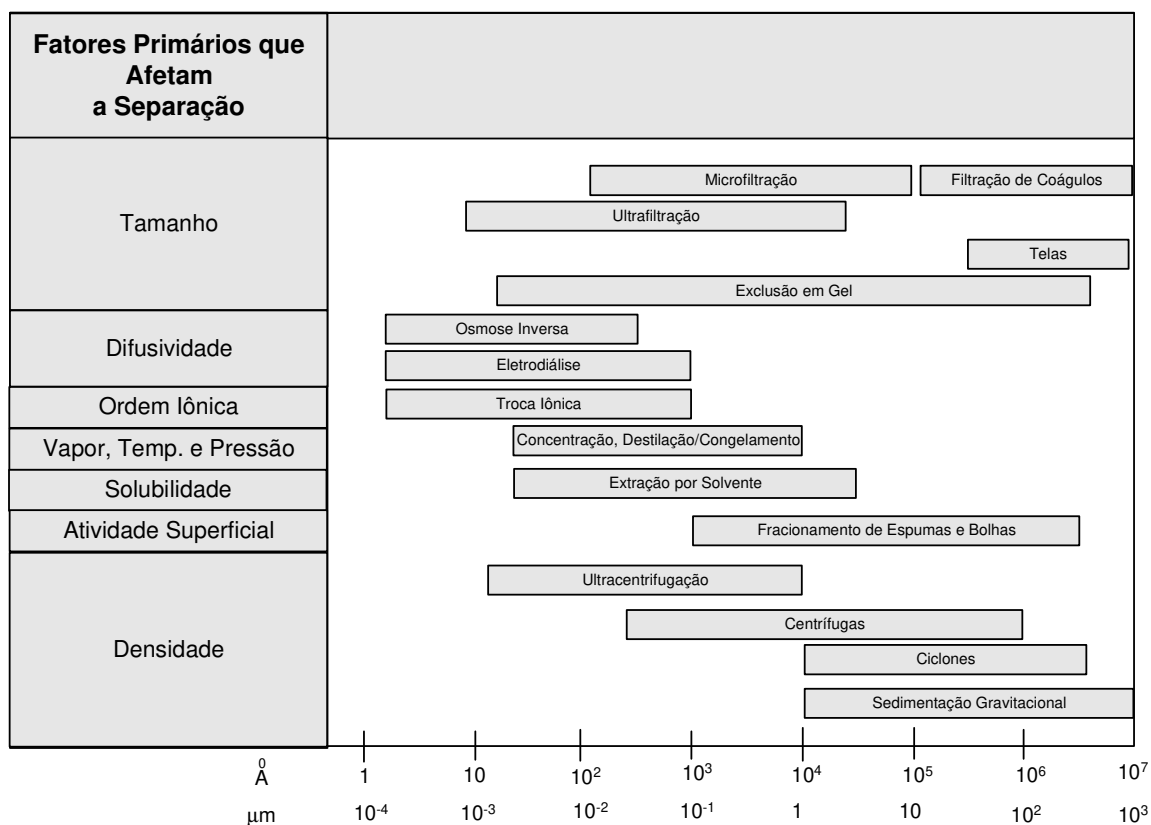


Figura 2.12 – Faixas de Separação e fatores que afetam a separação.

Durante a ultrafiltração, o soluto é trazido até a membrana por transporte convectivo e uma porção de solvente é removida do fluido, o que resulta numa alta concentração local de soluto na superfície da membrana quando comparado à concentração da corrente principal.

O fluxo permeado é uma variável crítica na determinação da eficiência do processo de ultrafiltração, sendo desejado o máxima taxa de permeação com o mínimo consumo de energia (**Barros**, 2002).

Na ultrafiltração, o declínio do fluxo permeado em função do tempo de processamento de uma solução multicomponente, quando comparado com água pura, pode estar relacionado, segundo afirma **Barros** (2002), com fenômenos como compactação e formação de crosta na membrana (*fouling*).

O fluxo permeado é dado, matematicamente pela equação 2.1.

$$J = \frac{mp}{t \cdot A} \quad (\text{Equação 2.1})$$

Onde, J é o fluxo permeado, mp é a massa de permeado ao longo do tempo t e A é a área de filtração da membrana.

2.5.3.2. Clarificação do Suco de Caju

O principal objetivo da clarificação do suco de caju é a remoção de taninos do conteúdo líquido extraído do pedúnculo.

O termo tanino é utilizado para definir duas classes distintas de compostos químicos de natureza fenólica: os *taninos hidrolisáveis* e os *taninos condensados*. (**Carneiro**, 2001).

Os taninos são, portanto, compostos não cristalizáveis e na presença de água formam soluções coloidais que apresentam reação ácida e forte sabor adstringente. Os taninos compreendem um grande grupo de substâncias complexas muito disseminadas no reino vegetal; em quase todas as famílias botânicas há espécies que contêm taninos. Estes, quando ocorrem em grande quantidade, geralmente se localizam em determinados órgãos da planta como as folhas, os frutos, o córtex ou o caule. Quimicamente, os taninos são substâncias complexas que em geral ocorrem como misturas de polifenóis difíceis de separar por não se cristalizarem. (**Ferrão et al.** 2003)

A atividade antimicrobiana dos taninos é conhecida e o mecanismo de sua ação explica-se por três hipóteses. A primeira pressupõe os taninos inibindo enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexando com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (**Scalbert**, 1991).

Desse modo, a presença de compostos de tal natureza poderiam inibir a atuação dos organismos durante a fermentação.

Cianci et al. (2005) avaliaram a utilização dos processos de separação por membranas, a microfiltração e a osmose inversa, no processamento do suco de caju, contribuindo, desta forma para o desenvolvimento de técnicas que permitem a redução de taninos no suco de caju.

Como resultado de seus trabalhos, **Cianci et al.** (2005), obtiveram um suco permeado livre de taninos, o que assegura que a utilização de técnicas de microfiltração podem ser usadas para tal propósito.

2.6. Fermentação em Estado Sólido

2.6.1 Caracterização do cultivo

O cultivo em estado sólido ou fermentação em estado sólido (FES) é caracterizado pelo crescimento de microrganismos sobre uma matriz sólida, ou seja, suporte insolúvel, na ausência ou perto da ausência de água livre (**Pandey**, 2003; **Raghavarao et al.** 2003), diferenciando-se, portanto, de processos de cultivo submerso e das reações com células imobilizadas pela quantidade de água livre presente, conforme afirma **Gutiérrez-Correa & Villena** (2003).

A água livre, no entanto, não parece ser o meio natural para maioria dos microrganismos. Nem mesmo os microrganismos marinhos preferem nadar na água livre do mar visto que 98% dos microrganismos isolados do meio marinho foram obtidos abaixo da superfície aquática em substratos sólidos. (**Hölker et al.**, 2004; **Amarante**, 2005)

Atualmente, a técnica de fermentação semi-sólida tem sido extensamente explorada devido às vantagens oferecidas principalmente no cultivo de fungos filamentosos (**Hasan**, 2002). Segundo afirma **Pandey** e colaboradores (2002) e reforça **Hasan** (2002), nos últimos dez anos tem havido crescente desenvolvimento da FSS com aplicação em diversas áreas como bioremediação e biodegradação de compostos tóxicos, detoxificação biológica de resíduos agroindustriais tóxicos, biotransformação de resíduos de plantações para enriquecimento nutricional e para obtenção de produtos biologicamente ativos como metabólitos secundários, incluindo micotoxinas (aflatoxina e ocratoxina), biopesticidas (endotoxinas bacterianas), hormônios de crescimento de plantas (ácido giberélico), promotor de crescimento (zearalelona), antibióticos (penicilina, cefalosporina, cefamicina C, oxitetraciclina, *iturin*, *surfactin* e *monodern*), drogas imunossupressivas (ciclosporina A), ácidos orgânicos, compostos aromáticos alimentares e diversas enzimas. A maioria das aplicações citadas envolvem a utilização de resíduos agroindustriais como substrato, apesar de alguns usarem suportes inertes para cultivo.

Tabela 2.2. Aplicações industriais da FES (adaptado de *Raimbault, 1997*)

Aplicações	Exemplos
Alimentos Fermentados	Koji, Tempeh, Ragi, Attieke, queijos
Bioconversão de Resíduos	Bagaço de cana, polpa de café
Aditivos de Alimentos	Flavorizantes, Corantes, óleos essenciais
Bioinseticidas	<i>Beauveria, Metarhizium, Trichoderma</i>
Produção de Enzimas	Amilases, Celulases, Proteases, Pectinases e Xilanases
Fármacos	Penicilina e Probióticos
Produção de Ácidos Orgânicos	Ácido Cítrico, Fumárico, Gálico, Lático, Giberélico
Fermentação Alcoólica	<i>Schwanniomyces sp.</i> , Malteação
Metabólitos Fúngicos	Hormônios e Alcalóides

Há aspectos importantes que devem ser considerados no desenvolvimento geral de um bioprocessamento em FSS. Esses incluem seleção de microrganismos e substratos adequados, otimização dos parâmetros de processo, isolamento e purificação do produto.

Seleção de um substrato adequado é outro ponto chave da FES. Em FES, o material sólido não é solúvel, agindo, em muitos casos, como suporte e fonte de nutrientes. O material sólido pode ser de origem natural tal como resíduos agroindustriais ou um suporte inerte impregnado de solução nutritiva (**Pandey et al., 2000**; **Ooijskaas et al., 2000**; **Pandey, 2003**). **Durand (2003)** menciona que matrizes usadas como suporte nos processos em estado sólido podem variar na sua composição, tamanho, resistência mecânica, porosidade e capacidade de retenção de água.

Sistemas em estado sólido apresentam diversas vantagens em relação aos cultivos submersos. Como vantagens biológicas cita-se a baixa demanda de água, utilização de substratos insolúveis em água e fontes de carbono pouco usuais e a similaridade com o ambiente natural de muitos microrganismos. Podemos citar como vantagens de processo a alta produtividade volumétrica, facilitada recuperação de produtos e reduzidas exigências energéticas. No entanto, esses sistemas podem apresentar alguns problemas como o surgimento de gradientes de temperatura, umidade, oxigênio e nutrientes. Além disso, estes processos apresentam desvantagens tais como a utilização apenas de microrganismos que desenvolvam-se em baixos níveis de umidade e atividade de água, dificuldades na medida e controle de parâmetros, necessidade de elevados inóculos, pré-tratamento do substrato e dificuldades no escalonamento do processo (**Ooijkaas et al.**,2000; **Bastos**, 2006).

Mencionando a classificação teórica baseada na atividade de água, somente fungos e leveduras seriam adequados aos processos de fermentação semi-sólida. Pensando-se que devido ao elevado requerimento de atividade de água, culturas bacterianas não fossem adequadas a esses processos. No entanto, a experiência tem mostrado que culturas bacterianas podem ser bem controladas e manipuladas em FES (**Pandey**, 2003).

2.6.2. Biorreatores Usados em FES

Durand (2003) afirma que há duas categorias de biorreatores usados em FSS:

- Reatores em escala laboratorial e
- Reatores em escala piloto e industrial.

Na primeira categoria observamos o uso de pequenas quantidades de meio sólido (na ordem de alguns gramas), como ressalta **Bastos**, 2006.

Os tipos mais comuns de biorreatores usados em cultivo em estado sólido, segundo **Durand** (1997), **Mitchell et al.** (2000) e conforme reafirma **Bastos** (2006), são do tipo bandeja, leito fixo, agitados e de leito fluidizado gás-sólido.

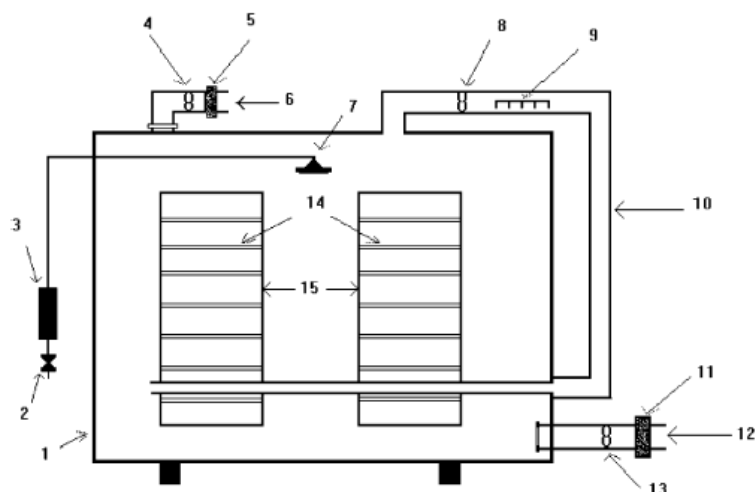


Figura 2.13. Reator de Bandejas do Tipo Koji (adaptado de **Durand**, 2003)

Biorreatores de bandeja são caracterizados pela simplicidade de sua configuração, uma vez que o substrato é disposto em bandejas que normalmente são perfuradas para a facilitação da convecção do ar. Neste tipo de biorreator não há aeração forçada nem agitação mecânica, por isto se utiliza finas camadas de substrato com o intuito de controlar o aquecimento metabólico e para a manutenção das condições aeróbias (**Robinson & Nigam**, 2003; **Durand**, 2003 ; **Bastos**, 2006).

Na figura 2.13, apresentada acima, adaptada de **Durand** (2003), observamos uma configuração típica para reatores do tipo bandeja usados no processo Koji, onde observamos (1) uma sala Koji, (2) válvula de água, (3) tubo de UV, (4,8,13) sopradores, (5,11) filtros de ar, (6) saída de ar, (7) umidificador, (9)

aquecedor, (10) recirculação de ar, (12) entrada de ar, (14) bandejas e (15) suportes para as bandejas.

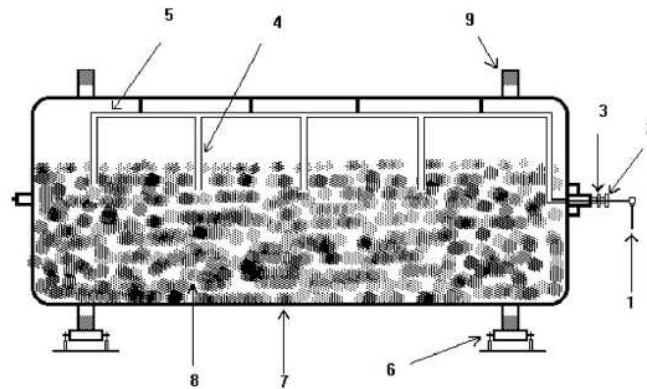


Figura 2.14. Reator de tambor rotativo (adaptado de **Durand**, 2003)

Reatores agitados podem apresentar duas configurações peculiares:

- Reatores de tambor rotatório e
- Reatores estáticos.

Na primeira configuração a agitação é promovida pela rotação do tambor em torno do eixo do motor, diferindo do segundo grupo por apresentarem estes agitadores mecânicos que promovem a mistura do meio sólido.

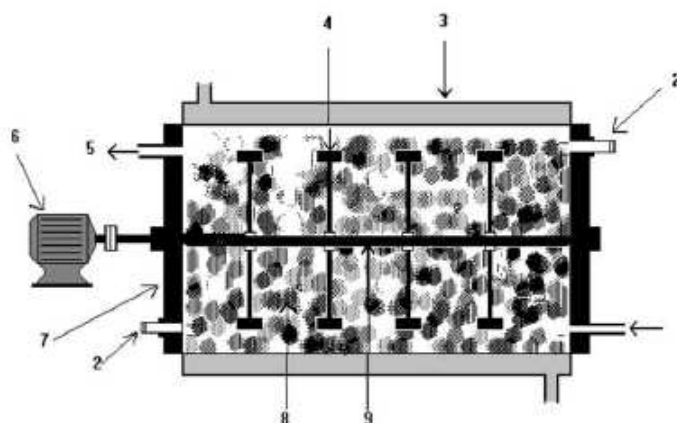


Figura 2.15 . Reator de misturador horizontal de pás (adaptado de **Durand**, 2003)

A figura 2.14 apresenta uma típica configuração para reatores do tipo tambor rotativo, onde observamos (1) entrada de ar, (2) junta de rotação, (3) acoplamento, (4) bocais, (5) linha de ar, (6) rolamentos, (7) tambor, (8) meio sólido e (9) bordas.

Na figura 2.15 é **Durand** (2003) apresenta um sistema típico para reatores com mistura promovida por sistemas de pás em eixo horizontal. No esquema observamos (1) entrada de ar, (2) termopar, (3) jaqueta, (4) pás, (5) saída de ar, (6) motor de agitação, (7) reator, (8) meio sólido e (9) eixo de agitação.

Em reatores de leito fixo (figura 2.16 e 2.17) a aeração forçada é promovida através da camada de substrato. Esses biorreatores são tipicamente cilíndricos, feitos em vidro ou em plástico, com controle de temperatura feita em por meio de banho termostático ou através de camisas nas colunas (**Durand**,2003; **Bastos** 2006).

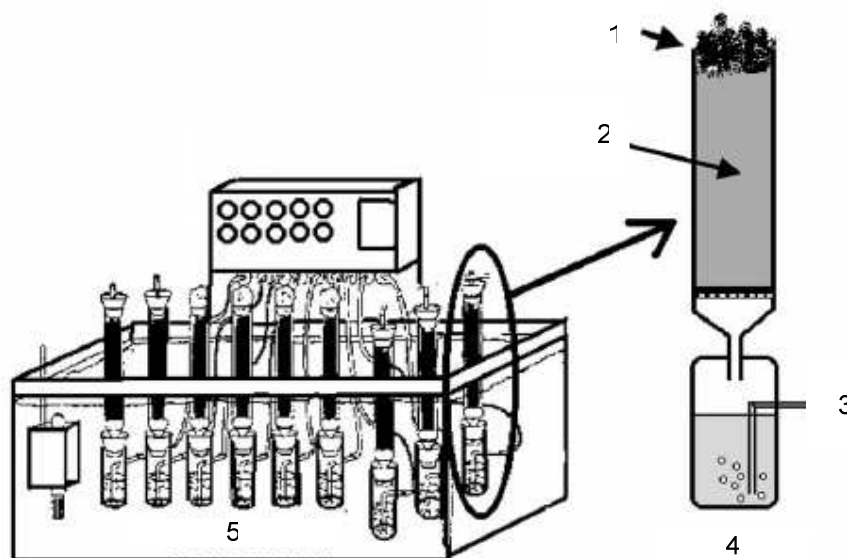


Figura 2.16. Reatores do tipo leito fixo em escala laboratorial (adaptado de **Durand**, 2003)

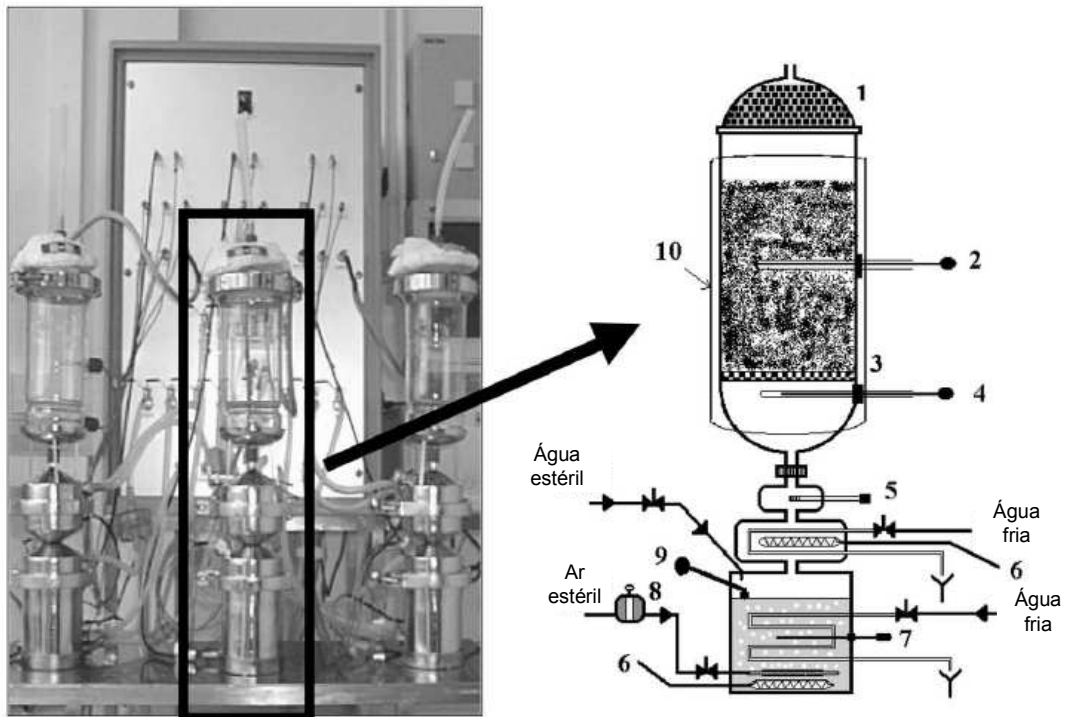


Figura 2.17. Esquema de coluna esterilizável para escala laboratorial (adaptado de **Durand**, 2003)

2.6.3. Fenômenos de Transferência de Massa no Cultivo em Estado Sólido

O cultivo em estado sólido é caracterizado com um sistema heterogêneo, de maneira que possui algumas limitações, em especial limitações quanto ao transporte de massa e calor, podendo, assim, comprometer a produtividade

(Gowthaman *et al*, 1993; **Bastos**, 2006). Observa-se, portanto, que as características desses fenômenos de transferência, conforme ressalta **Bastos** (2006), estão intimamente ligados à natureza do substrato e do microrganismo, condutividade térmica, difusividade efetiva, porosidade e teor de umidade do substrato sólido.

O crescimento dos microrganismos é dependente da difusão interpartícula e intrapartícula dos gases (O_2 e CO_2) como também de enzimas, nutrientes e produtos do metabolismo.

Para Raghavarao *et al.* (2003), os fenômenos que ocorrem em sistemas reacionais dessa espécie podem ser classificados como:

- Fenômenos macroscópicos e
- Fenômenos microscópicos.

Macroscopicamente (figura 2.18), os processos de transferência de massa incluem:

- O fluxo de ar no biorreator que traz como conseqüências mudanças na temperatura e nas concentrações de O_2 , de CO_2 e de água;
- A convecção natural, a difusão e a condução que ocorrem na direção normal ao fluxo de ar durante a aeração;
- Condução de calor através da parede do biorreator;
- Efeitos de cisalhamento causados pela mistura dentro do biorreator que inclui aspectos da manutenção da integridade das partículas sólidas.

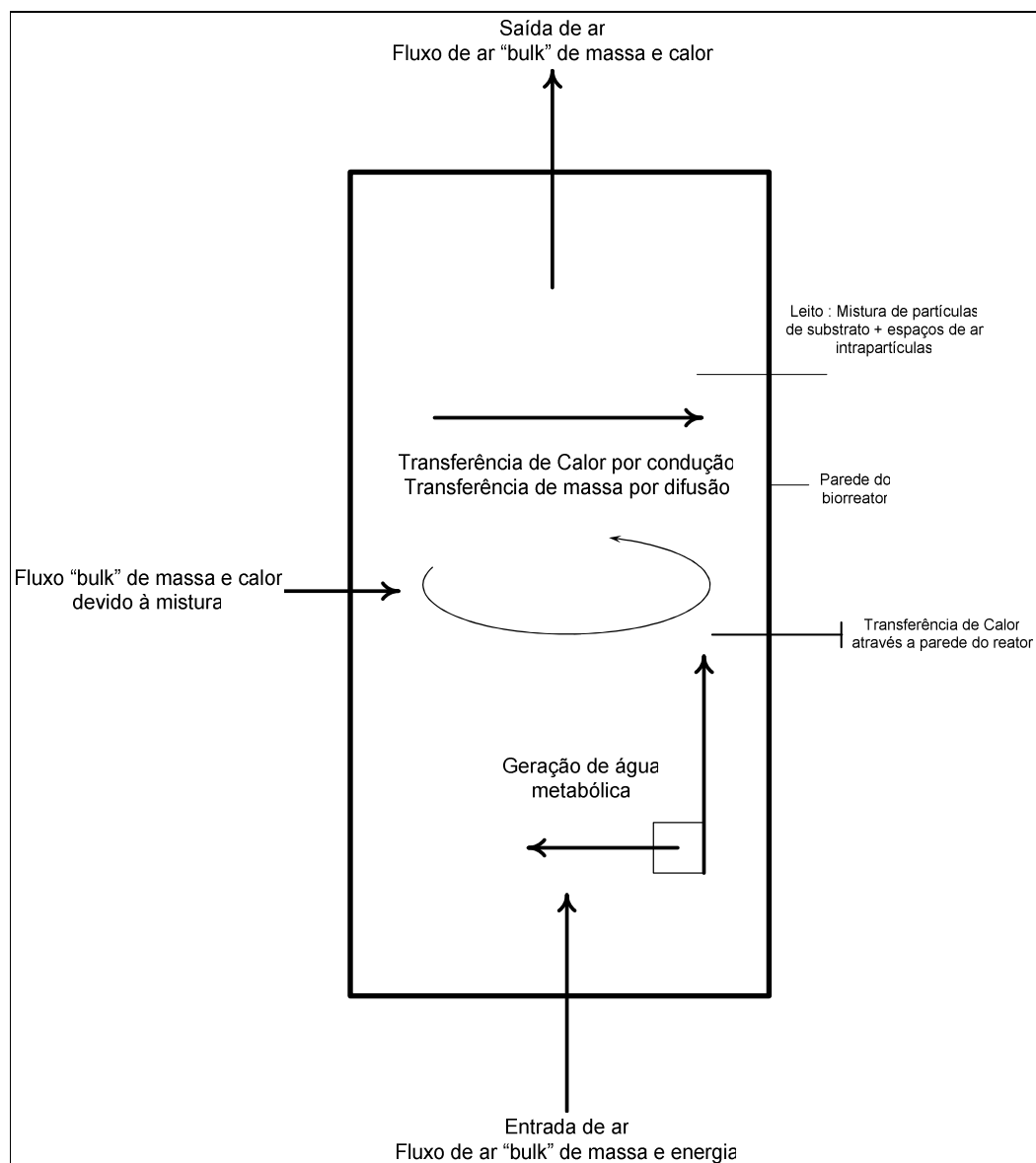


Figura 2.18. Fenômenos Macroscópicos que ocorrem em biorreatores.

Apesar desses fenômenos apresentarem importantes contribuições para os balanços de massa e energia não necessariamente apresentam-se com a mesma intensidade em todos os tipos de biorreatores, segundo afirma **Mitchell** e colaboradores (2000).

Microscopicamente, observamos que os microrganismos crescem na região úmida na superfície dos substratos sólidos. No caso de sistemas fúngicos, durante o crescimento, as hifas penetram na partícula em busca de nutrientes, o que acarreta difusão de solutos do interior da partícula (**Mitchell**.*et al.*, 2000; **Bastos**, 2006). No caso de sistemas bacterianos, o crescimento se dá no meio líquido que está estagnado em volta da partícula e na região intraparticular embebida por líquido em um meio estagnado intraparticular.

2.6.4. Transferência de Oxigênio no Cultivo

A forma mais prática de aumentar o metabolismo aeróbio é facilitando a transferência de Oxigênio da fase gasosa para os microrganismos via aumento da área de interface entre a fase gasosa e o biofilme. A área interfacial pode ser aumentada através da redução do tamanho das partículas ou pré-tratamento do substrato (**Oostra et al.**, 2001).

Assim, em processos que ocorrem sob aerobiose, a transferência de oxigênio é um dos fenômenos mais importantes para o crescimento e manutenção do microrganismo durante esses processos.

O coeficiente global de transferência de massa (gás-líquido), o K_La , portanto, é uma variável de grande importância na descrição destes processos, conforme menciona **Poughon** e colaboradores (2003).

Nos cultivos em estado sólido, são raros os trabalhos que abordam este tema de maneira quantitativa, mesmo que a transferência de oxigênio seja um fator limitante em alguns sistemas reacionais, conforme observa **Bastos** (2006).

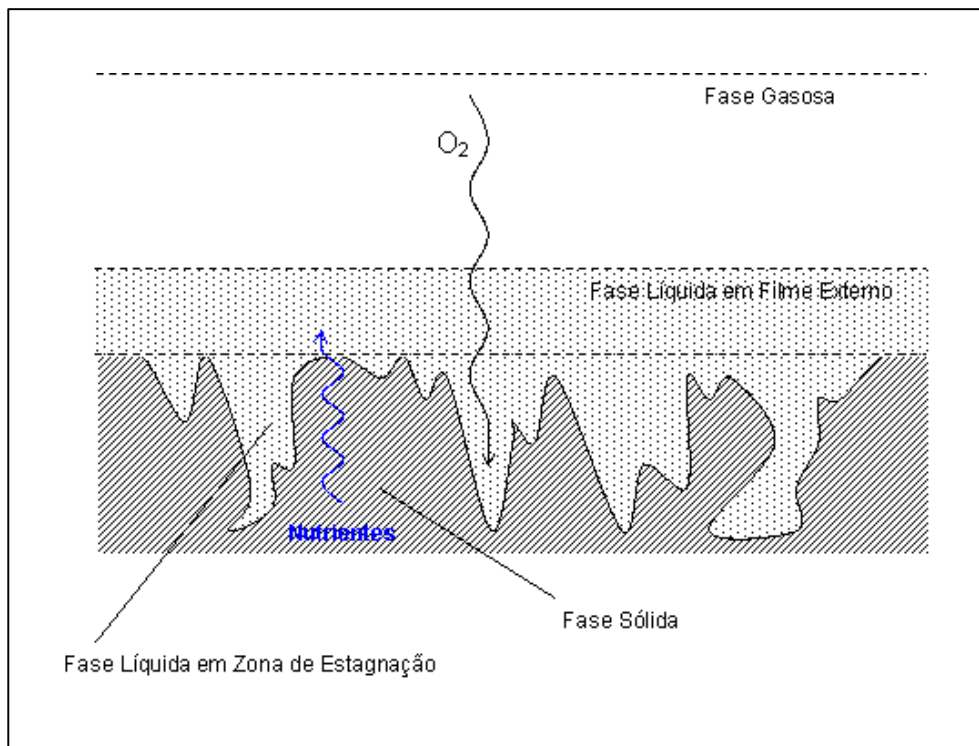


Figura 2.19. Transferência de Oxigênio em Sistemas sólidos porosos.

Os microrganismos crescem, portanto no interior ou na superfície de partículas porosas. Há formação superficial de um filme líquido delgado.

Em uma caracterização geral, a transferência de oxigênio nesses processos está associada a três domínios de ocorrência (figura 2.19) Há, portanto uma etapa inicial de transferência de oxigênio do domínio gasoso para o domínio líquido no filme externo à partícula. A segunda etapa está associada ao líquido estagnado nas reentrâncias e poros do sólido, constituindo uma **de** zona de estagnação. Dessa forma, menciona **Thibault et al.** (2000), o oxigênio é transferido por convecção da fase gasosa para o filme estagnado e por difusão molecular através do filme e nos poros do substrato sólido. **Thibault et al.** (2000) comprovam que o coeficiente de transferência de massa convectivo (k_G) não influencia na transferência de oxigênio em cultivos sobre substratos sólidos.

Bastos (2006) assume a afirmação de **Thibault et al.** (2000) e considera apenas a transferência difusiva de oxigênio através do filme líquido em seu sistema.

Há, no entanto que se fazer a assertiva de que o $K_L a$ deve ser usado com muito cuidado, visto que devido a presença de organismos no filme líquido, os perfis de concentração de oxigênio são fruto da difusão e do consumo.

Doran (1997) mostra que a taxa global de transferência de oxigênio pode ser expressa por:

$$N = K_L a (C^* - C_L) \quad (\text{Equação 2.2})$$

Onde N é a taxa volumétrica de transferência de oxigênio; K_L é o coeficiente de transferência de oxigênio na fase líquida; a é a área interfacial para transferência de O_2 ; C^* é a concentração de O_2 no equilíbrio gás-líquido e C_L é a concentração de O_2 no filme líquido.

A teoria do filme poderá ser aplicada para caracterizar a transferência de oxigênio. O balanço gasoso no biorreator poderá ser usado, segundo **Thibault et al.** (2000), para estimar o $K_L a$, visto que o método dinâmico, aplicado a fermentação submersa não pode ser aplicado.

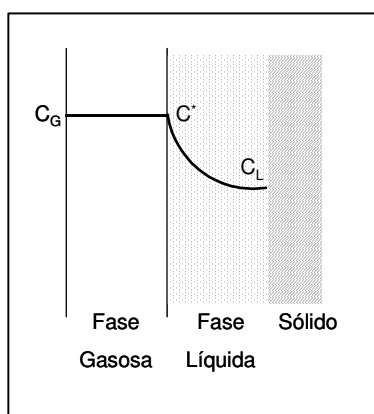


Figura 2.20. Representação geral da teoria do Filme e do transporte de oxigênio em FES.

Considerando a teoria do filme (figura 2.20 e 2.21), e observando a figura que mostra a transferência de oxigênio no sólido poroso intumescido (figura 2.19), podemos mostrar, ou pelo menos supor, a existência de 3 zonas interfaciais que descrevem o sistema em questão.

- 1- gás/líquido em filme externo;
- 2- líquido/líquido na zona de estagnação.

Continuamente, a assertiva desta hipótese assumida é que essas duas regiões 1-2 e 2-3 fazem parte do mesmo conteúdo de líquido disponível à transferência de oxigênio.

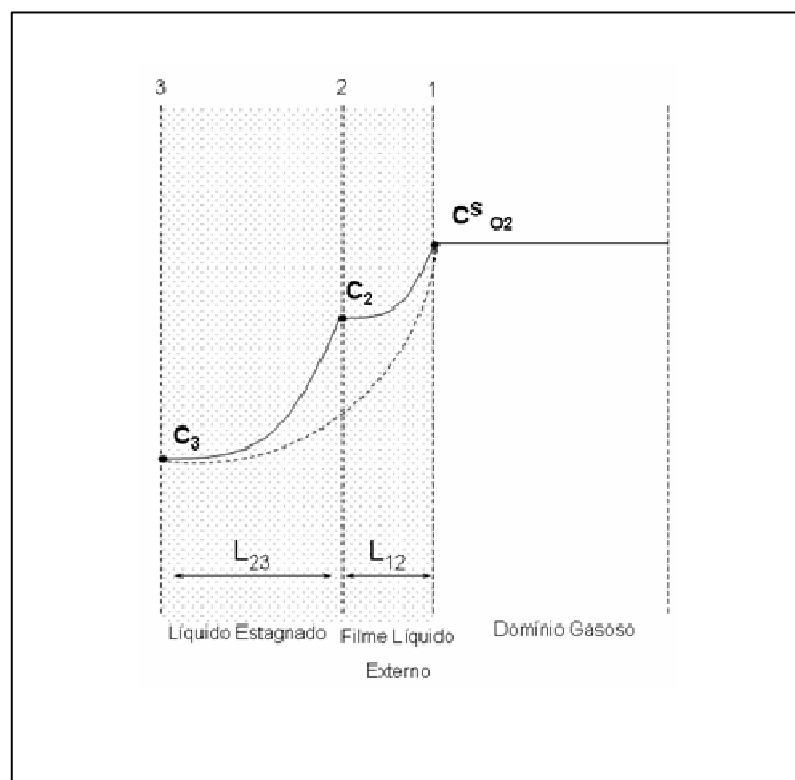


Figura 2.21. Representação geral da teoria do Filme e do Transporte de Oxigênio no sistema mostrado na figura 2.19 .

Onde $C_{O_2}^s$ é a concentração da solubilidade de oxigênio no meio líquido; C_2 é a concentração de oxigênio no filme externo e C_3 é a concentração de oxigênio no interior do sólido intumescido. Há portanto que se destacar a difusão do oxigênio inicialmente no filme líquido externo e a difusão no líquido estagnado no interior do sólido.

Assim, A taxa global de transferência de O_2 nesse caso ficará sendo resultado de uma função direta do coeficiente global de transferência de oxigênio e da diferença entre as concentrações $C_{O_2}^s$ e C_3 .

$$N = K_L a (C_{O_2}^s - C_3) \quad (\text{Equação 2.3})$$

2.7. Separação e Purificação de AH

Os processos de purificação de AH envolvem precipitação com álcoois, assim como era praticado nos procedimentos originais de preparo do ácido hialurônico. Assim, **Laurent** (2002) descreve o procedimento que incluía a precipitação com álcoois ou acetona em uma etapa posterior à de remoção de proteínas por desnaturação ou digestão proteolítica.

John Scott propôs uma importante melhoria quando desenvolveu a precipitação fracionada com uso de detergente catiônico. **Brown et al.** (1998) fazem menção à adição de detergente não iônico SLS (Lauril sulfato de sódio) que agiria na liberação do AH das células. Há também a descrição de uso de um segundo detergente (Brometo de hexadeciltrimetilamônio) não iônico que age na precipitação do AH e o SLS.

Há também reportes na literatura da utilização de acetato e etanol em sobrenadantes das culturas para o isolamento de AH.

Nimrod et al. (1988) descreve o procedimento de separação e pré-purificação de AH a partir de sobrenadante de meio de cultura com a adição de etanol na relação volumétrica de 1,5 volumes de etanol para 1 volume de

sobrenadante. Após a precipitação e centrifugação, **Nimrod** propôs a resolubilização do precipitado com NaCl (0,15 M).

2.8. Caracterização do AH

2.8.1. Caracterização da Concentração e da Massa Molar do AH

A determinação da concentração do AH pode ser feita com uso de métodos cromatográficos. Métodos como cromatografia por exclusão são reportados por **Hasebe** e colaboradores (1999), no entanto, também é comum a utilização de métodos colorimétricos nessa determinação, nesse caso o método do Carbazol é reportado por **Vynios** e colaboradores (2003) para esse fim.

A caracterização do tamanho da molécula de AH pode ser acompanhada por cromatografia por filtração ou permeação em gel (GPC e GFC).

A cromatografia por exclusão em gel é um método de separação cromatográfico baseado no volume hidrodinâmico das substâncias. Seu princípio básico é a partição que as moléculas sofrem, em virtude das diferenças do tamanho das espécies, entre o eluente e o recheio, durante o escoamento por um leito empacotado. (**Kostanski et al.**, 2004)

A fase estacionária, neste método, é constituída de material inerte e apresenta uma distribuição de poros, desse modo, em uma mistura composta por moléculas de variados tamanhos, aquelas que as dimensões são maiores que as dos poros, são excluídas da fase estacionária, sendo eluídas em menor tempo, ao contrário daquelas que têm menores dimensões em relação às dos poros. (**Trathnigg**, 1995)

A cromatografia de exclusão em gel tem uma grande vantagem em relação às demais formas de cromatografia que é a de também poder ser usado como método de fracionamento, além de ser um recurso para obtenção de informações sobre a massa molar e sua distribuição em uma fração polimérica (**Churms**, 1996; **Yao & Lenhoff**, 2004 ; **Sousa**, 2007).

O método mais usado para caracterização da massa molar de frações poliméricas é a eletroforese em gel de poliacrilamida, entretanto, numa faixa de massa molar que esteja abaixo de 1000 Da esta técnica é operada na proximidade do limite de resolução, conforme afirma **Irvine** (1997) e ressalta **Sousa** (2007).

How & Long (1969) e **Caygill** (1971) estudaram a distribuição da massa molar do AH em sistemas cromatográficos em colunas de permeação em gel (GPC) usando géis de ágar. Posterior à publicação dos trabalhos de **How & Long** e **Caygill**, vemos o pioneiro trabalho de **Anadere** e colaboradores (1979) na avaliação da distribuição da massa molar de AH proveniente do fluido sinovial por meio de métodos de caracterização viscométrica.

Sousa (2007) observou o fracionamento de AH em colunas de GPC aquoso proveniente de processos fermentativos.

Através de métodos viscométricos, seguindo a equação de *Mark-Houwink* (Equação 4.1) pode-se estimar valores para a massa molar.

$$\eta = k(M_v)^a \quad (\text{Equação 2.4})$$

Onde η é a viscosidade intrínseca, **k** e **a** são constantes e **M_v** é a massa molar do polímero.

2.8.2. Propriedades Reológicas

2.8.2.1. Viscosidade

Viscosidade de cisalhamento é a propriedade física dos líquidos que os permite resistir ao escoamento. Por ser uma propriedade específica do material, não depende da geometria.

A viscosidade está relacionada com 5 parâmetros independentes, são eles a natureza físico-química da substância, a temperatura, a pressão, a taxa de cisalhamento e o tempo de existência da amostra.

A lei básica que rege o comportamento de um líquido ideal foi descrita por Newton (equação 2.5).

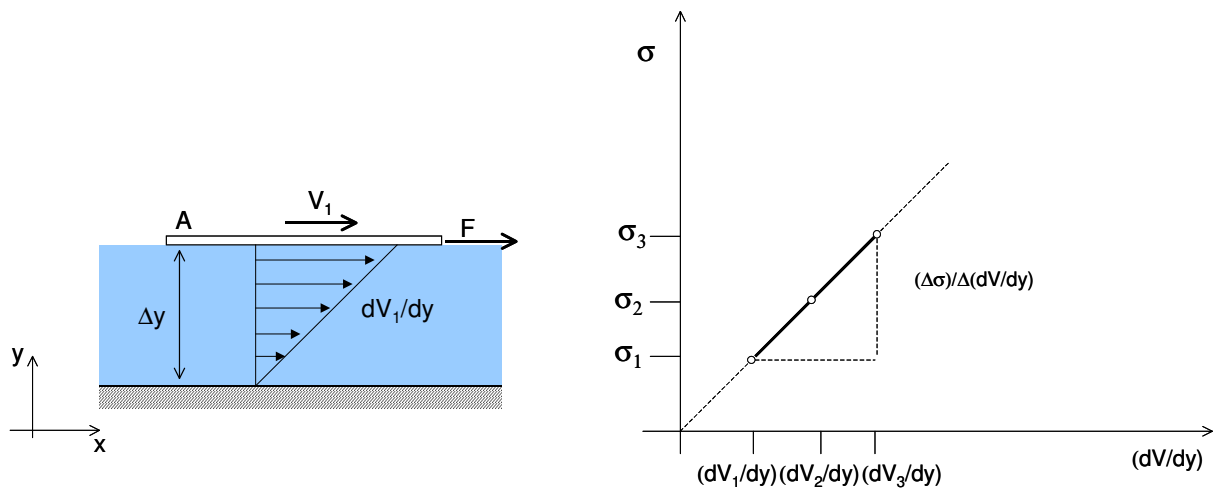


Figura 2. 22 – Representação do comportamento Newtoniano de um Fluido.

$$\sigma = \mu \frac{dV}{dy} \quad (\text{Equação 2.5})$$

Onde μ é a viscosidade cinemática V é a velocidade de escoamento do fluido e y é o seu deslocamento.

Assim, conforme observamos na Figura 2.22, a linha reta partindo da origem pode descrever o comportamento Newtoniano de um fluido (ideal).

Diagramas para o comportamento reológico de fluidos não-Newtonianos são mostrados na Figura 2.23.

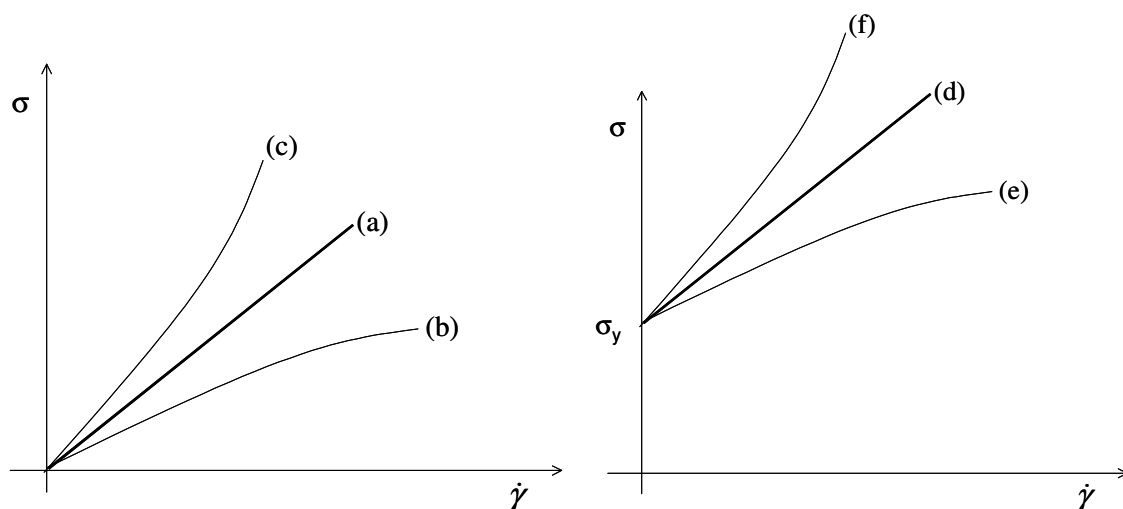


Figura 2.23 – Comportamento de Fluidos não Newtonianos

- (a) Fluido Newtoniano;
- (b) Fluido Pseudopástico;
- (c) Fluido Dilatante;
- (d) Fluido de Bingham;
- (e) Fluido viscoplástico não linear;
- (f) Fluido viscoplástico não linear.

Modelos como o de *Ostwald-Waele* (*power law*), que relaciona a tensão de cisalhamento com a taxa de cisalhamento a partir de dois parâmetros podem ser usados para modelar o comportamento desse grupo de fluidos.

$$\sigma = k \left(\frac{dV}{dy} \right)^n \quad (\text{Equação 2.6})$$

Assim, o parâmetro n (índice de escoamento) indica o quanto a solução desvia do comportamento ideal (Newtoniano).

A Equação 2.6 também é conhecida como modelo de *Herschel-Bulkley*.

Portanto, para $n > 1$ teremos a característica de um fluido dilatante, para $n=1$ teremos um fluido newtoniano e para $n < 1$ teremos comportamento de fluidos pseudoplásticos.

Para modelagem do comportamento de fluidos viscoplásticos, podemos usar as seguintes equações:

- Para fluidos plásticos ou de *Bingham*, (d):

$$\sigma = \sigma_y + \eta_p (\dot{\gamma}) \quad (\text{Equação 2.7})$$

- Para Fluidos viscoplásticos não lineares, (e) e (f):

$$\sigma = \sigma_y + k(\dot{\gamma})^n \quad (\text{Equação 2.8})$$

Considerando os modelos apresentados nas equações anteriores para o comportamento reológico, podemos obter modelos para o comportamento da viscosidade com a taxa de cisalhamento.

Assim, consideremos um grupo de fluidos de comportamento newtoniano:

$$\eta = \frac{\sigma}{(\dot{\gamma})} \quad (\text{Equação 2.9})$$

Para o modelo de Ostwald-Waele:

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} = \frac{k(\dot{\gamma})^n}{(\dot{\gamma})}$$
$$\eta = k(\dot{\gamma})^{n-1} \quad (\text{Equação 2.10})$$

2.8.2.2. Viscoelasticidade Linear

Os líquidos viscosos não possuem forma geométrica definida e escoam irreversivelmente quando submetidos a forças externas. Por outro lado, os sólidos elásticos apresentam forma geométrica bem definida e se deformados pela ação de forças externas, assumem outra forma geométrica de equilíbrio. Muitos materiais, principalmente os de natureza polimérica, apresentam um comportamento mecânico intermediário entre estes dois extremos, evidenciando tanto características viscosas como elásticas e por este motivo, são conhecidos como *viscoelásticos*.

2.8.2.2.1. Modelos Mecânicos

A descrição do comportamento de materiais viscoelásticos é bem mais complexa que a de sólidos perfeitamente elásticos e fluidos com comportamento newtoniano. Em um sólido elástico, a tensão é determinada pela deformação do material em um dado sistema de coordenadas. Assim, em cada ponto do sólido, a tensão no tempo atual é uma grandeza que só depende do valor atual da deformação.

Assim, analogias a sistemas mecânicos (figura 2.24) podem auxiliar a construção de modelos para o comportamento viscoelástico de materiais. As analogias feitas com sistemas mecânicos envolvem dois elementos fundamentais, o elemento *hookeano*, representado por uma mola, que representa o comportamento puramente elástico do corpo, e o elemento *newtoniano*, que representa o comportamento puramente viscoso de um fluido.

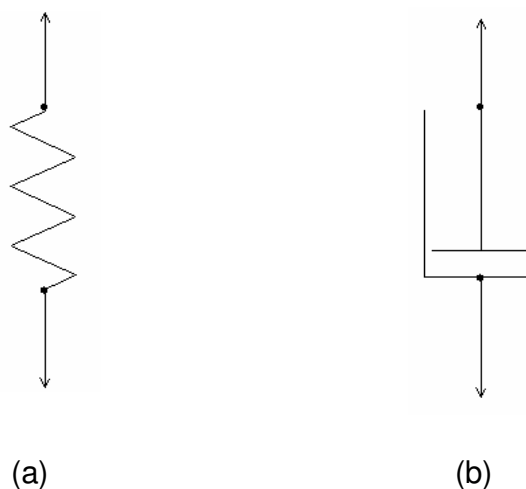


Figura 2.24 – Representação dos elementos mecânicos. (a) Elemento Hookeano, (b) Elemento Newtoniano.

Para o elemento hookeano, que se trata de uma mola e observando o comportamento elástico linear e ideal de um corpo teremos, segundo o postulado de *Hooke*, uma resposta instantânea e linear à aplicação de uma tensão. O que podemos observar pela equação de *Hooke*.

$$\sigma_s = G_s \cdot \gamma_s \quad (\text{Equação 2.11})$$

Onde G é o módulo elástico e representa uma propriedade do material.

Considerando, então, o comportamento puramente elástico dos materiais, conforme a lei de *Hooke*, toda energia que se investe no sistema é armazenada e devolvida.

Para o elemento newtoniano, que é representado por um amortecedor viscoso, observamos que a tensão na deformação por esforços de cisalhamento de um líquido, segundo o postulado de Newton, é diretamente proporcional à taxa de deformação imposta a ele.

$$\sigma_d = \eta_d \cdot \frac{d\gamma_d}{dt} \quad (\text{Equação 2.12})$$

Onde η_d é o coeficiente de viscosidade.

Assim, em um fluido clássico, a tensão em um tempo t é determinada pelos gradientes dos campos de velocidade e densidade calculados nesse mesmo tempo (t) e, ao contrário dos corpos elásticos (modelo da mola de Hooke), a energia empregada na deformação de um corpo viscoso é dissipada. Materiais com natureza viscoelástica se comportam, por sua vez, de maneira diferente, de tal modo que podem estar situados entre os sólidos e os fluídos clássicos.

Considerando essas afirmações, as tensões em tais materiais não são determinadas apenas pelo estado atual de deformação e movimento mas, também, pelas deformações e movimentos passados.

O fato dos materiais viscoelásticos apresentarem características de *memória* faz com que as equações *viscoelásticas* apresentem um aspecto diferente das equações da elasticidade.

A associação entre o modelo hookeano para corpos puramente elásticos e o modelo newtoniano para fluidos puramente viscosos são feitas na abordagem desses sistemas viscoelásticos.

Modelos que fazem uso de associação em série e paralelo dos elementos mecânicos mencionados anteriormente podem simplificar a modelagem desses sistemas.

Modelos como o de *Maxwell*, que propõe a associação entre o elemento hookeano e o elemento newtoniano em série e o modelo de *Kelvin* (ou *Voigt*), que propõe a associação em paralelo para os elementos básicos podem se prestar a essa finalidade.

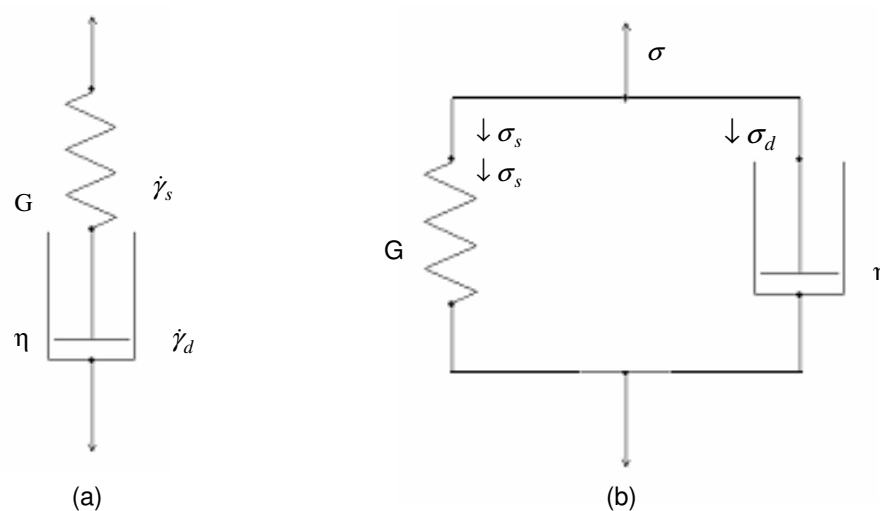


Figura 2.25 – Representação dos elementos mecânicos - analogia a sistemas viscoelásticos. (a) Elemento de Maxwell, (b) Elemento de Kelvin (ou Voigt).

Para o modelo de *Maxwell* (associação em série) teremos:

$$\sigma_s = \sigma_d = \sigma$$

$$\gamma_s + \gamma_d = \gamma$$

Fazendo a diferenciação:

$$\frac{\gamma_s}{dt} + \frac{\gamma_d}{dt} = \frac{\gamma}{dt}$$

e considerando a Equação 2.10 teremos

$$\frac{1}{G_s} \frac{d\sigma_s}{dt} + \frac{\sigma_d}{\eta_d} = \frac{d\gamma}{dt} \quad (\text{Equação 2.13})$$

Sabendo que $\sigma_s = \sigma_d = \sigma$, reescrevemos a Equação 2.12:

$$\frac{1}{G_s} \frac{d\sigma}{dt} + \frac{\sigma}{\eta_d} = \frac{d\gamma}{dt}$$

Multiplicando a equação reescrita por η_d teremos:

$$\frac{\eta_d}{G_s} \frac{d\sigma}{dt} + \sigma = \eta_d \frac{d\gamma}{dt} \quad (\text{Equação 2.14})$$

Onde:

$$\frac{\eta_d}{G_s} = \tau$$

$$\frac{d\sigma}{dt} = \dot{\sigma}$$

$$\frac{d\gamma}{dt} = \dot{\gamma}$$

Desse modo, a Equação 2.13 poderá ser escrita da seguinte forma:

$$\tau \cdot \dot{\sigma} + \sigma = \eta \dot{\gamma} \quad (\text{Equação 2.14})$$

A Equação 2.14 representa o modelo de Maxwell.

Assim, para $\dot{\sigma} = 0$, o modelo fica resumido à Equação 2.15, que é o modelo de um fluido newtoniano.

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} \quad (\text{Equação 2.16})$$

Fazendo a mesma analogia para o modelo de *Kelvin (Voigt)* teremos:

$$\sigma_s + \sigma_d = \sigma$$

$$\gamma_s = \gamma_d = \gamma$$

Considerando as equações:

$$\sigma_s = G_s \cdot \gamma_s \quad (\text{Equação 2.17})$$

$$\sigma_d = \eta_d \cdot \frac{d\gamma_d}{dt} \quad (\text{Equação 2.18})$$

$$\sigma_s + \sigma_d = \sigma$$

$$G_s \cdot \gamma_s + \eta_d \cdot \frac{d\gamma_d}{dt}$$

e com base em:

$$\gamma_s = \gamma_d = \gamma$$

Podemos obter a Equação 2.15:

$$\sigma = G_s \cdot \gamma + \eta_d \cdot \frac{d\gamma}{dt} \quad (\text{Equação 2.19})$$

Que reescrita é o modelo de Kelvin (Voigt):

$$\sigma = G \cdot \gamma + \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{Equação 2.20})$$

Assim, quando $\dot{\gamma} = 0$, teremos o modelo resumido à equação 2.17, que é o modelo para um sólido hookeano.

$$\sigma = G \cdot \gamma \quad (\text{Equação 2.21})$$

2.9. Aplicações do AH

A elevada capacidade de retenção de água e o comportamento viscoelástico dá um perfil peculiar ao AH, o tornando apropriado para várias aplicações médicas e farmacêuticas.

A retenção de água, por exemplo, é uma propriedade explorada pela indústria de cosméticos na elaboração de produtos de rejuvenescimento. Assim, os efeitos da idade sobre a pele, em parte causados pela degradação desse polímero, podem ser amenizados com uso dessas terapias a base de AH (**Asari & Miyauchi**, 2000).

As aplicações médicas mais significativas do AH são nas áreas de oftalmologia, ortopedia e cicatrização de feridas. No entanto, nos últimos anos, vêm se estudando o seu uso na liberação controlada de fármacos.

Durante muitos anos, usou-se em cirurgias oftálmicas soluções de AH em alto grau de pureza como meio suporte.

O primeiro produto à base de AH a entrar no mercado foi o *Healon®* da *Parmacia* [hoje Pfizer, N.Y.], em 1979. O uso do *Healon®* era voltado para cirurgias oftálmicas como cirurgia de catarata, implantes de córneas e cirurgia de glaucoma (**Chong et al.**, 2004).

Asari (2004) classifica o AH de acordo com três grandes grupos de aplicações médicas, aplicações que exploram as suas características físico-químicas, nas aplicações que se baseiam nas funções biológicas da célula e as aplicações que exploram ambas as características.

Existem diversos reportes sobre as aplicações médicas do AH, no entanto, somente um pequeno número destas têm sido postas em prática (**Asari**, 2004).

Assari apresenta as aplicações do AH com base em suas propriedades viscoelásticas como: cirurgia de catarata e ressecção endoscópica da mucosa, àquelas relacionadas com as funções biológicas celulares como as aplicações de oligossacarídeos de AH em tumores e as aplicações que envolvem as duas características como tratamento da osteoartrite, engenharia de tecidos, cicatrização de feridas e usos em condutas pós-operatórias para evitar adesão.

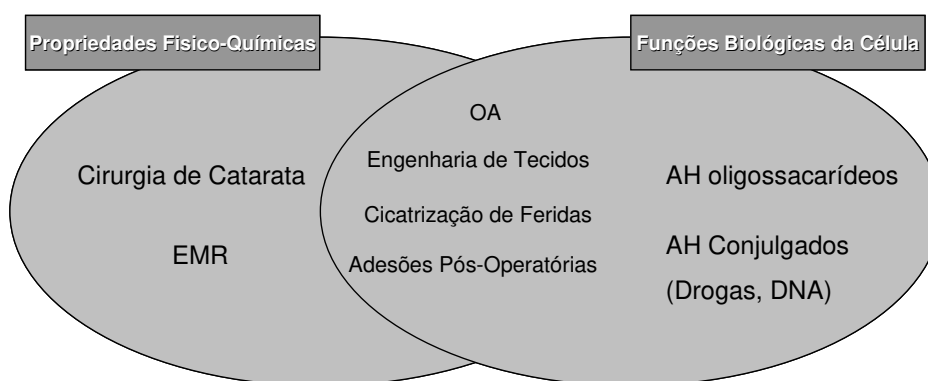


Figura 2. 26 – Três tipos de aplicações médicas do AH (adaptado de Asari, 2004)

2.9.1. Cirurgia de Catarata

Catarata é uma doença que conduz à perda da transparência do cristalino no olho (opacidade). Nesta cirurgia, o potencial para ferimento de tecidos intraoculares frágeis, em especial aqueles da camada endotelial da córnea, é grande. Assim, o uso de AH nesses procedimentos cirúrgicos como substância viscoelástica, protegeriam a camada endotelial evitando assim que se formem áreas feridas e um futuro edema .

Na cirurgia de catarata, portanto, os materiais viscoelásticos são empregados para manter o espaço operativo e proteger a camada endotelial da córnea ou outros tecidos dos danos físicos (**Asari**, 2004).

Pharmacia & Upjohn Ltd. Desenvolveram um produto comercial de hialuronato de sódio, o primeiro a chegar ao mercado no mundo, *Healon®* para usos em procedimentos cirúrgicos oftálmicos. O desenvolvimento de *Healon®* permitiu a execução segura da difícil cirurgia de catarata, reduzindo lesões e ferimentos à camada endotelial da córnea.

Tabela 2.3. - Exemplos de AH comercial Usados em oftalmologia

Nome Comercial	Massa Molar (Da)	Fabricante
Opegan®	600.000-1.200.000	Seikagaku (Japão)
OpeganHi®	1.900.000-3.900.000	Seikagaku (Japão)
Healon®	1.900.000-3.900.000	Pharmacia-Upjohn (Suécia)
Opelead®	1.530.000-2.130.000	Shiseido (Japão)

(adaptado de Asari & Miyauchi, 2000)

2.9.2. Ressecção Endoscópica da Mucosa (EMR)

A EMR é um método usual para excisão de não polipoides e lesões na membrana mucosa, sendo também um método efetivo e minimamente invasivo de tratamento. (**Asari**, 2004)

Yamamoto et al. (2001) reportam o uso de injeções submucosa de AH em EMR na tentativa de reduzir o risco de perfuração e realizar uma completa ressecção.

2.9.3. Efeitos de Oligossacarídeos de AH em Tumores

Vários estudos tem demonstrado que AH exerce uma importante função em tumores malignos. **Toole et al.** (1996) mostrou que perturbações nas interações entre o AH endógeno e células tumorais podem inibir o crescimento de tumores *in vivo*. Além disso, reportam também que perturbações nessas interações promovidas por oligossacarídeos de AH (aproximadamente 2, 5 kDa) também inibem o crescimento desses tumores *in vivo*.

2.9.4. Tratamento da Osteoartrose (OA)

A osteoartrose (OA) é uma moléstia crônica, que apresenta como produto final a degradação tissular cartilaginosa, levando a freqüente incapacidade articular, com perda da qualidade de vida, em pessoas em idade produtiva. Para seu tratamento há muitas dificuldades e não há agente curativo conhecido. Dessa forma, representa um desafio encontrar a melhor maneira de prevenir e/ou tratar esta que é a mais comum das doenças reumáticas. (**Fernandez et al.**, 1997)

Sob a forma de hialuronato sódico, o ácido hialurônico tem efeito benéfico na terapia de osteoartrose. Acredita-se que cubra e lubrifique as superfícies articulares, de modo a prevenir a perda de proteoglicanos a partir da matriz cartilaginosa e aumenta a produção, pelas células sinoviais, de ácido hialurônico ou hialuronato.

A aplicação do termo *viscossuplementação* tem sido, geralmente, usado para descrever o efeito do ácido hialurônico, de alto peso molecular, injetado na articulação com osteoartrose.

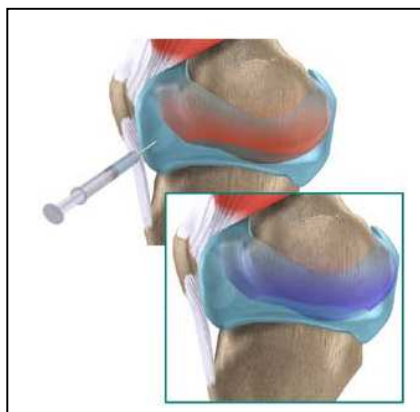


Figura 2. 27 - Injeção de AH no tratamento de OA do joelho

Fernandez et al., (1997) mencionam que, quando comparado às articulações normais, as articulações artrósicas contêm concentrações menores de ácido hialurônico (0,8 a 2mg/ml *versus* 2,5 a 3,5mg/ml) e de menor peso molecular (0,5 a 4 megadaltons *versus* 4 a 5 megadaltons).

Preparações diversas de AH em alto peso molecular foram testadas e avaliadas no Japão, Itália e Alemanha. **Asari & Miyauchi** (2000) mencionam que

em 1998, aproximadamente 2 milhões de pacientes receberam hialuronato de sódio no tratamento dessa doença.

Tabela 2.4. - Exemplos de AH comercial Usados no tratamento de OA

Nome Comercial	Massa Molar (Da)	Fabricante
Artz®	600.000-1.200.000	Seikagaku (Japan)
Hyalgan®	500.000-730.000	Fidia (Italy)
Synvisc®	AH (<i>cross-linked</i>)	Biomatrix (USA)

(adaptado de Asari & Miyauchi, 2000)

2.9.5. Engenharia de Tecidos

AH é abundante na matriz extracelular de tecidos jovens. O AH proporciona um ambiente semelhante ao fetal para cultura de células, estimulando assim a regeneração. Mais ainda, o AH está implicado na morfogênese, exercendo importante função na organização dos tecidos. Essa característica fazem do AH aplicável à engenharia de tecidos e cicatrização de ferimentos, que estão estreitamente relacionadas. (Asari, 2004)

2.8.6. Tratamento de Feridas e Queimaduras

A cicatrização das feridas é uma resposta complexa e organizada do organismo à lesão dos tecidos com perda da sua integridade. Nas feridas abertas, que cicatrizarão por segunda intenção, como as queimaduras, vários fatores entram em ação, contribuindo invariavelmente para prolongar a cura das lesões, resultando, quase sempre em inflamação, edema e cicatrizes hipertróficas e antiestéticas. Assim, várias condutas terapêuticas têm sido empregadas com o objetivo de conseguir um resultado aceitável no tratamento das queimaduras.

Condutas terapêuticas que envolvem a aplicação de AH são apoiadas na idéia de que cicatrizes fetais evoluem mais rapidamente, sem contração, sem deixar marcas e apresentando um padrão de colágeno mais organizado do que o encontrado no adulto, o que se deve às altas concentrações de ácido hialurônico na matriz extracelular do tecido em cicatrização. (**Medeiros et al.**, 1999). Assim, a hipótese de que a concentração de AH venha a auxiliar na cicatrização de lesões tem sendo alvo de diversos estudos no mundo inteiro.

Estudos de **Medeiros** (1999) e colaboradores, com AH para tratamento de queimaduras em dorso de ratos, mostram que a aplicação do AH tópico contribui para acelerar o tempo de cicatrização, além de apresentar uma melhor evolução histológica e melhor resultado estético no grupo tratado com esse glicosaminoglicano.

Na busca por levar ao mercado produtos que se prestem ao tratamento de ferimentos e queimaduras a *Fidia Advanced Biopolymers* desenvolveu materiais biocompatíveis à base de AH dispostos à essas condutas terapêuticas na regeneração e epitelização de lesões como queimaduras e feridas. Por modificação química o ácido hialurônico, que na natureza é presente como um gel, pode transformar-se em um biomaterial processável, podendo ser transformado em fibras, membranas, microesferas e matrizes tridimensionais aplicáveis à tal finalidade.

2.9.7. Adesões Pós-Operatórias

Adesões pós-operatórias representam uma significativa complicação em cirurgias abdominais. Hialuronato de sódio e membranas de carboximetilcelulose, bem como hidrogéis de AH (*cross-linked*) têm sido usados para reduzir adesões pós-operatórias. Na maior parte desses estudos, esses derivados do AH foram usados como uma barreira física. (**Asari**, 2004)

Teoricamente, significa que é possível reduzir a formação de adesões pelos seguintes etapas:

- Reduzindo a reação de inflamação inicial e subsequente secreção;
- Inibição da coagulação desta secreção;
- Promovendo a remoção de fibrina depositada;
- Inibindo a proliferação de fibroblastos.

Conforme **Asari** (2004), citando **Weigel et al.** (1989), o mecanismo sugerido para os efeitos dos derivados do AH podem ser devidos à ligação entre AH e fibrina e fibrogênio, previnindo a ação da fibrina como uma cola na formação de adesão.

2.9.8. Medicina Estética

É cada vez mais comum o uso de substâncias que amenizem os efeitos causados pelo tempo na pele. Assim, formulações cosméticas que promovam o restabelecimento das características de uma pele jovem têm sido propostas por inúmeras indústrias.

Brown et al.(1994) descreveram que a formulação de cosméticos contém frações de hialuronato de sódio, geralmente, procedentes de crista de galo.

Balazs (2004) mencionou a utilização do AH para preenchimento facial como tratamento efetivo anti-rugas.

CAPÍTULO 3

Material e Métodos

Este capítulo apresenta o material e a metodologia usados nos experimentos, o procedimento analítico usado na caracterização da fermentação e do produto obtido. Como metodologia usada na fermentação, este capítulo traz a descrição detalhada de todas as etapas do processo, desde a manutenção da cultura até a separação do AH produzido. Como metodologia analítica, este capítulo traz todas as rotinas de análises e seus métodos de calibração e validação empregadas para caracterizar o conteúdo de substrato, de biomassa bacteriana e AH na fermentação.

3.1. Produção de Ácido Hialurônico

3.1.1. Microrganismo

Foi utilizada, nesse trabalho, a cepa de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920, pertencente ao grupo C de Lancefeld (ATCC 39920), selecionada previamente por **Ogrodowski** (2002) e testada por **Oliveira** (2004) na produção de AH em substrato de suco de caju. A cepa nativa foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC) na forma de cultura liofilizada e depositada na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI).

3.1.2. Manutenção da Cultura

O conteúdo das ampolas, obtidas da *American Type Culture Collection*, foi hidratado em água estéril, seguido de plaqueamento em meio *TSA* (*Trypticase Soy Agar*) e incubação por 24 horas a 37°C. Para preparação do estoque de culturas ultracongeladas, as colônias foram transferidas para tubos contendo solução de glicerol 10% e a suspensão de células obtida foi distribuída em criotubos, cada um contendo 1 mL da suspensão. Os criotubos foram armazenados a -20°C por 20 minutos e, em seguida, transferidos para ultrafreezer a -80°C onde foram preservados. Os criotubos obtidos neste procedimento foram denominados primeira geração da cultura.

Um segundo estoque de criotubos foi preparado a partir da primeira geração da cultura. Para tanto, um criotubo da primeira geração foi descongelado e a suspensão de células estriada em placas de ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) contendo 5% (v/v) sangue de carneiro desfibrinado. As placas foram incubadas por 24h a 37°C e os procedimentos subseqüentes para preparação dos criotubos foram os mesmos descritos anteriormente para a primeira geração. O segundo estoque de criotubos foi denominado segunda geração da cultura.

Neste trabalho foram empregadas culturas propagadas a partir da segunda geração. O conteúdo do criotubo foi descongelado e estriado em placas de ágar BHI, as quais foram incubadas por 24 horas a 37°C. Todas as etapas descritas acima foram realizadas pela Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) sendo, portanto, a cultura fornecida em placa de ágar BHI.

Para manutenção da cultura enviada pela CBMAI, as placas foram armazenadas a 4°C e repiques em placas de ágar BHI realizados a cada 45 dias. Com o intuito de garantir a viabilidade da cultura, definiu-se um número máximo de três repiques a partir da placa enviada pela coleção, assim como a realização de apenas três repiques de cada criotubo da segunda geração.

3.1.3. Obtenção do Substrato da Fermentação Submersa

3.1.3.1. Caju (*Anacardium occidentale* L.)

O caju utilizado neste trabalho foi adquirido em feira livre no município de Campinas, no estado de São Paulo no período de safra dos anos de 2005-2006.

Os caju foram adquiridos sempre do mesmo fornecedor e todos os lotes (embalagens com 350g) utilizados foram da marca comercial **CAJU GAIA** (*Itaueira Agropecuária S/A*), oriundos da fazenda Córrego Grande, Russas, Ceará.

O teor médio dos principais componentes físico-químicos do caju são apresentados na tabela 3.1, conforme apresenta **Soares** (1986) com base nos trabalhos de **Fé et al.** (1972), **Maia & Soares** (1970) e **Soares & Maia** (1970).

Tabela 3.1. teor médio dos principais componentes físico-químicos do suco de caju

Componentes	Valores Médios
Açúcares Redutores	8,0 %
Vitamina C	261 mg/100mL
Acidez total (em ácido cítrico)	0,35 %
Sólidos Solúveis (°Brix)	10,7
Tanino	0,35%
Cálcio	17,70 mg/100g
Fósforo (P ₂ O ₅)	32,55 mg/100g
Umidade	86,3 %
pH	3,9

Soares (1986)

3.1.3.2. Extração do Suco de Caju

A extração do suco de caju foi feita com auxílio de uma prensa mecânica por prensagem do pedúnclo do caju devidamente lavado. O sistema de prensagem foi adaptado com uma prensa mecânica conforme mostra a Figura 3.1. e um vaso de prensagem com orifício para recolhimento do suco por gravidade.



Figura 3.1. Sistema de prensagem usado para extração do suco de Caju.

3.1.3.3. Filtração do Suco

Após a extração do suco, procedeu-se uma filtração com o intuito de reduzir a carga sólida presente no líquido. A filtração foi conduzida em um sistema com um funil de *Büchner* (com filtro de papel) acoplado a um frasco *Kitassato* em um sistema de filtração com vácuo.

3.1.3.4. Clarificação do Suco de Caju

A Clarificação do suco de caju foi feita com base na metodologia proposta por **Cianci et al.** (2005) para processos com membranas, com algumas adaptações às condições disponíveis.

O suco, após prensagem e separação do conteúdo sólido em uma filtração prévia, foi levado ao sistema de microfiltração em membranas tubulares em cerâmica com tamanho de poro de 0,2 μm em processo conduzido à temperatura de 30°C e pressão de 220 kPa. O suco Clarificado permeado na microfiltração foi usado como substrato da fermentação submersa.



Figura 3.2. Sistema de Microfiltração Usado para Clarificar o suco de Caju.

3.1.3.4.1. Cálculo do Fluxo Permeado

O fluxo permeado foi calculado de acordo com a equação 3.1., obtendo-se, para o ensaio uma curva de fluxo permeado ao longo do tempo de processamento.

$$J = \frac{m_p}{t \cdot A_p} \quad (\text{Equação 3.1.})$$

Onde m_p é a massa de permeado, t é o tempo e A_p é a área total de permeação.

Duas maneiras foram usadas para calcular o fluxo permeado:

- *Fluxo Pontual* (J_p), calculado pela massa de permeado recolhida no intervalo entre duas leituras;
- *Fluxo Acumulado* (J_a), calculado pela massa total de permeado recolhida sobre o tempo total.

3.1.3.4.2. Cálculo das Resistências

A resistência da membrana (R_m) foi calculada usando a equação 3.2., passando água filtrada pela membrana limpa.

$$J_w = \frac{P_t}{\mu_w \cdot R_m} \quad (\text{Equação 3.2.})$$

Onde J_w é o fluxo de água permeado, P_t é a pressão transmembrana e μ_w é a viscosidade da água.

A resistência devido ao Fouling (R_f) foi determinada pela equação 3.3.

$$R_f = \frac{P_t}{\mu_w + J_w} - R_m \quad (\text{Equação 3.3.})$$

Onde J_w' é o fluxo de água permeada pela membrana após a limpeza com água, P_t é a pressão transmembrana e μ_w é a viscosidade da água.

3.1.3.5. Meio de Propagação e Fermentação

Para preparação do inóculo foi realizado um novo repique da cultura em placa de ágar BHI, utilizando-se as mesmas condições de incubação descritas. As colônias obtidas foram transferidas para o meio empregado na fermentação em frascos Erlenmeyer. Após 12 horas de incubação a 37°C e agitação de 150 rpm.

O meio de propagação e de fermentação descrito e estudado, inicialmente, no trabalho de **Oliveira** (2004) foi usado neste trabalho. Como ponto de partida dos ensaios feitos preliminarmente foi usada também a mesma metodologia de preparo e ao longo dos experimentos foi proposta uma nova metodologia de preparo para os meios.

Oliveira (2004) observa resultados satisfatórios com o meio para propagação e fermentação de suco de caju suplementado com extrato de levedura (fonte de nitrogênio) e sais. A composição original, proposta por **Oliveira** (2004),

que tem como base a composição proposta por **Swann et al.** (1990), é apresentada na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Suplementação do Suco de Caju usado como substrato na fermentação (adaptada de **Swann et al.**, 1990)

Componente	Concentração
Extrato de levedura	60 g. L ⁻¹
K ₂ SO ₄	1,3 g. L ⁻¹
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1 g. L ⁻¹
Na ₂ SO ₄ . 12H ₂ O	0,2 g. L ⁻¹
CaCl ₂ . 2H ₂ O	5 mg.L ⁻¹
FeSO ₄ . 7H ₂ O	5 mg.L ⁻¹
MnSO ₄ . 4H ₂ O	1mg.L ⁻¹
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1*
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,1*

Após ser preparado, o meio foi esterilizado e posteriormente usado para a inoculação.

A esterilização do meio, inicialmente proposta por **Oliveira** (2004) foi feita através de calor úmido, por autoclavagem dos frascos contendo os meios de propagação e fermentação já preparados. Porém, uma modificação foi feita neste trabalho, nesta etapa a esterilização foi feita por filtração em ambiente estéril. Para tal operação, o aparato de filtração foi montado na capela de fluxo laminar, previamente limpa com solução de álcool (70% v/v). O aparato ficou exposto à radiação ultravioleta por 50 minutos para garantir a esterilidade de todo o aparato. Dentro da capela, com a luz U.V. (germicida) ligada, conduziu-se a filtração do meio de propagação e fermentação previamente preparados. Na filtração utilizou-se uma membrana de acetato de celulose 0,2 µm.

3.1.4. Padronização do Inóculo da Fermentação

O objetivo desse ensaio foi padronizar a metodologia de preparo do inóculo usado na fermentação, determinando o tempo de propagação em meio de suco de caju suplementado com extrato de levedura.

Esse ensaio foi feito em duas etapas distintas. Na primeira etapa investigou-se a forma de repique e pré-cultivo da cepa de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920. Partindo de tratamentos distintos para pré-cultivo em placas, meio de propagação e fermentação, obteve-se resultados usados para determinar o melhor meio de pré-cultivo e de propagação. Manteve-se o meio de fermentação como sendo o mesmo apresentado no item 3.1.3.5. Os tratamentos usados nesse ensaio são descritos na tabela 3.3.

Tabela 3.3. Tratamentos usados no experimento de adequação do pré-cultivo e propagação da cepa *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920.

Tratamento	Pré-Cultivo	Inóculo	Meio de Fermentação
1	TSA	SUCO	SUCO
2	BHI	SUCO	SUCO
3	BHI	BHI	SUCO

Foram feitos 3 tratamentos para o pré-cultivo, cada tratamento recebeu um código numérico (1,2 e 3). A tabela 3.3 apresenta a descrição de cada tratamento.

Assim, no tratamento 1, o pré-cultivo foi feito em TSA (*Trypticase Soy Agar*), no tratamento 2 e 3, o pré-cultivo foi feito em BHI (*Brain Heart Infusion*). O inóculo foi preparado com suco de caju suplementado com extrato de leveduras e sais, segundo está descrito em 3.1.3.5., para os tratamentos 1 e 2. No Tratamento 3, o inóculo foi preparado em meio BHI (*Brain Heart Infusion*).

O meio BHI foi preparado, seguindo o modo de preparo recomendado pelo fabricante, dissolvendo-se 37 g do pó para 1 litro de água destilada e esterilizando em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Para cada tratamento, nesse ensaio, fez-se duplicatas na fermentação e triplicatas nas análises.

Na segunda etapa fez-se a investigação do tempo de adaptação da cultura no meio de propagação em estudo cinético para o crescimento celular. O objetivo dessa etapa foi determinar o tempo de preparo do inóculo.

O estudo cinético na propagação da cultura pré-cultivada, foi feito em 7 frascos de *Erlenmeyer* (100 mL), com 50 mL de meio de propagação descrito no item 3.1.3.5.

A propagação foi feita sob condições de agitação e temperatura controladas (150 RPM e 37°C) em agitador recíproco.

Fez-se retiradas dos frascos ao longo do tempo, para que se pudesse determinar o comportamento cinético.

As análises foram feitas em triplicata.

3.1.5. Ensaio de Fermentação Submersa

3.1.5.1. Ensaio em Frascos de Erlenmeyer

O objetivo desses ensaios foi avaliar a produção de ácido hialurônico em ausência de aeração forçada.

Os frascos foram, inicialmente, esterilizados com água em autoclave por 20 minutos a 121°C . A água foi descartada e o frasco foi preenchido com meio estéril.

Para preparo do inóculo (propagação da cultura) padronizou-se a transferência de 3 alçadas da cultura original deixando-se crescer no meio de propagação em frasco de *Erlenmeyer* em agitador recíproco sob a temperatura de 37°C e uma agitação constante de 150 rpm. A determinação do tempo de propagação foi feita, preliminarmente, com uma cinética de crescimento e padronização da cultura e foi encontrada como 12 horas, quando as células estão em fase de crescimento exponencial.

A fermentação é iniciada no tempo final de propagação (crescimento do inóculo), que é adicionado ao meio na proporção de 10 % em razão volumétrica entre o inóculo e o meio de fermentação estéril, conforme metodologia proposta por **Oliveira** (2004).

O processo fermentativo foi conduzido durante 24 horas seguintes à inoculação sob agitação (150 rpm) e temperatura controlada (37°C).

Ensaio cinéticos foram feitos usando vários frascos de Erlenmeyer e procedendo-se retiradas ao longo do tempo de fermentação.

Para cada frasco, fez-se as análises necessárias à caracterização do produto e da fermentação. Todas as análises foram feitas seguindo o mesmo critério analítico e com réplicas (triplicatas) para cada leitura e/ou determinação.

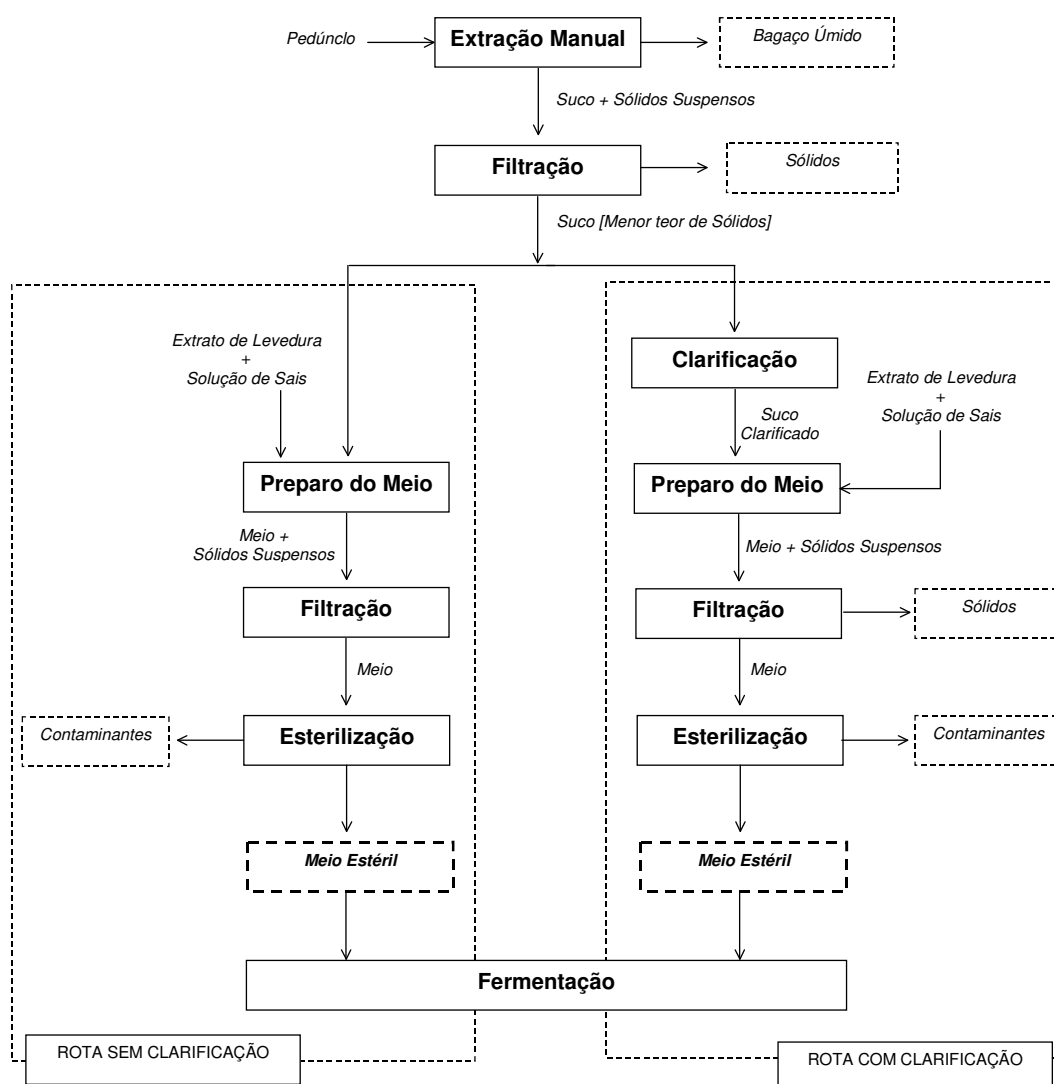


Figura 3.3. Fluxograma ilustrativo das rotas de preparo do meio de propagação e fermentação com clarificação do suco e sem clarificação do suco.

3.1.5.2. Ensaios em Reator BIOFLO III®

O objetivo destes ensaios foi avaliar a produção de AH em sistemas providos de aeração e agitação.

O preparo do inóculo seguiu a padronização apresentada no item 3.1.5.1. deste capítulo.

É, também, iniciada a fermentação após o tempo de preparo do inóculo, transferindo-se o volume obtido para o biorreator (figura 3. 4) do tipo BIOFLOIII® (*New Brunswick Co., USA*).

As condições impostas ao processo foram: aeração constante de 2 volumes de oxigênio para cada volume de meio, agitação constante de 250 rpm, temperatura de 37 °C.

O sistema reacional é provido de uma unidade de aquisição de dados e um sistema de monitoramento e controle.

Amostras foram coletadas ao longo do experimento para que fossem feitas as quantificações.

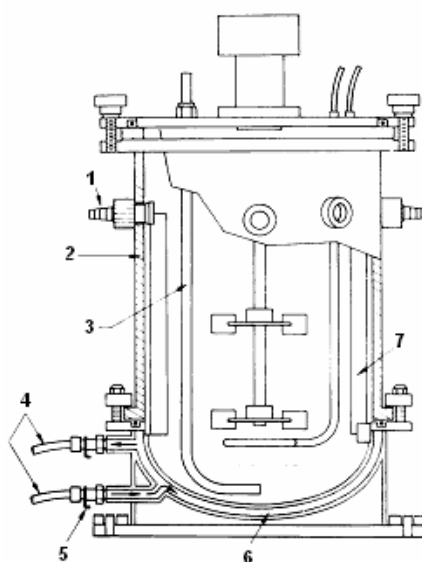


Figura 3.4. Reator tipo BIOFLO III

O reator usado nesta etapa dos experimentos (BIOFLOIII) consiste em uma cuba reacional de vidro (2), provida de um sistema de alimentação de ar por meio de um dispersor de bolhas simples, em forma de um tubo perfurado (3). Acoplado à cuba há um trocador de calor em forma de calota esférica na região inferior do vaso de vidro (6), que, por sua vez, é alimentado com água através da entrada no trocador. Internamente, há um sistema de chicanas para reduzir os efeitos de vórtice e aumentar a turbulência promovida pela agitação feita por uma haste ligada ao rotor que transfere *momentum* a um par de impelidores do tipo turbina de 6 pás. A coleta de amostras é feita por um coletor lateral. Todo o sistema foi autoclavado, incluindo o conjunto de sensores (autoclaváveis).

3.1.5.3. Ensaios de Fermentação Semi-Sólida

3.1.5.3.1. Preparo do Substrato/Suporte

Após prensagem do caju para obtenção do suco, separou-se o bagaço úmido. A fim de tratar previamente o bagaço que foi levado à fermentação semi-sólida, fez-se uma branda deumidificação em vácuo. Esta operação foi realizada com o objetivo de retirar a água residual do bagaço, reduzindo o teor de umidade no suporte sólido.

Após a branda deumidificação fez-se uma maceração seguida de pesagem do bagaço. Levou-se, então, à esterilização feita sob exposição de luz ultravioleta em capela de fluxo laminar.

3.1.5.3.2. Preparo do Inóculo

O inóculo foi preparado seguindo a metodologia descrita anteriormente para o preparo do inóculo nos ensaios de fermentação submersa.

3.1.5.3.3. Inoculação

A inoculação foi feita adicionando-se o inóculo e meio nutriente, composto por suco de caju suplementado com extrato de leveduras e sais, conforme

descrição feita no item 3.1.3. 4 (tabela 3.1) deste capítulo. A proporção da adição foi 0,5 mL da solução de Inóculo e meio nutriente para cada 1 g de bagaço na coluna.

A Homogeneização do inóculo no suporte foi feita dentro de sacos de polipropileno estéreis.

3.1.5.3.4. Empacotamento da Coluna

As colunas, previamente esterilizadas em autoclave, foram empacotadas com 14 g de bagaço devidamente inoculado e homogeneizado, como descrito anteriormente.

O leito fixo contendo a massa de bagaço foi empacotado com altura de 3 cm, conforme condições otimizadas por **Bastos** (2006) para transferência de oxigênio.

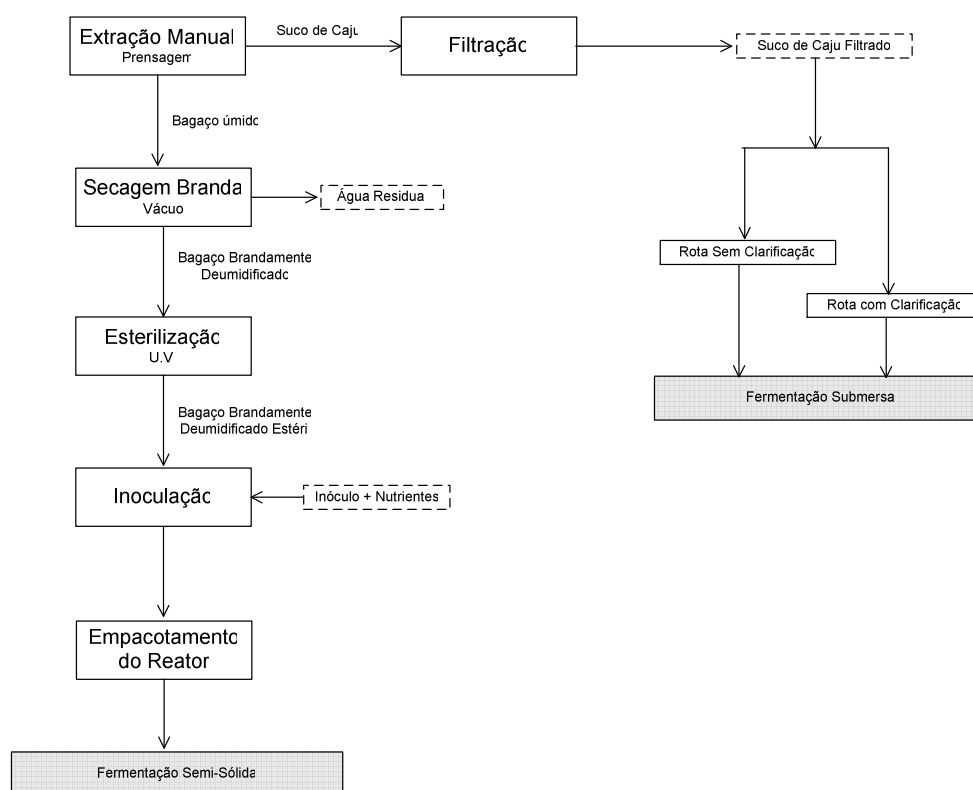


Figura 3.5. Fluxograma de operações na fermentação Submersa e Semi-sólida

3.1.5.3.5. Sistema de Colunas de Leito Fixo e Condições Operacionais

As fermentações em estado sólido foram conduzidas em um sistema de colunas de leito fixo (colunas de *Raimbault*). O sistema é composto por 6 colunas de vidro cilíndricas acopladas a um umidificador de ar na entrada da coluna. A alimentação de ar se dá através de um compressor. A vazão de ar na entrada da coluna foi ajustada para 0,4 L/min com uso de um rotâmetro.

Para avaliação da concentração de oxigênio na saída fez-se uso de um oxímetro *YSI® Model 5300* devidamente calibrado e tomando-se medidas de oxigênio na saída da coluna.

Para manutenção da temperatura, as colunas foram acondicionadas dentro de uma estufa microbiológica. Com um termopar dentro da coluna fez-se o controle da temperatura dentro da coluna. A temperatura operacional foi a mesma usada no cultivo submerso (37 °C).

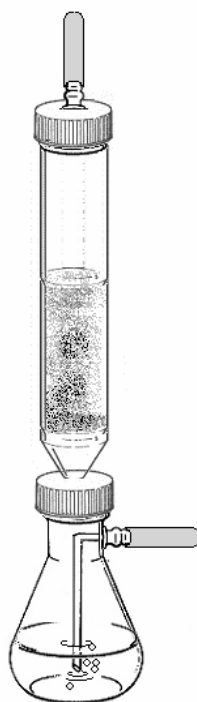


Figura 3.6. Sistema de Coluna de *Raimbault* de leito fixo

3.1.5.3.6. Extração dos Produtos obtidos na FSS

Os produtos foram extraídos do meio de fermentação através de lixiviação em meio sólido. Para esta operação, o conteúdo sólido foi retirado cuidadosamente da coluna e colocado em frascos de Erlenmeyer. Adicionou-se água (20 mL) e agitou-se continuamente em agitador recíproco por 3 horas. O conteúdo líquido foi separado sendo este o extrato bruto obtido da lixiviação em meio sólido.

3.2. Recuperação do Ácido Hialurônico Produzido por Fermentação Submersa

A separação do AH do caldo de fermentação livre de células foi feita por precipitação com etanol, adaptada de **Nimrod** e colaboradores (1988).

O caldo foi inicialmente centrifugado a 3200 rpm por 20 min para a remoção das células. Ao meio livre de células, obtido da primeira centrifugação, adicionou-se 1,5 volumes de etanol para cada 1,0 volume do meio (livre de células), refrigerando-se a solução a 4°C durante 1 hora sob vigorosa agitação (em agitador recíproco) para a precipitação do AH. O precipitado foi recuperado por centrifugação (3200 rpm, 20 min), o etanol impuro sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 20 ml de solução 0,15 M de cloreto de sódio (NaCl). Ao volume da primeira ressusensão do AH adicionou-se etanol (a 4°C) na mesma proporção da primeira adição (1,5:1,0), procedendo-se da mesma maneira em relação à primeira precipitação. Após a segunda precipitação do AH, centrifugou-se para recuperação do precipitado, descartando o etanol impuro. À massa recuperada da segunda centrifugação adicionou-se NaCl (0,15M) para ressusensão do AH, seguido, após a ressusensão de toda a massa, da adição do etanol (a 4°C), procedendo-se a terceira precipitação, seguida de uma quarta centrifugação e uma terceira ressusensão com NaCl (0,15 M).

O produto obtido na última (terceira) ressusensão é o AH recuperado do meio de fermentação (figura 3.7)

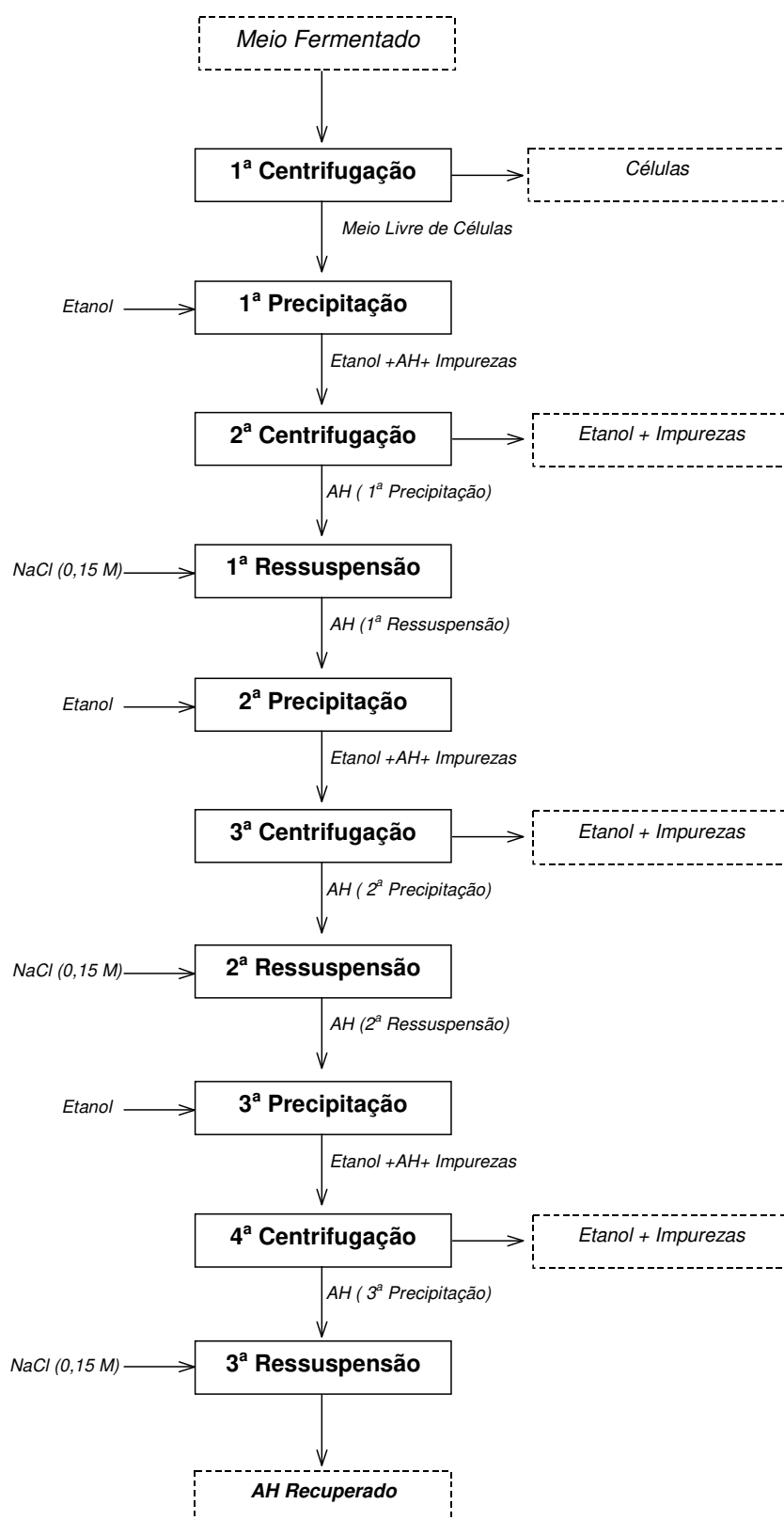


Figura 3.7. Fluxograma ilustrativo do processo de recuperação do AH produzido por fermentação submersa.

3.3. Recuperação do Ácido Hialurônico Produzido por Fermentação Semi-Sólida

Após a extração dos produtos obtidos na FSS, fez-se centrifugação do volume obtido da lixiviação (20 mL), conforme é mostrado no fluxograma na figura 3. 8.

Partindo do sobrenadante, procedeu-se sucessivas precipitações seguindo a metodologia descrita anteriormente para a recuperação do AH obtido da fermentação submersa.

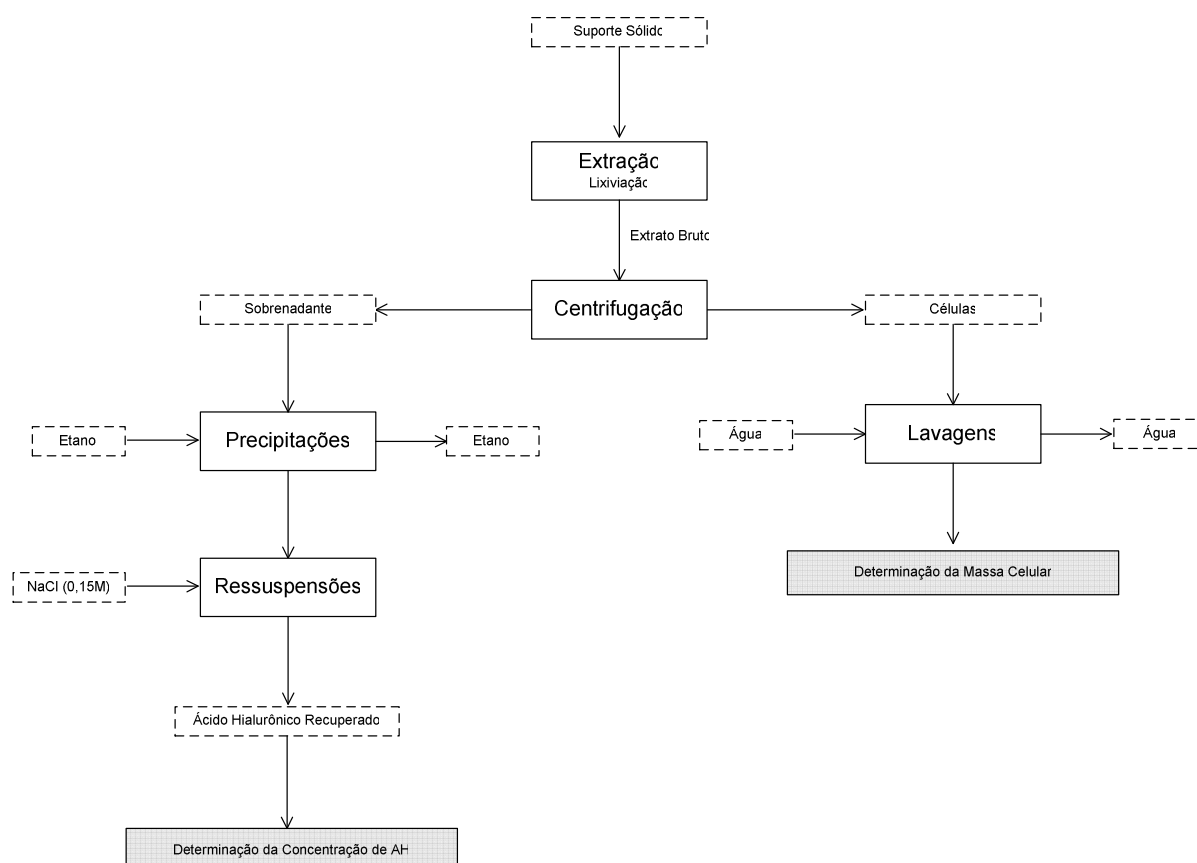


Figura 3.8. Fluxograma das etapas de recuperação de AH e Células adotadas para a FSS

3.4. Estudo da Transferência de Oxigênio

3.4.1. Fermentação Submersa

Coeficiente global de transferência de oxigênio gás-líquido (K_La) para a fermentação submersa foi calculado através do método dinâmico.

Este método consiste em parar a aeração do meio saturado, previamente, em dado momento. Medidas de O.D. são tomadas no sensor do reator e registradas pelo *software* de aquisição de dados. Posteriormente há a realimentação de oxigênio no reator com monitoramento do oxímetro.

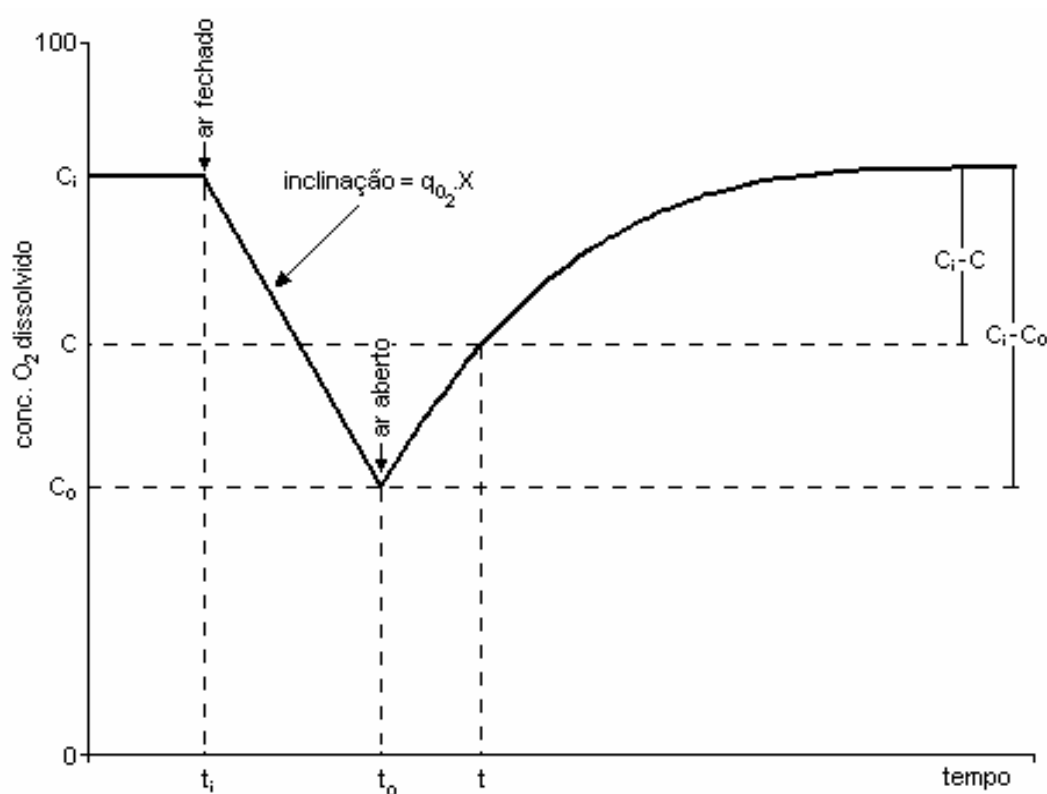


Figura 3.9. Perfil de oxigênio dissolvido durante o experimento para determinação do K_La no método dinâmico

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_i - C) \quad (\text{Equação 3.4})$$

integrando a Equação , o $K_L a$ pode ser isolado e calculado:

$$k_L a = \frac{\ln\left(\frac{C_i - C_0}{C_i - C}\right)}{t - t_0} \quad (\text{Equação 3.5})$$

onde C_i , C_0 e C são diferentes valores de concentração de oxigênio dissolvido mostrados na figura.

3.4.2. Fermentação Semi-Sólida

3.4.2.1. Caracterização do Processo

O processo de FSS do bagaço de caju para a produção de AH pode ser caracterizado, no que diz respeito aos fenômenos de transferência de massa como um processo heterogêneo que envolve 3 fases distintas. (1) fase gasosa, (2) fase líquida (3) fase sólida de sólido intumescido. As transferências de massa, portanto ocorrem da fase gasosa para a fase líquida no filme externo, do filme externo para o interior do poro da partícula intumescida.

3.4.2.2. Cálculo da Taxa Global de Transferência de Oxigênio

A taxa de transferência de oxigênio (N) foi calculada através do balanço de oxigênio na coluna ao longo do tempo. Desse modo, a equação 3.6 mostra o procedimento de cálculo.

$$N = \frac{(F_e \cdot p_{O_2 \text{ENTRADA}} - F_s \cdot p_{O_2 \text{SAIDA}})}{R \cdot T \cdot V_{\text{sólido}}} \quad (\text{Equação 3.6})$$

Onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura (K), p_{O_2} é a pressão de oxigênio na entrada e na saída da coluna.

3.4.2.3. Cálculo da Taxa de Consumo de Oxigênio

A taxa de consumo de oxigênio (R) calculada através do balanço de oxigênio na coluna pela ao longo do tempo. Desse modo, a equação abaixo mostra o procedimento de cálculo da taxa de consumo.

$$R_{O_2} = \frac{dC_{O_2}}{dt} = \frac{(F_e \cdot p_{O_2 \text{ENTRADA}} - F_s \cdot p_{O_2 \text{SAIDA}})}{R \cdot T \cdot V_{\text{líquido}}} \quad (\text{Equação 3.7})$$

Onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura (K), p_{O_2} é a pressão de oxigênio na entrada e na saída da coluna.

3.4.2.4. Cálculo do Perfil de Oxigênio no Filme Líquido

O perfil de oxigênio no filme líquido foi determinado levando-se em conta a geometria da partícula como uma placa plana. Dessa forma, A equação apresentada por **Doran** (1997) é válida assumindo-se, além da geometria da partícula, que o consumo de oxigênio é igual à demanda na fase gasosa em cada seção do leito fixo de partículas; a difusividade de oxigênio na fase líquida é constante, considerada igual à difusividade da água (37 °C); as concentrações de oxigênio gás-líquido na interface estão em equilíbrio e a vazão volumétrica de ar é constante ao longo do reator.

$$C_2 = C_{O_2}^S + \frac{k_o}{2D_{O_2/H_2O}}(z^2 - L_{12}^2) \quad (\text{Equação 3.8})$$

Onde C_2 é a concentração de oxigênio no filme líquido; $C_{O_2}^S$ é a solubilidade do oxigênio em água a 37 °C; K_o é igual à taxa de consumo de oxigênio; D_{O_2/H_2O} é a difusividade de oxigênio em água e L_{12} é a espessura do filme líquido.

3.4.2.5. Cálculo do Perfil de Oxigênio no Interior do Poro do Sólido Intumescido

O perfil de oxigênio no interior do poro do sólido intumescido foi calculado, também, através da equação apresentada por **Doran** (1997)

$$C_3 = C_2 + \frac{k_o}{2D_{ef}}(z^2 - L_{23}^2) \quad (\text{Equação 3.9})$$

Considerando, agora C_3 como a concentração de oxigênio no interior do poro intumescido por líquido; C_2 é a concentração de oxigênio na interface; K_o é igual à taxa de consumo de oxigênio; D_{ef} é a difusividade efetiva de oxigênio, portanto corrigida pela tortuosidade e porosidade e L_{23} é a espessura da partícula intumescida.

3.4.2.6. Cálculo do Coeficiente Global de Transferência de Oxigênio Gás-Líquido ($K_L a$) para a FSS

O coeficiente global de transferência de oxigênio foi estimado pela equação abaixo mostrada.

$$N = K_L a (C_{O_2}^S - C_3) \quad (\text{Equação 3.10})$$

3.5. Métodos Analíticos

3.5.1. Determinação da Concentração Celular

A determinação da biomassa bacteriana produzida na fermentação submersa foi obtida através da leitura da densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro, conforme metodologia adaptada dos métodos usados por **Kim et al.** (1996), **Péquignot et al.** (1998) e **Robitaille et al.** (2006). A correlação entre a D.O. do meio e a massa de células (conteúdo em biomassa) foi obtida por meio de uma calibração analítica.

A calibração foi obtida a partir de um volume concentrado de células, inicialmente quantificados por uma metodologia gravimétrica como sendo o conteúdo de células secas presentes na amostra.

O método gravimétrico consistiu em, após limpos e secos (em estufa a 60 °C por 12 horas), pesar-se os tubos de ensaio ($M_{\text{tubo seco}}$), acrescentou-se 10 mL de caldo fermentado, a amostra analítica. Centrifugou-se a 3200 rpm por 20 minutos e descartou-se o sobrenadante. O precipitado é lavado com água por duas vezes e seco por 12 horas a 60°C em estufa. A massa celular seca é calculada pela diferença entre a massa do tubo de ensaio seco com amostra ($M_{\text{tubo final}}$) e a massa do tubo de ensaio seco sem amostra.

$$M_{\text{tubo final}} - M_{\text{tubo seco}} = M_{\text{células Secas}} \quad (\text{Equação 3.11})$$

Uma vez determinado conteúdo em massa seca para a biomassa do volume concentrado, efetuou-se diluições deste mesmo volume concentrado usando como solução diluente meio de fermentação estéril. Após as devidas diluições, para que se pudesse obter amostras-padrão para a calibração, efetuou-se as leituras da densidade óptica no espectrofotômetro.

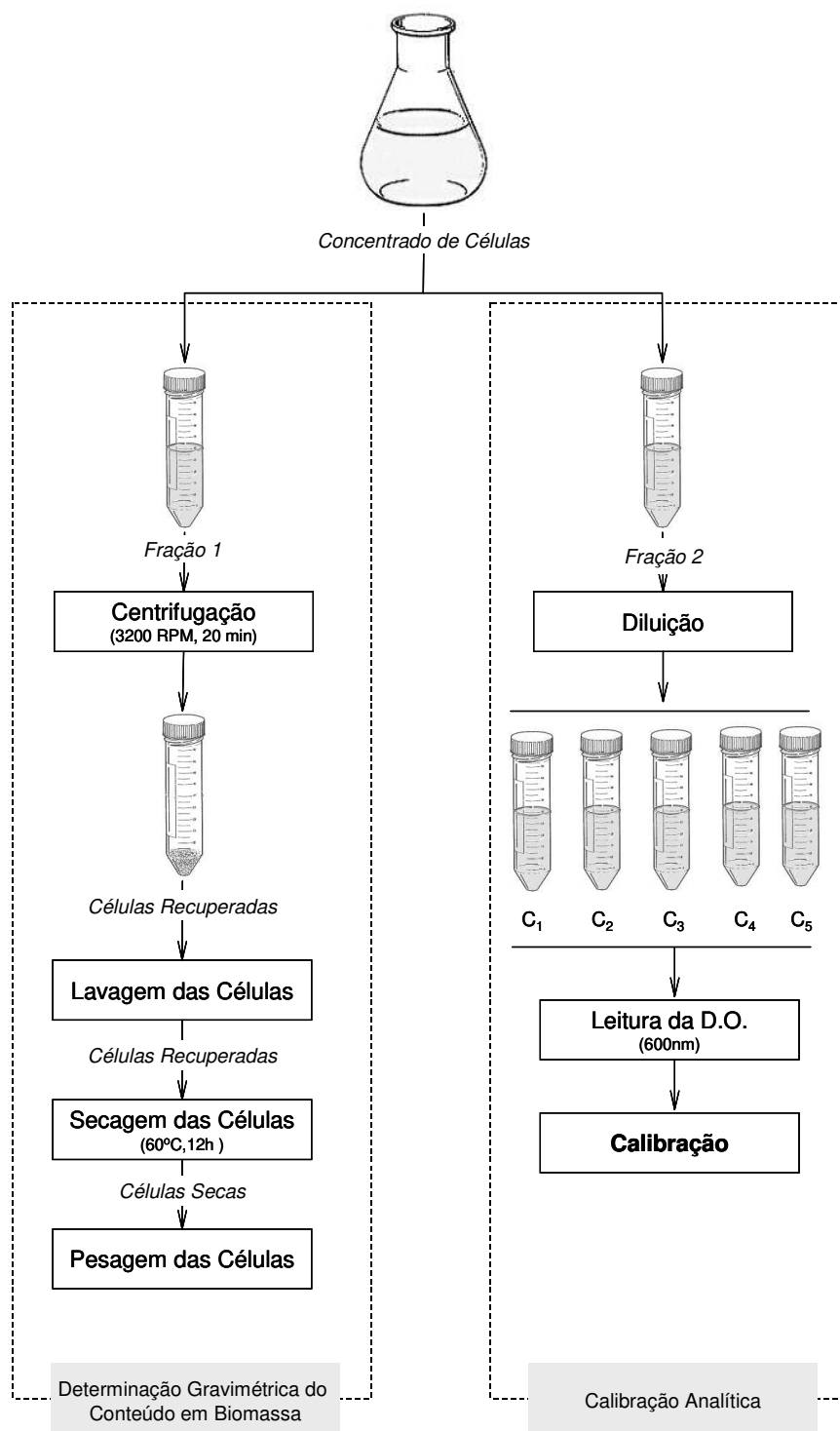


Figura 3.10. Fluxograma ilustrativo da metodologia usada para determinação do conteúdo em biomassa bacteriana.

3.5.2. Conteúdo de Açúcares

A metodologia usada na determinação do conteúdo de açúcares no meio de fermentação foi adaptada da proposta por **Nascimento** e colaboradores (2003) para análise de açúcares em cajuínas por método cromatográfico em sistema de CLAE, os açúcares glicose, frutose e sacarose foram determinados em uma coluna *Hicrom C18* (250mm x 4.6mm) em fase móvel isocrática de acetonitrila - água (20:80 v/v) com fluxo de 0,5 mL/min e detecção com índice de refração (Shimadzu RID-6A).

A identificação do pico cromatográfico para cada uma das substâncias foi feita por comparação entre o tempo de retenção e também por adição sucessiva de padrão na amostra.

A curva padrão foi obtida com soluções padrão de sacarose, glicose e frutose e da mistura. Os valores das áreas dos picos obtidos para cada concentração foram correlacionados linearmente.

3.5.3. Concentração de Ácido Hialurônico

A concentração de AH foi determinada com base na metodologia proposta por **Beaty et al.** (1984) . Para calibração, separou-se um volume de AH precipitado, secou-se com nitrogênio (gás) e determinou-se por gravimetria a massa de AH obtida pela secagem. Preparou-se uma solução de 1g/L de AH obtido por fermentação, em seguida procedendo-se as devidas diluições e injeções em sistema de CLAE composto por bombas (Shimadzu LC-10 AS), injetor manual (Shimadzu 2D), coluna de permeação em gel Shodex SB-806 HQ, acoplados a um detector de índice de refração (Shimadzu RID-6A) e um integrador (Shimadzu). A fase móvel isocrática usada foi Nitrato de Sódio (0,1M) a uma vazão de 1 ml/min.

Para a determinação do conteúdo real em AH presente na amostra, fez-se também uma calibração do método do reagente carbazol, específico para quantificações de ácidos hexurônicos previamente tratados com ácidos minerais (**Dische**, 1949), então, a 1 ml da amostra foi adicionado 6 ml de H_2SO_4 concentrado sob resfriamento em banho, aquecendo por 20 minutos em banho fervente (100°C). Após o total resfriamento da amostra adicionou-se 200 μL do reagente carbazol (SIGMA), deixando-se reagir por 2 horas, quando se efetuou a leitura da absorbância a 527 nm em espectrofotômetro.

3.5.4. Determinação da Massa Molar do AH Produzido

A determinação da massa molar do AH produzido foi adaptada da metodologia proposta por **Beaty et al.** (1984) para determinação de massa molar de soluções de hialuronato de sódio por cromatografia em colunas de exclusão por tamanho.

O sistema empregado na determinação da massa molar do AH produzido foi um sistema cromatográfico Shimadzu, com bombas e injetor manual e uma coluna de permeação em gel Shodex SB-806 HQ, acoplados a um detector de índice de refração (Shimadzu RID-6A) e um integrador (Shimadzu). A fase móvel isocrática usada foi Nitrato de Sódio (0,1M) a uma vazão de 1 ml/min.

A calibração foi feita indiretamente usando padrões de massa molar de dextrana na faixa de 10^3 a 10^6 Da para a ordem de grandeza das massas molares médias (5.200, 23.800, 148.000, 273.000, 410.000, 1.100.000, 2.100.000, 4.200.000, 5.900.000 e 7.400.000 Da). A curva de calibração foi obtida com a linearização da curva exponencial (equação 3.12)

$$\text{Log}(M_w) = f(t_r) \quad (\text{Equação 3.12})$$

Para determinações de Massa Molar média (M_w) com base no tempo de retenção da amostra injetada (t_r).

3.5.4.1. Determinação da Distribuição de Massa Molar

A caracterização da distribuição de massa molar do AH produzido foi feita em cooperação com o Grupo de Pesquisas em Separação por Adsorção (GPSA) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará (UFC) através de metodologia desenvolvida por **Sousa** (2007). As amostras foram analisadas após cada precipitação em sistema de CLAE por técnica de GPC aquoso em coluna *Shodex OHPak SB806M HQ*. Como fase móvel utilizou-se NaNO_3 0,1 M a uma vazão volumétrica de 0,8 ml/min. A cuva padrão do método foi feita pela injeção de padrões de Dextrana (Sigma).

A massa molar numérica média ($\overline{M}_i$) foi calculada pela relação entre a massa molar do polímero (M_i) e o número de polímeros (N_i) com massa molar M_i .

$$\overline{M}_i = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (\text{Equação 3.13})$$

A massa molar ponderal média ($\overline{M}_w$), estimativa da contribuição da massa de cada uma das cadeias poliméricas à massa molar total do polímero foi calculada através da relação:

$$\overline{M}_w = \frac{\sum N_i (M_i)^2}{\sum N_i M_i} \quad (\text{Equação 3.14})$$

A polidispersidade de soluções poliméricas é dada pela relação entre $\overline{M}_w$ e $\overline{M}_n$.

$$\text{Polidispersidade} = \frac{(\overline{M}_w)}{(\overline{M}_n)} \quad (\text{Equação 3.15})$$

Valores para a polidispersidade são sempre maiores ou iguais a 1,0.

3.5.5. Determinação do Conteúdo de Polifenóis

A metodologia de determinação do conteúdo de polifenóis presentes no suco de caju e nos meios de propagação e fermentação foi a do reagente de **Folin-Ciocalteu**, referenciada por **Queiroz et al.** (2002), e adaptada para suco de caju. Retirou-se 0,10 ml de cada amostra e diluiu-se com água destilada para 50,0 ml. Retirou-se uma alíquota de 0,5 ml. À alíquota foram adicionados 2,5 ml de uma solução aquosa do reagente de **Folin-Ciocalteu** a 10% e 2,0 ml de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi mantida por 5 minutos em banho-maria, a 50 °C, e a absorbância foi lida a 760 nm. Procedeu-se de forma semelhante com as soluções-padrão de D-Catequina e com o branco para a determinação da calibração.

3.5.6. Validação dos Métodos Analíticos de Quantificação

3.5.6.1. Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico. (**Brito et al.**, 2003)

Para avaliar o grau de correlação entre o sinal e a concentração do analito calculou-se o coeficiente de correlação para a dispersão de pontos obtida na calibração, julgando-se satisfatória a linearidade do gráfico quando o coeficiente de correlação da reta obtida não é estatisticamente diferente da unidade (**Brito et al.**, 2003).

A tabela 3.4 mostra os tipos de correlação de acordo com o intervalo de R considerados nesta avaliação:

Tabela 3.4. Tipos de Correlação de acordo com o intervalo de R.

Intervalo do Coeficiente de Correlação	Tipo de Correlação
$R=1$	<i>Correlação perfeita</i>
$0,91 < R < 0,99$	<i>Correlação fortíssima</i>
$0,61 < R < 0,91$	<i>Correlação forte</i>
$0,31 < R < 0,60$	<i>Correlação média</i>
$0,01 < R < 0,30$	<i>Correlação fraca</i>
$R = \text{zero}$	<i>Correlação nula</i>

(adaptada de **Brito et al.**, 2003)

3.5.6.2. Precisão

O parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra é a precisão do processo analítico (**Brito et al.**, 2003). Representa, portanto a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob

condições definidas. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos analíticos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s) (**Ribani et al.**, 2004).

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (\text{Equação 3.16})$$

Onde $\bar{x}$ é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações), sendo, portanto uma estimativa de μ (média populacional); x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições feitas.

3.5.6.3. Repetitividade

O termo Repetitividade é adotado do Vocabulário Internacional de Metrologia.

Repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade: mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local.

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrida e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão.

3.5.6.4. Sensibilidade do Método (S)

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a

sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico expresso de acordo com a equação 3.17.

$$S = \frac{dy}{dx} \quad (\text{Equação 3.17})$$

Dessa forma, para uma calibração qualquer do tipo:

$$F(x) = B + Sx \quad (\text{Equação 3.18})$$

Teremos B como a média das medidas do branco (ou linha de base); S como a sensibilidade do método e x concentração do analito na amostra.

3.5.6.5. Limite de Detecção (LD)

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas constitui o limite de detecção (**Brito et al.** 2003).

Seguindo **Ribani et al.** (2004) o limite de detecção pode ser expresso pela equação abaixo:

$$LD = \left(\frac{3s}{S} \right) \quad (\text{Equação 3.19})$$

Onde s é o desvio padrão do intercepto; S a sensibilidade (coeficiente angular) para n replicatas.

3.5.6.6. Limite de Quantificação

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos (**Brito et al.** 2003).

A determinação do LQ foi feita pela equação 3.20.

$$LQ = \left(\frac{10s}{S} \right) \quad (\text{Equação 3.20})$$

Onde s é o desvio padrão do intercepto; S a sensibilidade (coeficiente angular) para n replicatas.

3.6. Análise Química Qualitativa por FTIR

Após cada fermentação, na etapa de recuperação do produto pela precipitação com etanol (fez-se 5 precipitações), partindo do meio livre de células (item 3.2). Após recuperado, o AH foi seco com nitrogênio gasoso e levado à deumidificação sob vácuo.

As amostras secas foram analisadas em um espectrômetro **Thermonicolet IR 2000** do laboratório de *Síntese de Substâncias Orgânicas Bioativas* do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas.

3.7. Determinação da Espessura Média do Filme Líquido Externo no Bagaço de Caju

A determinação da espessura média do filme líquido externo ao bagaço de caju úmido na FSS foi feita através de microscopia óptica com uso de um microscópio LEICA DML. As Medidas da espessura do filme líquido foram tomadas por softwares (LEICA Quips e LEICA QFAB) próprios para esta finalidade. Todas as determinações foram feitas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (FEQ/UNICAMP).

3.8. Metodologia de Caracterização da Fermentação

3.8.1. Velocidade Específica de Crescimento Celular

A velocidade de crescimento celular (μ_x) foi obtido através da sua definição (equação 3.21).

$$\mu_x = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (\text{Equação 3.21})$$

De onde, separando os termos, obtemos:

$$\mu_x (dt) = \left(\frac{dx}{x} \right) \quad (\text{Equação 3.22})$$

Integrando a Equação 3.22. teremos:

$$\int_0^t \mu_x(dt) = \int_{x_0}^x \left(\frac{dx}{x} \right) \quad (\text{Equação 3.23})$$

$$\mu_x(t-0) = \ln\left(\frac{x}{x_0}\right) \quad (\text{Equação 3.24})$$

$$\mu_x(t) + \ln(x_0) = \ln(x) \quad (\text{Equação 3.25})$$

Desse modo, pela curva $\ln(x) = f(t)$, obtemos a velocidade específica de crescimento celular como o coeficiente angular do gráfico.

3.8.2. Fatores de Rendimento $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ e $Y_{P/X}$

Os fatores de rendimento foram obtidos das curvas(coeficientes angulares) que relacionam o produto e substrato para $Y_{P/S}$, massa celular e substrato para $Y_{X/S}$ e produto e células para $Y_{P/X}$, seguindo as suas definições.

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{dS} \quad (\text{Equação 3.26})$$

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{dS} \quad (\text{Equação 3.27})$$

$$Y_{P/X} = \frac{dP}{dX} \quad (\text{Equação 3.28})$$

Desse modo, os coeficientes angulares para as curvas que relacionam P , X e S :

$$P = f(S) \quad (\text{Equação 3.29})$$

$$X = f(S) \quad (\text{Equação 3.30})$$

$$P = f(X) \quad (\text{Equação 3.31})$$

nos informaram os fatores de rendimento para o processo.

3.8.3. Produtividades em Produto (P_p) e em Células (P_x)

Para a avaliação do desempenho do processo fermentativo na formação de biomassa:

$$P_x = \frac{X_{\max} - X_o}{t_f} \quad (\text{Equação 3.32})$$

onde X_o é a concentração inicial de células, $X_{\max}$ é a máxima concentração celular obtida na fermentação no tempo t_f .

Para a avaliação do desempenho do processo fermentativo na formação de produtos:

$$P_p = \frac{P_{\max} - P_o}{t_f} \quad (\text{Equação 3.33})$$

onde P_o é a concentração inicial de produto, $P_{\max}$ é a máxima concentração de produto obtida na fermentação no tempo t_f .

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

Este capítulo traz a padronização do método de preservação do inóculo, adequação do modo de pré-cultivo e preparo do inóculo, apresentando também os resultados referentes à fermentação sem suprimento de oxigênio e em sistemas aerados na produção de AH utilizando suco de caju in natura e clarificado como substratos da fermentação submersa e bagaço de caju como substrato/suporte da fermentação em estado sólido.

4.1. Padronização do Inóculo para a Produção de Ácido Hialurônico

4.1.1. Preservação da Cultura

A linhagem de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (ATCC 39920), obtido na forma de cultura liofilizada, em ampolas, foi preservada na *Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI)*, através de depósito feito naquela instituição. O procedimento padrão de preparo do estoque

de culturas ultracongeladas e manutenção das culturas é descrito no item 3.1.2 do capítulo de Material e Métodos.

A padronização da metodologia de preservação é importante ao passo que o modo de conservação influencia diretamente na atividade microbiana com relação ao crescimento celular e na produção de AH.

Fermentações realizadas com culturas propagadas inúmeras vezes a partir de um mesmo criotubo mostraram que a capacidade de produção de AH é influenciada diretamente pela forma de preservação que é imposta à cultura.

No transcurso deste trabalho, verificou-se que a melhor forma para se conduzir as fermentações é partindo-se, em cada corrida experimental, de um criotubo, assim, uma vez descongelado esse tubo apenas será usado por no máximo 3 vezes, conforme é descrito no item 3.1.2 do capítulo de Material e Métodos, o que evita exposição das células às condições severas de temperaturas baixas, que acarretaria inativação e injúria da cultura.

Observou-se que, para experimentos que foram conduzidos partindo-se de um mesmo criotubo, o que significa que o mesmo tubo foi congelado e descongelado várias vezes, os resultados não foram reprodutivos não havendo, em muitos casos, crescimento celular quantificável. Nos casos onde observou-se o crescimento celular e a produção de AH, o polímero produzido foi de massa molar inferior ao obtido seguindo a metodologia padronizada para preservação, manutenção e ativação da cultura.

4.1.2. Pré-Cultivo

Para a determinação da melhor forma de pré-cultivo da cepa foram feitos ensaios em 3 tratamentos distintos descritos no capítulo 3. e também mostrados abaixo na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Tratamentos usados no experimento de adequação do pré-cultivo e propagação da cepa *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920.

Tratamento	Pré-Cultivo	Inóculo	Meio de Fermentação
1	TSA	SC	SC
2	BHI	SC	SC
3	BHI	BHI	SC

SC – suco de caju

A avaliação feita para a determinação do método de pré-cultivo do *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 teve como critério a produção final de AH e o crescimento celular para a fermentação, obtidos para cada tratamento.

O resultado para cada tratamento, apresentado na Figura 4.2., nos mostra que a melhor forma de pré-cultivo da cepa, como forma de ativação inicial do microrganismo é o usado no tratamento 2. Assim, o pré-cultivo feito em BHI e o inóculo preparado em suco de caju, apresentaram maior crescimento celular e maior produção de AH ao relacionarmos com os outros dois tratamentos (1 e 3).

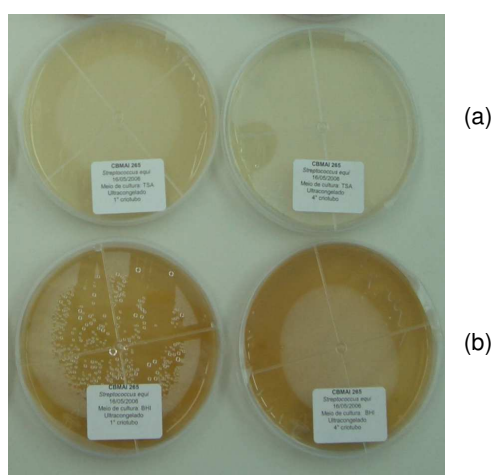


Figura 4.1. Detalhe das placas contendo as culturas pré-cultivadas em BHI e em TSA usadas no ensaio de determinação da forma de pré-cultivo da cepa. (a) TSA e (b) BHI.

4.1.3. Padronização do Preparo do Inóculo

4.1.3.1. Determinação do tempo de propagação

O ensaio cinético para determinação do tempo de propagação adotado no procedimento de preparo do inóculo foi feito pelo acompanhamento da evolução da concentração de biomassa bacteriana para determinação da fase de crescimento exponencial. A Figura 4.3. mostra o gráfico do acompanhamento da biomassa bacteriana e do crescimento celular durante a etapa de propagação do inóculo pré-cultivado em BHI em meio de suco de caju suplementado.

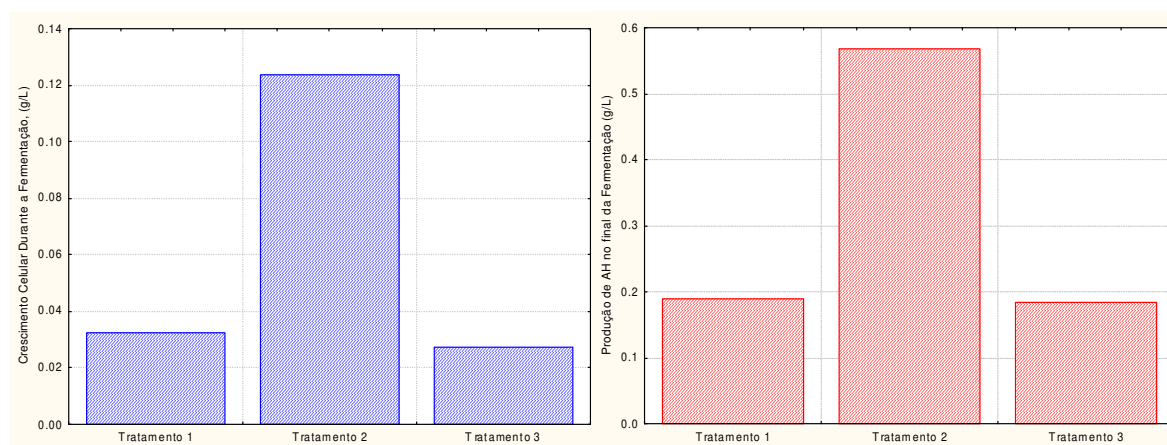


Figura 4.2. Gráficos para crescimento celular e produção de AH ao final da fermentação para os tratamentos 1, 2 e 3.

A Figura 4.3. mostra que a fase de adaptação para o microrganismo é de aproximadamente 8 horas, quando, efetivamente, se inicia a fase de crescimento exponencial. Com base nesse resultado, adotou-se o tempo de 12 horas como adequado de preparo do inóculo.

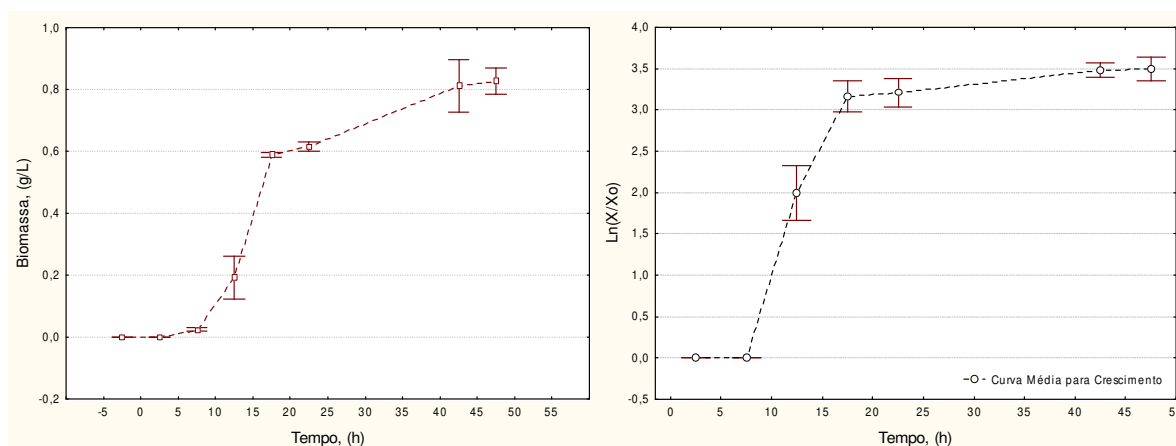


Figura 4.3. Gráfico para a evolução da biomassa bacteriana e crescimento celular obtido para a cultura de *Streptococcus* na etapa de propagação.

4.2. Ensaio de Fermentação Submersa sem Aeração Forçada

O ensaio de fermentação submersa na ausência de oxigênio suplementar, conduzido em frascos de *Erlenmeyer* apresentou o perfil de fermentação mostrado na Figura 4.4.

Observa-se que os açúcares não foram esgotados em 24 horas de fermentação.

Temos, portanto, que a fase de adaptação no meio de cultivo foi de aproximadamente 2 horas, que fica mais claro ao observarmos a curva de crescimento (figura 4.5), que se dá pelo fato de se efetuar o corte do inóculo e início da fermentação ainda na fase exponencial, quando a máxima atividade celular é disponibilizada ao crescimento de células.

A fase exponencial de crescimento tem duração de aproximadamente 16 horas, quando se observa a estabilização da concentração celular no meio.

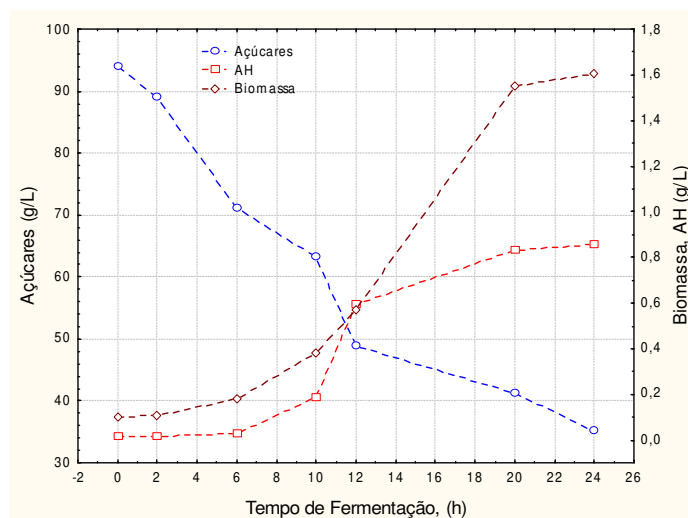


Figura 4.4. Perfis médios de concentração de substrato, produto e biomassa ao longo da fermentação.

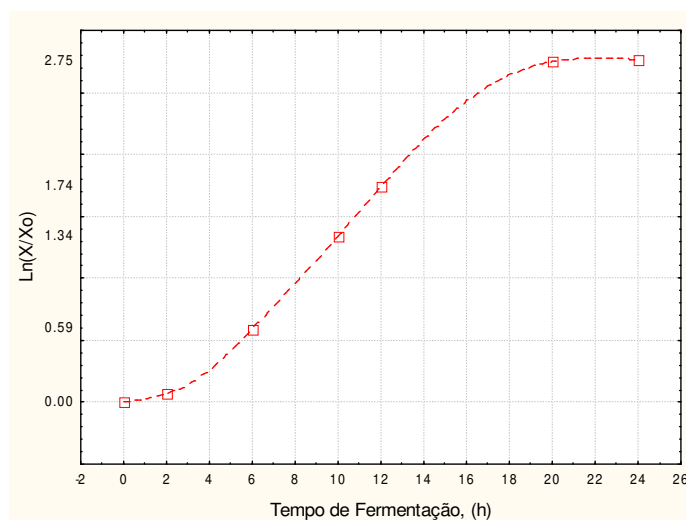


Figura 4.5. Curva de crescimento da biomassa bacteriana para a fermentação em frascos de Erlenmeyer (10% Inóculo v/v, $X_0=0,09$).

A concentração de AH obtida na fermentação sem suplementação de oxigênio, mostrado na figura 4.4, foi de 0,85 g/L. A tabela 4.2. apresenta o resumo dos parâmetros cinéticos obtidos para a fermentação.

Observamos, portanto, que a máxima velocidade específica de crescimento para esta situação é de $0,151 \text{ s}^{-1}$. As produtividades em termos de biomassa e produtos, respectivamente são de 0,078 e 0,041 g/L.h.

Tabela 4.2. Parâmetros cinéticos obtidos para a fermentação submersa em frascos de *Erlenmeyer* sem suprimento de oxigênio

	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	μ_x	$P_{\max}$	$X_{\max}$	P_x	P_P
	(g/g)	(g/g)	(h ⁻¹)	(gL ⁻¹)	(gL ⁻¹)	(gL ⁻¹ h ⁻¹)	(gL ⁻¹ h ⁻¹)
Valor Calculado	0,041	0,027	0,151	0,842	1,57	0,078	0,041
Coeficiente de Correlação	0.8595	0,9953	0,9852	-	-	-	-

4.3. Ensaios de Fermentação Submersa com Aeração Forçada

4.3.1. Ensaios com Suco de Caju *In Natura*

4.3.1.1. Caracterização da Fermentação

No sistema aerado, nas condições operacionais impostas, 250 rpm de agitação, 2 volumes de oxigênio por volume de meio líquido a 37 °C, observou-se perfis de consumo de açúcares, evolução de biomassa e AH mostrados na figura 4.6.

Observa-se, portanto, que a fonte de carbono chega, ao final de 24 horas de operação, a uma concentração mínima de aproximadamente 11, 8 g/L, tendo iniciado-se o processo com a concentração acima de 92 g/L. Não há, desse modo, exaustão desta fonte, mas há significativa diferença em relação ao consumo nos ensaios sem suprimento de oxigênio, onde nota-se que, após 24 horas de operação a fonte de carbono encontra-se no meio à uma concentração superior a 35 g/L, ao que se iniciou a fermentação em concentrações próximas a 95 g/L de açúcares totais.

Quanto aos perfis de evolução de biomassa e AH, nota-se que a massa celular bacteriana observada no processo com suprimento de oxigênio que, após 24 horas, a concentração celular, já estável no meio, é de aproximadamente 2,7 g/L ao passo que em frascos esta concentração era de aproximadamente 1,7 gramas de biomassa bacteriana por litro de meio fermentado, com diferença, portanto de 1 g/L em relação ao ensaio com aeração forçada. O AH produzido no ensaio com suplementação de oxigênio chegou a uma máxima concentração em 24 horas que foi de 2,5 g/L, ao passo que no ensaio em frascos de *Erlenmeyer* esse valor era de 0,8 g/L, conforme podemos ver pela figura 4.4.

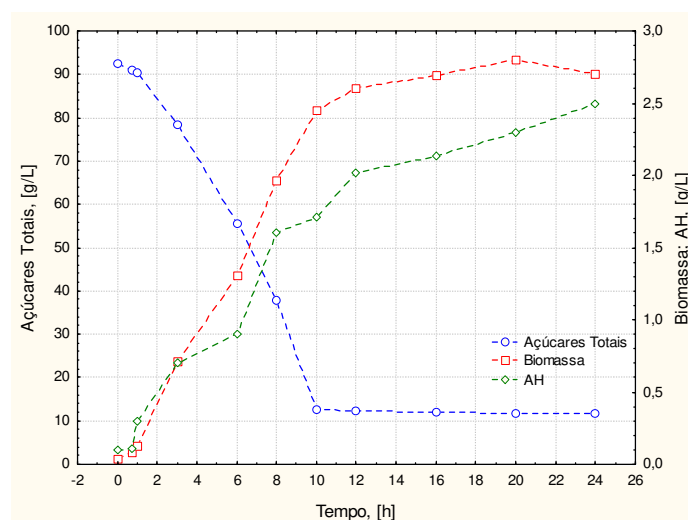


Figura 4.6. Perfil médio do consumo de açúcares e evolução da biomassa bacteriana e AH para a fermentação em reator de suco de caju *in natura* (10% Inóculo v/v, $X_0=0,038\text{g/L}$).

O perfil do consumo de oxigênio pode ser relacionado com o crescimento celular ao longo do processo, conforme observamos na figura 4.7.

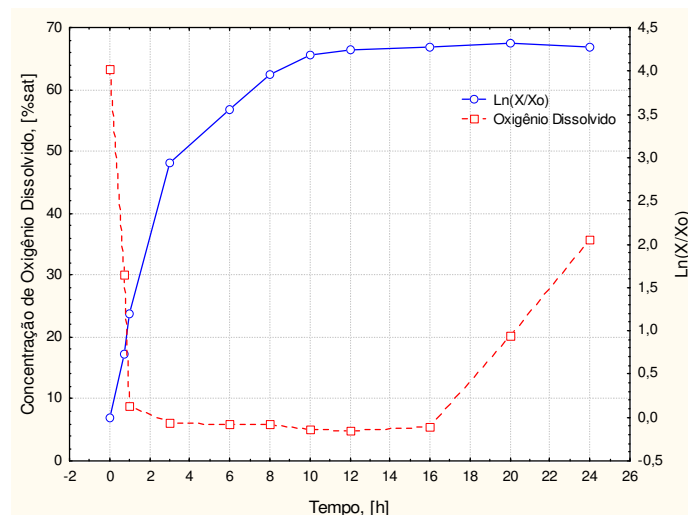


Figura 4.7. Perfil de Crescimento celular e concentração de oxigênio dissolvido na fermentação em reator de suco de caju *in natura* (10% Inóculo v/v, $X_0=0,038\text{g/L}$).

A relação entre o consumo de oxigênio e o crescimento bacteriano, no ensaio em bioreator para o suco *in natura* pode ser observada na figura 4.7. Assim, com a evolução da biomassa bacteriana, a concentração de oxigênio dissolvido no meio tende a cair, o que é verificado nas 8 primeiras horas de fermentação. A concentração crítica de oxigênio dissolvido, 5 % da saturação, conforme menciona **Huang et al.** (2006), parece ser atingida em 10 horas de fermentação. Após 16 horas, há o aumento da concentração de oxigênio no meio, atribuída à morte de parte das células, visto que entre 10 e 16 horas o processo foi conduzido na concentração crítica de oxigênio ou abaixo dela ou por adesão de bolhas de ar no eletrodo visto o aumento da viscosidade do meio ao longo do processo.

Os valores estimados para os parâmetros cinéticos são apresentados na tabela 4.3.

Tabela 4.3. Parâmetros cinéticos obtidos para a fermentação submersa de suco de caju *in natura* em Reator com suprimento de oxigênio

	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	μ_x	P_{max}	X_{max}	P_x	P_P
	(g/g)	(g/g)	(h ⁻¹)	(gL ⁻¹)	(gL ⁻¹)	(gL ⁻¹ h ⁻¹)	(gL ⁻¹ h ⁻¹)
Valor Calculado	0,0347	0,0248	0,4787	2,24	2,69	0,225	0,186
Coefficiente de Correlação	0,9906	0,9445	0,8898	-	-	-	-

Comparando os valores apresentados na tabela 4.3. com os valores obtidos para a fermentação submersa com suco *in natura* sem suprimento de oxigênio, observamos que os rendimentos em biomassa e produto ($Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$) estão na mesma ordem de grandeza, apresentando apenas uma pequena diferença. A velocidade específica de crescimento celular é superior no sistema aerado, o que assegura que há dependência da oxigenação do meio para o crescimento desta cultura. Há que se observar o ganho significativo na concentração máxima de produto e biomassa (P_{max} e X_{max}) no processo com aeração forçada, o que acarretou significativa mudança nas produtividades em relação a X e P. A figura 4.8. apresenta um diagrama de barras comparativo entre os dois processos (com e sem aeração forçada).

Como podemos observar, na figura 4.9. o pH do meio mantém-se com leve flutuação entre 0 e 12 horas. Após 12 horas de fermentação há produção de ácidos pelo metabolismo do microrganismo, tais como acético, láctico e propiônico, assim, podemos observar tal fenômeno através da queda do pH de 6,5 para 4,9.

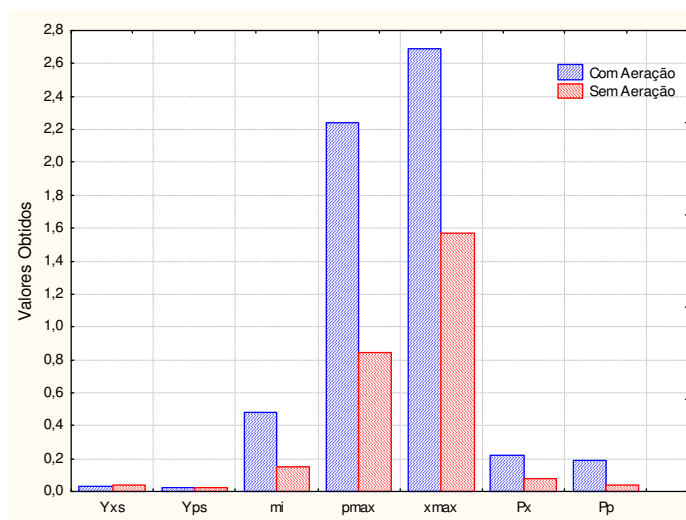


Figura 4.8. Comparação entre parâmetros cinéticos para sistemas com e sem aeração forçada na produção de AH com suco de caju in natura.

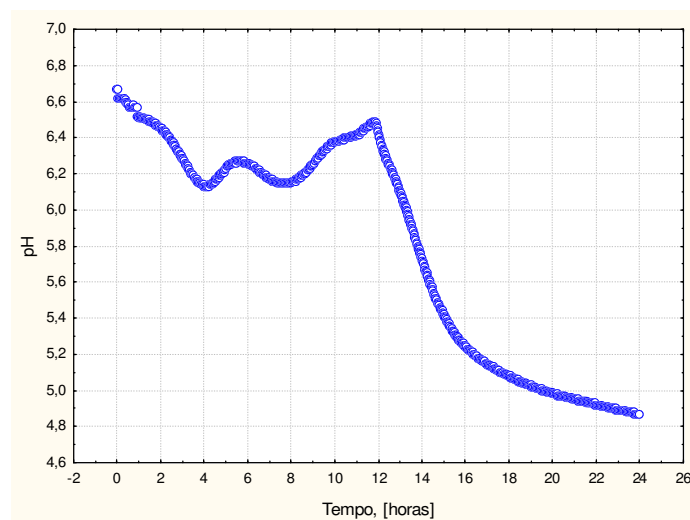


Figura 4.9. Perfil de pH do meio de fermentação no ensaio em biorreator com aeração forçada na produção de AH com suco de caju in natura.

4.3.1.2. Transferência de Oxigênio

A determinação do K_La através do método dinâmico, feita no início da fermentação, conforme mostrado no perfil da figura 4.10, foi executada com o corte da aeração após 0,1 h. Quando a concentração de oxigênio foi de aproximadamente 20 % da saturação, reiniciou-se a aeração. Medidas de oxigênio dissolvido no meio foram tomadas periodicamente.

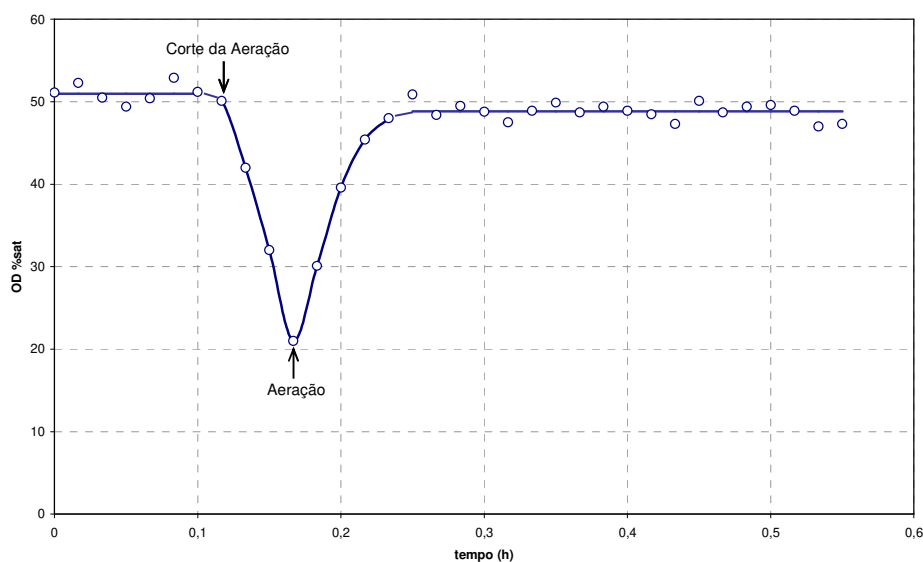


Figura 4.10 Perfil de oxigênio dissolvido no método dinâmico de cálculo do K_La para o meio de suco *in natura*..

Calculando-se o valor do K_La conforme metodologia descrita no capítulo 3, observa-se que, para esta situação, o K_La é de **$0,020 \text{ s}^{-1}$** .

García-Ochoa *et al.* (2000) estudaram a transferência de oxigênio em processo fermentativo para a produção de goma xantana. Em seu trabalho, **García-Ochoa** e colaboradores (2000) mostraram que há relação entre a

velocidade superficial do gás no meio líquido e a velocidade de agitação afetam diretamente o coeficiente global de transferência de massa gás-líquido. Um comportamento linear é observado para o K_La com o aumento da velocidade de agitação e velocidade superficial da bolha de gás no meio. Valores estimados para o K_La no trabalho de **García-Ochoa et al.** (2000) estão na ordem de grandeza de 10^{-2} s^{-1} , semelhante à ordem de grandeza encontrada para o cultivo submerso em meio de suco *in natura*.

4.3.2. Ensaio com Suco de Caju Clarificado

4.3.2.1. Caracterização da Fermentação

Com o objetivo de observar a influência da clarificação do suco de caju sobre a produção de AH em sistema com suprimento de oxigênio, procedeu-se um ensaio semelhante ao descrito anteriormente para suco *in natura*.

As condições operacionais impostas ao processo foram as mesmas empregadas no experimento com suco de caju *in natura*, assim, uma agitação de 250 rpm, 2 vvm de ar para aeração do volume líquido e uma temperatura controlada de 37 °C.

Observou-se nos perfis de consumo de açúcares, evolução de biomassa e AH, mostrados na figura 4.11., que não há esgotamento da fonte de carbono, situação semelhante ao caso anterior, com suco *in natura*. A fonte de carbono chega, ao final de 24 horas, a uma concentração mínima de aproximadamente 19,9 g/L, tendo iniciado-se o processo com a concentração acima de 89,2 g/L.

Os perfis de evolução de biomassa e AH, mostram que a concentração celular observada no ensaio com suprimento de oxigênio em meio de suco clarificado, após 24 horas já está estável no meio, e é de aproximadamente 3,0 g/L, um pouco maior que no ensaio com suco de caju *in natura*. O AH produzido chegou a uma máxima concentração em 24 horas que foi de 2,6 g/L.

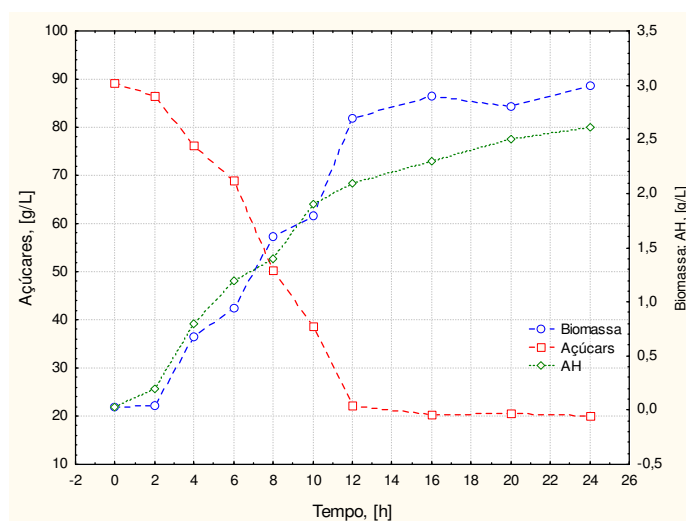


Figura 4.11. Perfil médio do consumo de açúcares e evolução da biomassa bacteriana e AH para a fermentação em reator de suco clarificado de caju (10% Inóculo v/v, $X_0=0,05\text{g/L}$).

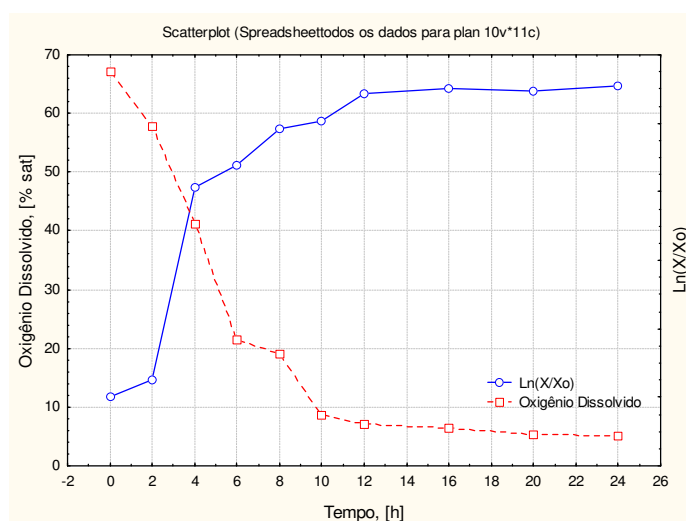


Figura 4.12. Perfil de Crescimento celular e concentração de oxigênio dissolvido na fermentação em reator de suco de caju clarificado (10% Inóculo v/v, $X_0=0,05\text{g/L}$).

A Figura 4.12. mostra a relação entre o oxigênio dissolvido no meio de fermentação e o crescimento celular. Observa-se que à medida que há um aumento da biomassa, o oxigênio dissolvido é consumido para a conversão em massa celular e produtos metabólicos.

Comparando o crescimento celular dos processos em biorreator para o suco de caju *in natura* e o suco clarificado, observamos que o crescimento celular é um pouco maior para o processo com suco clarificado, no entanto, essa diferença parece não ser tão significativa, conforme observamos pela figura 4.13. No entanto ao compararmos esses dois crescimentos com o crescimento em meio de suco *in natura*, porém sem suprimento de oxigênio observamos significativa diferença.

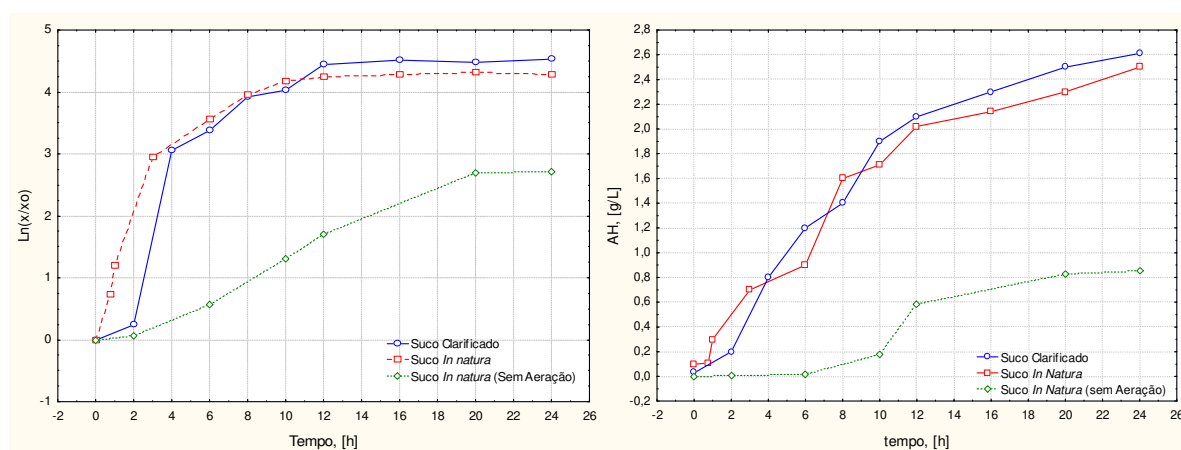


Figura 4.13. Perfis de Crescimento celular e produção de AH para ensaios em meio de suco *in natura* com e sem suprimento de oxigênio e para meio de suco clarificado.

Desse modo, o suprimento de oxigênio parece ser bem mais importante para o crescimento bacteriano e a produção de AH que a redução do percentual de taninos no suco.

Tabela 4.4. Parâmetros cinéticos obtidos para a fermentação submersa de suco clarificado de caju em Reator com suprimento de oxigênio

	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	μ_x	P_{max}	X_{max}	P_x	P_P
	(g/g)	(g/g)	(h ⁻¹)	(gL ⁻¹)	(gL ⁻¹)	(gL ⁻¹ h ⁻¹)	(gL ⁻¹ h ⁻¹)
Valor Calculado	0,0406	0,0317	0,565	2,61	3,0	0,241	0,198
Coefficiente de Correlação	0,988	0,96	0,794	-	-	-	-

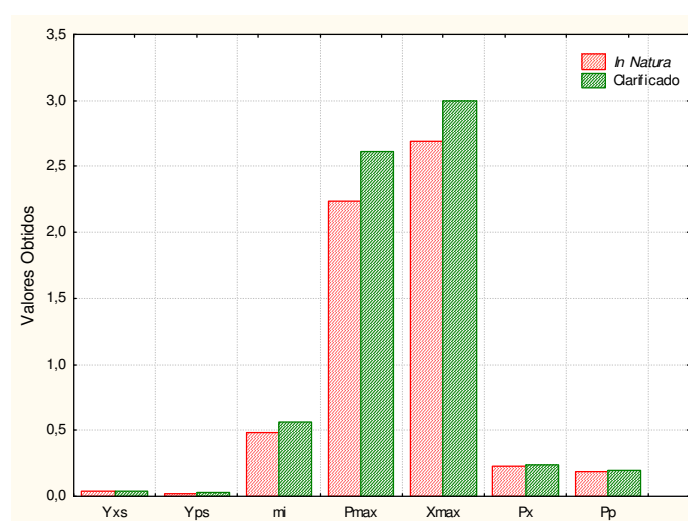


Figura 4.14. Comparação entre parâmetros cinéticos para sistemas com aeração forçada na produção de AH com suco de caju *in natura* e clarificado.

Pela figura 4.14. podemos observar que as diferenças entre as entre os valores obtidos para os rendimentos (Y_{XS} e Y_{PS}) não são grandes, assim, o valor para o Y_{XS} para o processo utilizando suco de caju clarificado é **14,5%** maior que na fermentação utilizando suco *in natura*, o Y_{PS} foi aproximadamente **22 %** maior para a fermentação com suco de caju clarificado.

Pequenas diferenças nas produtividades (próximas à **6%**) também são observadas. Diferenças entre as máximas concentrações de células e produtos estão em torno de **14%**.

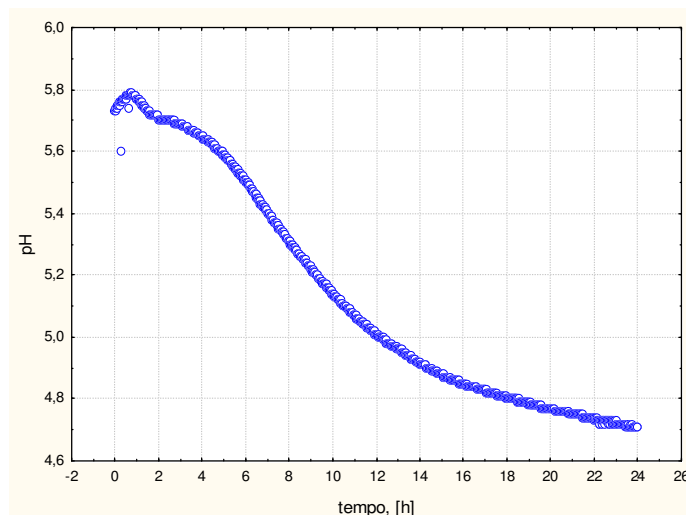


Figura 4.15. Perfil de pH do meio de fermentação no ensaio em biorreator com aeração forçada na produção de AH com suco de clarificado.

O perfil de pH mostrado na figura 4.15. indica que a evolução de ácidos acontece logo após as primeiras 4 horas de fermentação.

4.3.2.2. Transferência de Oxigênio

A determinação do K_{La} através do método dinâmico, foi feita no início da fermentação, conforme é mostrado na figura 4.16. O corte da aeração foi feito após 0,15 h. quando a concentração de oxigênio foi de aproximadamente 20 % da saturação, reiniciou-se a aeração. Fez-se, então, reproduzindo o método usado anteriormente (para o meio de suco *in natura*) para que se possa comparar os resultados obtidos para o K_{La} nas duas situações (meio de suco *in natura* e clarificado).

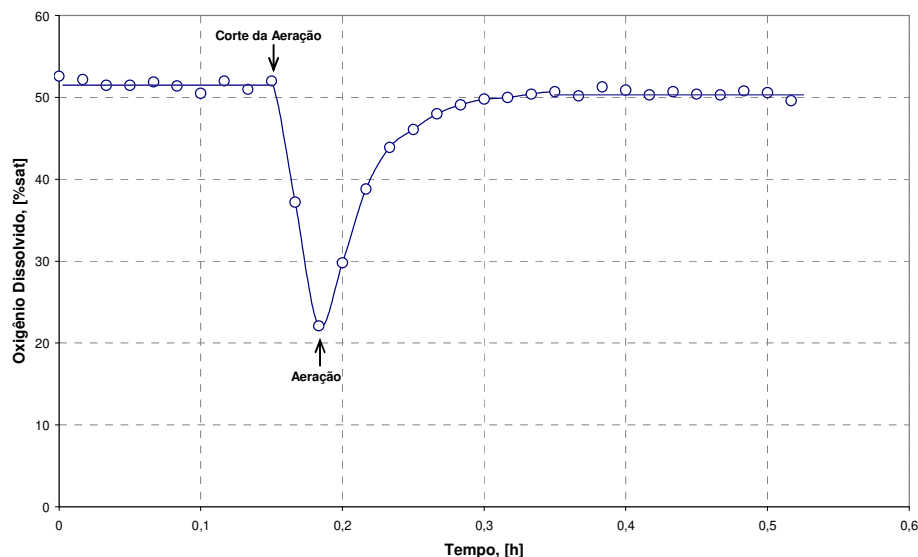


Figura 4.16. Perfil de oxigênio dissolvido no método dinâmico de cálculo do K_La para o meio de suco clarificado.

O valor encontrado para o K_La , através do método dinâmico foi de $0,008 \text{ s}^{-1}$.

Ogrodowski (2006) obteve valores de K_La da ordem de 10^{-4} para fermentação de *Streptococcus zooepidemicus* em meio sintético na produção de AH. **Ogrodowski** (2006) justifica os baixos valores de K_La encontrados na branda agitação (150 rpm), tomando por base os seus valores, um incremento de 100 rpm acarretaram significativas mudanças no K_La , conforme vemos pelos valores obtidos nos dois processos em biorreator aqui apresentados.

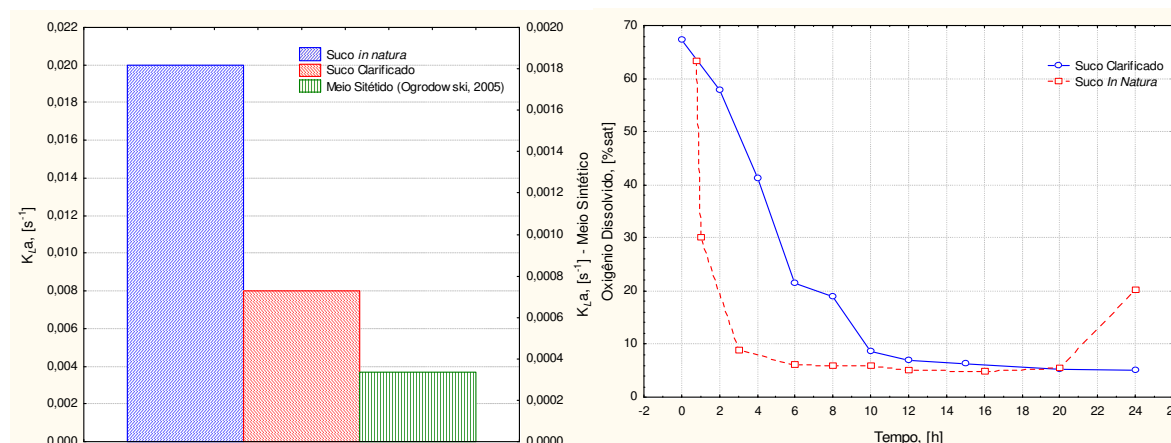


Figura 4.17. Comparação entre os valores obtidos para o K_{La} e perfis de oxigênio dissolvido em processos com meio de suco de caju *in natura*, clarificado e meio sintético.

Diferenças no K_{La} observadas (figura 4.17) podem ser explicadas pela mudança nas características físico-químicas do meio promovidas pelo incremento de 14% na concentração de AH produzido na fermentação com suco clarificado.

O oxigênio dissolvido no processo com suco clarificado apresenta-se mais suavizado em relação ao suco *in natura*.

4.4. Ensaios de Fermentação Em Estado Sólido

4.4.1. Caracterização da Fermentação

4.4.1.1. Suporte/Substrato

O suporte/substrato usado foi o bagaço de caju, conforme mencionado no capítulo de material e métodos.

O ensaio de caracterização da capacidade de absorção de água pelo suporte, feito conforme descrição no capítulo 3, mostrou que a condição de

absorção de água que nos permite trabalhar sem que haja aparecimento de água livre é a de 0,5 mL de água/ 1 g de bagaço.



Figura 4.18. Fibra do bagaço de caju (partícula)

4.4.1.2. Processo

4.4.1.2.1. Umidade e Espessura do Filme Líquido Externo

O perfil de umidade acompanhado durante o processo mostrou que há flutuação ao longo do tempo, que se deve, certamente, ao aparecimento de água metabólica.

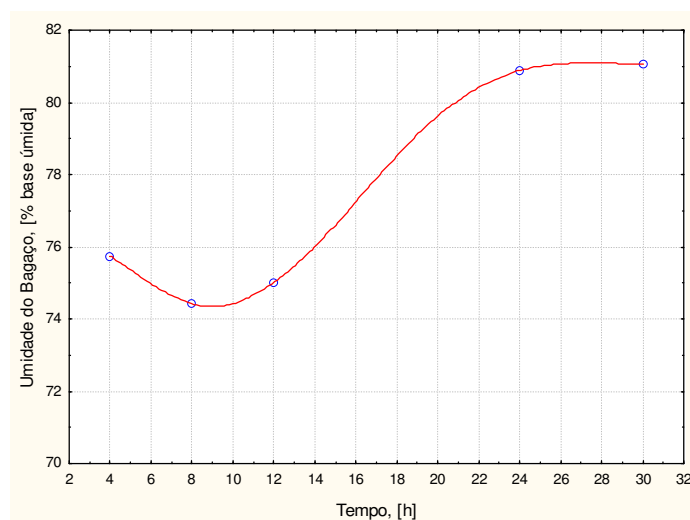


Figura 4.19. Perfil da umidade ao longo do cultivo semi-sólido

Observamos, portanto que, no início do processo (primeiras 12 horas) não há grande flutuação para a umidade no leito. Após 12 horas de cultivo, certamente pelo aparecimento de água metabólica, o bagaço apresenta umidade que pode chegar a aproximadamente 81 % em base úmida.

Assim, o filme líquido em volta da partícula também aumenta, visto que é proporcional ao percentual de água no bagaço.

O acompanhamento da espessura do filme líquido externo é mostrado na figura 4.20, determinado por microscopia óptica.

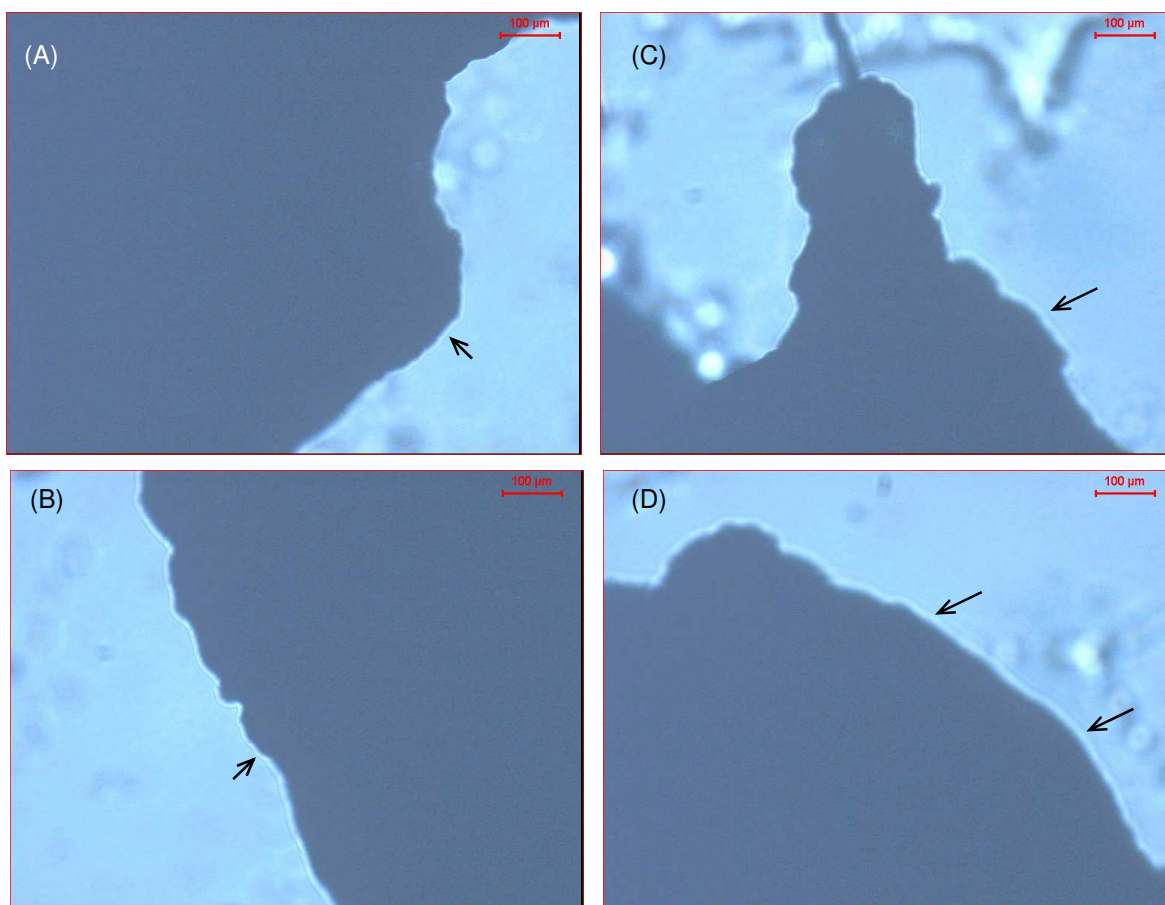


Figura 4.20. Filme líquido externo formado na partícula (mostrado pela seta) durante o cultivo (A) 4 h, (B) 8 h, (C) 12 h e (D) 24 h

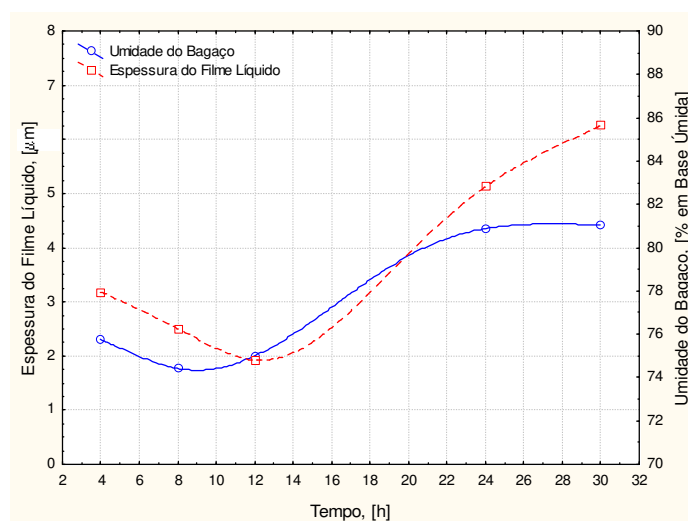


Figura 4.21. Aumento da espessura do filme líquido e da umidade ao longo do tempo

Observa-se, como era esperado, que há certa relação entre o aumento da espessura do filme líquido externo e a umidade do bagaço. Esta relação é mais fácil de ser entendida pela curva de correlação entre as duas variáveis.

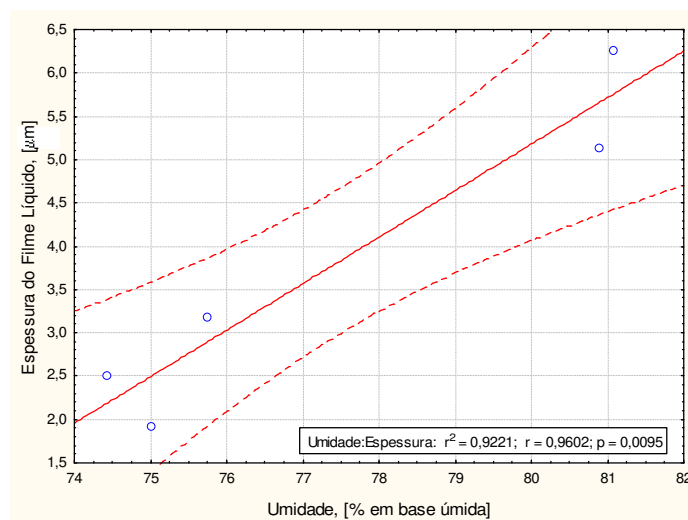


Figura 4.22. Correlação entre Aumento da espessura do filme líquido e a umidade

A correlação obtida, considerando um comportamento linear entre o aumento da umidade e o aumento da espessura no filme líquido é apresentada pela equação 4.1.

$$\text{Espessura do Filme Líquido} = +0,5372 \cdot [\text{Umidade}] - 37,7962 \quad (\text{Equação 4.1})$$

4.4.1.2.2. Acompanhamento do pH no Extrato

O extrato bruto preparado a partir do bagaço de caju fermentado apresentou o um perfil de pH mostrado na figura 4.23.

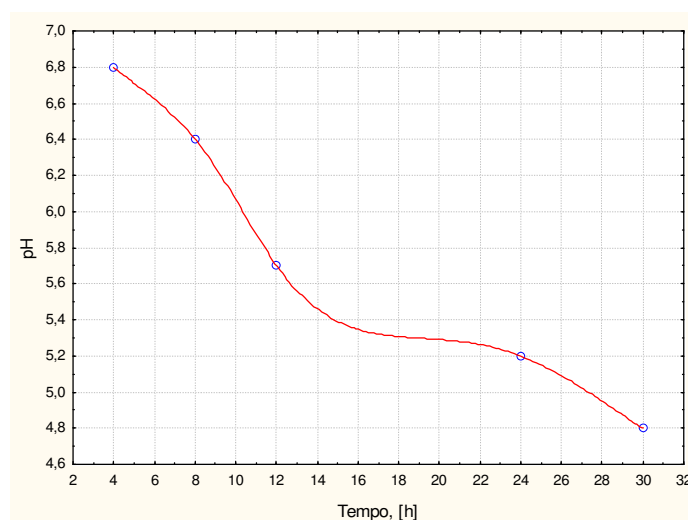


Figura 4.23. Perfil de pH no extrato bruto ao longo do cultivo semi-sólido

Observamos, ao longo do processo, que há diminuição do pH no extrato, que podemos atribuir ao aparecimento de ácido láctico, acético, fórmico e propiônico, provenientes do metabolismo microbiano.

4.4.1.2.3. Produção de Biomassa, AH e Consumo de Açúcares

No cultivo em estado sólido **semi-sólido**, a produção de biomassa bacteriana apresenta o perfil de crescimento mostrado na figura 4.24.

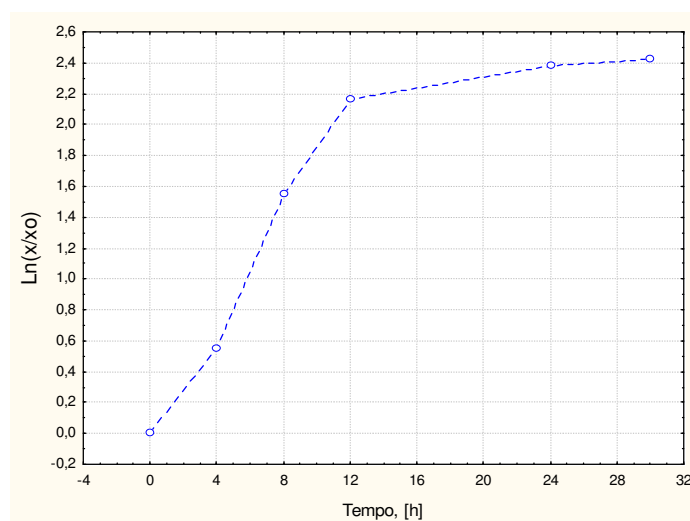


Figura 4.24. Crescimento celular ao longo do cultivo semi-sólido

Observamos, portanto, que após as 4 primeiras horas do cultivo, as células já se encontram na fase exponencial de crescimento, que se encerra após 12 horas de processo.

O perfil de consumo de substrato nos mostra que há um consumo de aproximadamente 1,8 g de açúcares presentes no meio semi-sólido ao final de 30 horas de cultivo.

A evolução de produto (AH) mostra que em 24 horas de processo o AH quantificado no extrato bruto é de 0,007 g de AH para cada 1g de bagaço processado.

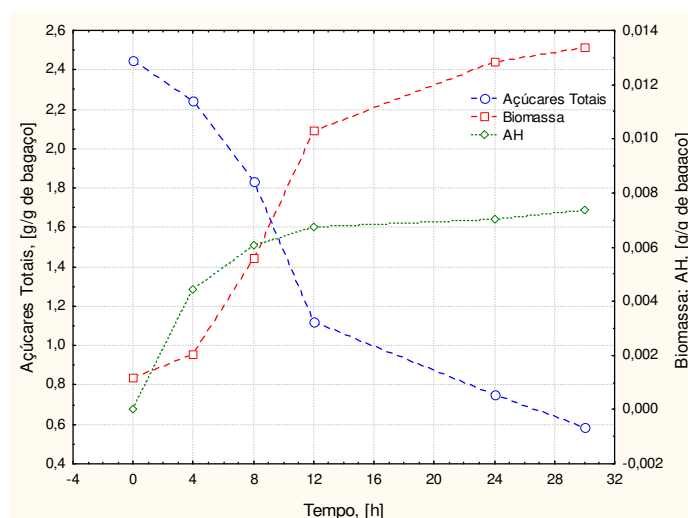


Figura 4.25. Perfil do Consumo de açúcar, produção de AH e evolução de biomassa ao longo do cultivo semi-sólido

Tabela 4.5. Parâmetros cinéticos obtidos para a fermentação semi-sólida em reator de leito fixo.

	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	μ_x	P_{max}	X_{max}	P_x	P_P
	(g/g)	(g/g)	(h ⁻¹)	(gg ⁻¹)	(gg ⁻¹)	(gg ⁻¹ h ⁻¹)	(gg ⁻¹ h ⁻¹)
Valor Calculado	0,007	0,0073	0,1869	0,0070	0,01285	0,00048	0,00029
Coefficiente de Correlação	0,9951	0,9952	0,9873	-	-	-	-

4.4.2. Transferência de Oxigênio

4.4.2.1. Taxa de Transferência de Oxigênio (N) e Taxa de Consumo de Oxigênio (R_{O_2})

A taxa de transferência de oxigênio, conforme é apresentado na figura 4.26, têm um perfil peculiar. No início do processo, a taxa manteve-se praticamente constante, com mínima flutuação entre 3,4 a 3,5 mMol/L.s. Após 12 horas de processo há um decréscimo da taxa de transferência de oxigênio, chegando a aproximadamente 1,4 mMol/L.s ao final de 30 horas de cultivo em leito fixo.

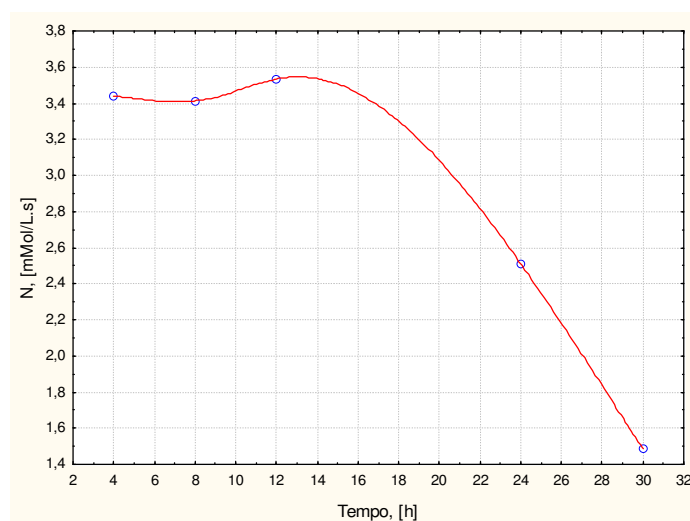


Figura 4.26. Perfil da taxa de transferência de Oxigênio ao longo do cultivo semi-sólido

Perfil similar é observado para a taxa de consumo de oxigênio (R_{O_2}) durante o cultivo semi-sólido. Há, portanto, como mostra a figura 4.27, uma mínima flutuação nas primeiras 12 horas de cultivo e posteriormente um decréscimo dessa taxa.

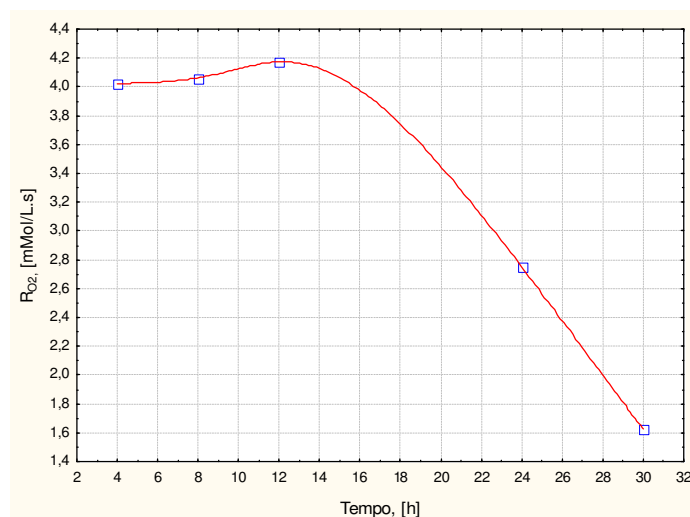


Figura 4.27. Perfil da taxa de consumo de Oxigênio ao longo do cultivo semi-sólido

Observa, se que, coerentemente, há relação entre a taxa de consumo de oxigênio e o crescimento microbiano. Após 12 horas de cultivo, há decréscimo da taxa de consumo de oxigênio, concomitante ao crescimento microbiano que já cessou.

4.4.2.2. Perfis de Oxigênio no Filme Externo e no Interior do Bagaço

O perfil de oxigênio calculado para o filme externo em cada tempo de fermentação é mostrado na figura 4.28.

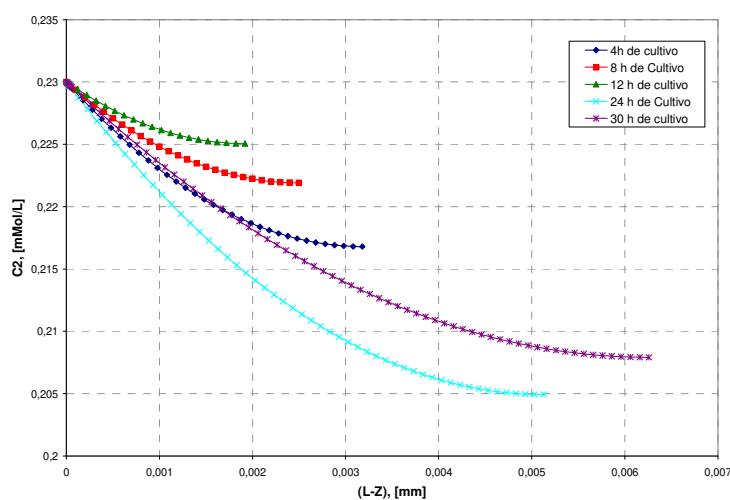


Figura 4.28. Perfis de Oxigênio no filme líquido externo ao longo do cultivo semi-sólido

Observa-se, pequena diferença entre o valor do oxigênio na interface gás-líquido, dada pelo equilíbrio, portanto a máxima solubilidade de oxigênio na fase líquida a 37 °C, e a concentração na interface com o sólido, isso se deve, em parte à delgada camada externa de líquido e à baixa difusividade de oxigênio no meio.

Observando-se os perfis de oxigênio no interior do bagaço verifica-se que há rápida queda da concentração de oxigênio na fase sólida. Isso pode estar relacionado também com a baixa solubilidade do oxigênio. Assim, para todos os perfis de oxigênio no interior dos poros da partícula, observamos que em aproximadamente 0,13 μm a concentração de oxigênio é igual a zero, portanto, não há oxigênio disponível ao microrganismo que esteja imobilizado no interior do bagaço. Pressupõe-se que haja, portanto uma zona em que o crescimento aeróbio é significativo, portanto onde não há limitação pelo oxigênio, especialmente na região de líquido externo ao sólido, enquanto que no interior do poro do bagaço há severas limitações de oxigênio.

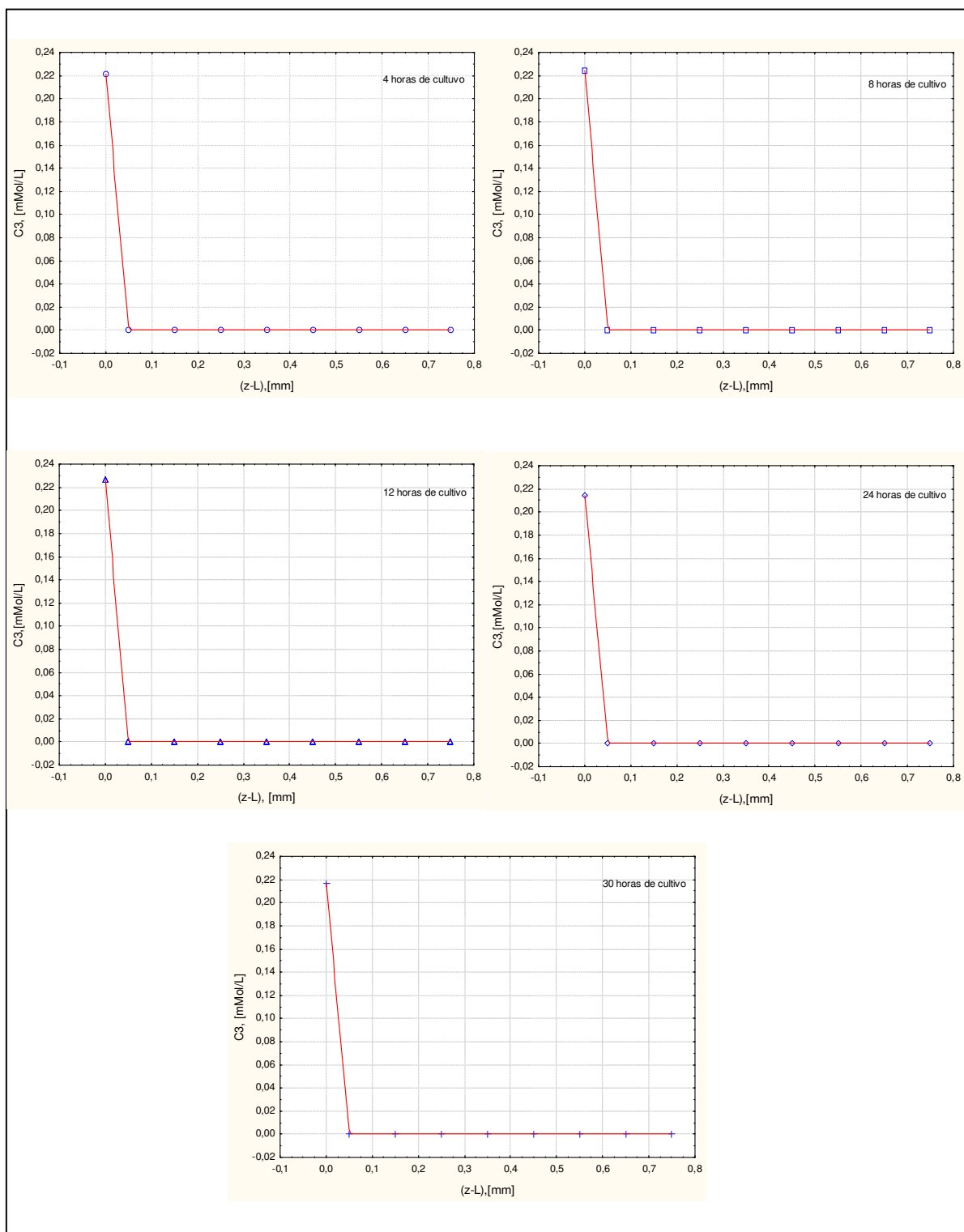


Figura 4.29. Perfis de Oxigênio no interior do bagaço

O módulo de Thiele observado (Φ) indica que a afirmação feita sobre a confirma a limitação de oxigênio no sistema.

Segundo os critérios de **Weisz**, conforme mostra **Doran** (1997), para valores de Φ acima de 3, observa-se limitações de transferência de massa.

Todos os valores obtidos para o Φ estão bem acima de 3, demonstrando assim fortes limitações de transferência de oxigênio no interior do bagaço.

Tabela 4.6 : módulo de Thiele observado (Φ) ao longo do cultivo semi-sólido

Tempo de Fermentação (h)	ϕ_o	η_{io}	Φ
4	75,44325513	0,013255	150,9
8	75,26142401	0,013287	150,5
12	75,92969904	0,01317	151,8
24	63,34087096	0,015788	126,7
30	48,45084701	0,020639	96,9

4.4.2.3. Perfil de K_La ao longo do Cultivo

Não podemos afirmar que o K_La , com se esperaria em um sistema homogêneo mantenha-se constante ao longo do tempo de processo. Isso se deve ao fato de que há variações no volume de líquido no cultivo pelo aumento da umidade do bagaço, que também acarreta mudanças na espessura do filme externo. Conforme podemos observar no perfil de oxigênio no interior do sólido, na coordenada equivalente a L_{23} , espessura da camada sólida de bagaço, a concentração de oxigênio é igual a zero, portanto o valor de K_La para todo o cultivo será igual a :

$$N/(C^s_{O_2}-0) = K_La \quad \text{(Equação 4.2)}$$

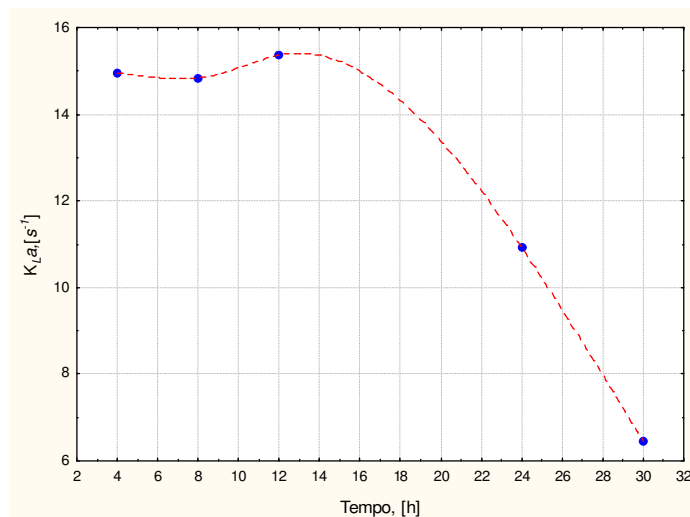


Figura 4.30. Perfil de K_{La} ao longo do cultivo semi-sólido

O máximo valor de K_{La} é atingido, portanto, no máximo valor da taxa de transferência de oxigênio, que é observada em 12 horas, assim, também fazemos correlação entre esta variável, o K_{La} , e a umidade total do bagaço.

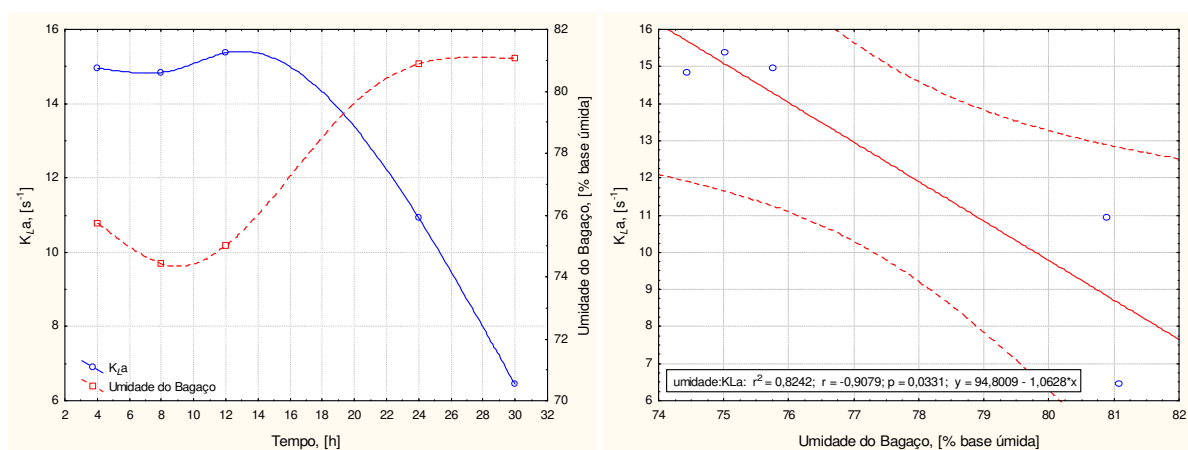


Figura 4.31. Perfil de K_{La} e umidade do bagaço e correlação entre essas duas variáveis.

As correlações entre a unidade o K_La , mostradas anteriormente na figura 4.44. indicam que há uma correlação entre estas variáveis, conforme mostramos pela equação 4.3.

$$KLa = 94,8009 - 1,0628 * [\text{Umidade Total}] \quad (\text{Equação 4.3.})$$

4.4.2.4. Reprodutibilidade do Processo de Produção de AH em FSS

Dois experimentos foram realizados no sistema de colunas de leito fixo, observando as mesmas condições de cultivo, observou-se, nessas duas corridas experimentais independentes que os perfis de produção de AH e de evolução de biomassa bacteriana são semelhantes, constatando-se a reprodutibilidade desses processos quando conduzidos sob as mesmas condições operacionais.

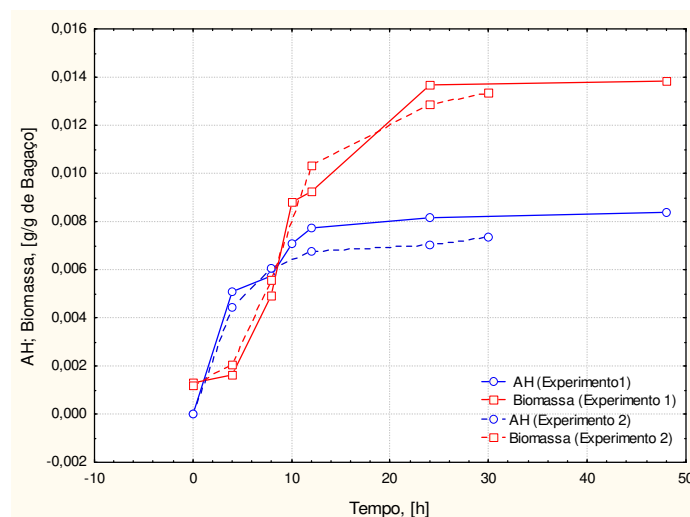


Figura 4.32. Perfis de produção de AH e Biomassa para os experimentos 1 e 2 em colunas de leito fixo.

4.5. Caracterização da Massa Molar do AH Produzido

A caracterização da massa molar do AH produzido em fermentação submersa nos ensaios feitos em frascos de *Erlemeyer* foi feita através da avaliação do tempo médio de retenção do analito (AH) na coluna de exclusão por tamanho, dessa forma, a calibração apresentada em anexo deste trabalho foi usada nessa caracterização, dessa forma, o resultado foi obtido sob a forma de massa molar média do polímero produzido.

No decorrer desse trabalho, o desenvolvimento da metodologia de fracionamento do AH, feita por **Sousa** (2007) em seu trabalho de mestrado pela *Universidade Federal do Ceará* nos permitiu avaliar a distribuição da massa molar do AH produzido na fermentação, assim, os ensaios feitos em biorreator para a produção de AH partindo de meio de suco de caju *in natura* e clarificado e os ensaios realizados em sistemas de colunas de leito fixo (FSS) foram caracterizados utilizando a metodologia de fracionamento do AH produzido em coluna de exclusão em gel (GPC) em sistema CLAE. A caracterização dessas amostras foi feita em parceria com o *Grupo de Pesquisas em Separação por Adsorção (GPSA)* da *Universidade Federal do Ceará*.

A massa molar do AH produzido por fermentação na condição de não-suprimento de oxigênio ao meio flutuou entre um mínimo valor 17106 Da, no tempo inicial de fermentação e um valor máximo observado ao final do ensaio (24 h) de 19748 Da. Ao longo da fermentação, os valores para a massa molar apresentaram-se dispersos em torno de um valor médio de 18390.5 Da. (figura 4.33.).

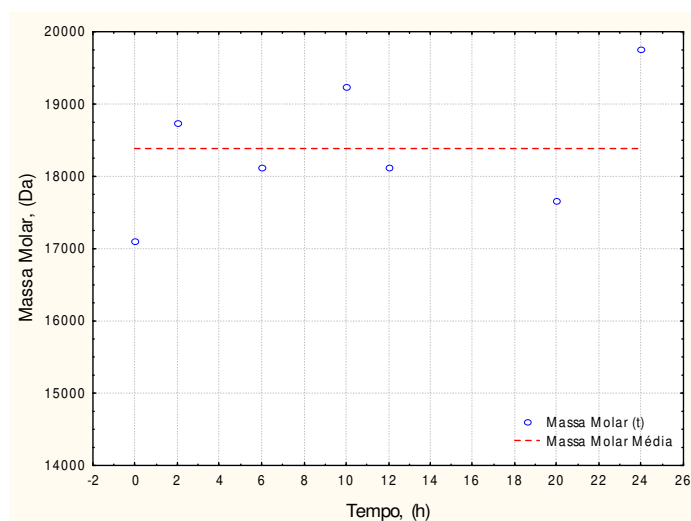


Figura 4.33. Acompanhamento da massa molar do AH produzido por fermentação ao longo do tempo

A Figura 4.34. mostra a sobreposição dos cromatogramas das amostras de AH produzido em meio de suco de caju *in natura* por fermentação submersa em biorreator com aeração, após uma, duas e três precipitações em etanol e ressuspensões em NaNO_3 (0,1 M). As condições cromatográficas empregadas nesta análise foram solução de 0,1 M de NaNO_3 como fase móvel, coluna *Shodex*, fluxo de 0,8 mL/min, temperatura ambiente, volume de injeção de 20 μL e o RI como sistema de detecção.

Com relação às proteínas tem-se as análises feitas em detector de absorção no U.V./Visível a 280 nm das amostras de AH (após uma e três precipitações em etanol e ressuspensões em solução salina) conforme se observa nas figuras 4.35. e 4.36., respectivamente.

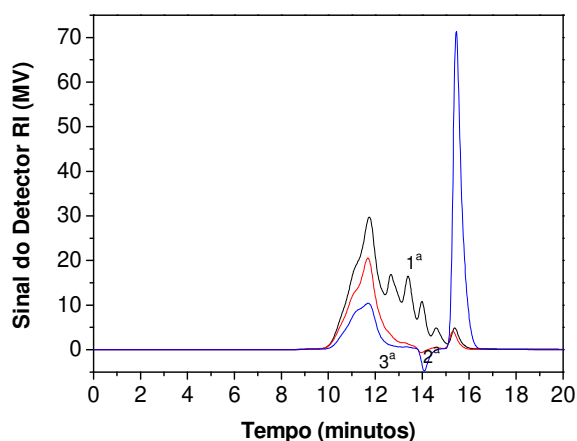


Figura 4.34. Sobreposição dos cromatogramas das amostras de AH produzidas em Fermentação do suco *in natura* solubilizadas em NaNO_3 0,1 M após uma (1ª—), duas (2ª —) e três (3ª —) precipitações em EtOH.

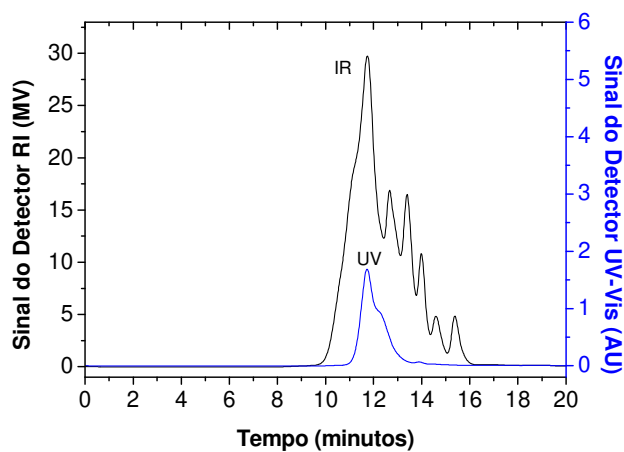


Figura 4.35. Cromatograma da amostra de AH produzida em Fermentação Submersa em meio de suco de caju *in natura* solubilizada em NaNO_3 0,1 M após uma precipitação. RI (IR—) e UV/Vis em 280 nm (UV—).

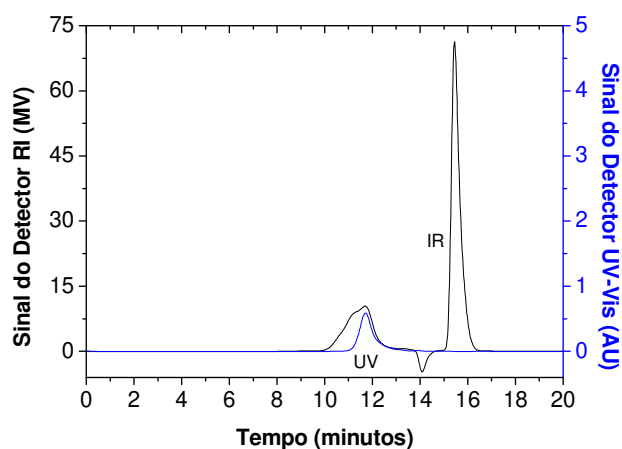


Figura 4.36. Cromatograma da amostra de AH produzida por fermentação submersa utilizando suco de caju in natura como meio após três precipitações em EtOH. RI (IR—) e UV/Vis em 280 nm (UV—).

O fracionamento polimérico das amostras de AH (após uma e três precipitações em etanol e ressuspensões em solução salina) é mostrado nas figuras 4.37 e 4.38, respectivamente.

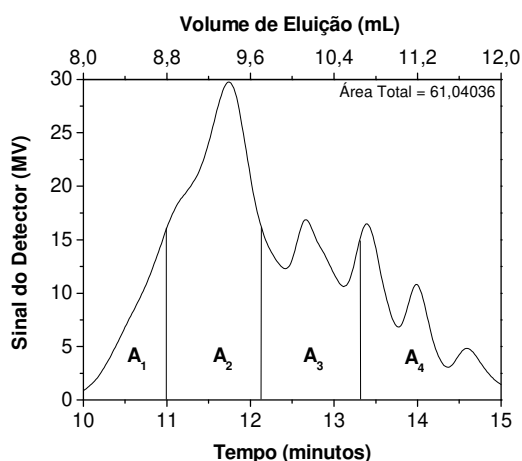


Figura 4.37. Fracionamento polimérico da amostra de AH produzida fermentação submersa utilizando suco de caju in natura como meio após uma precipitação em EtOH.

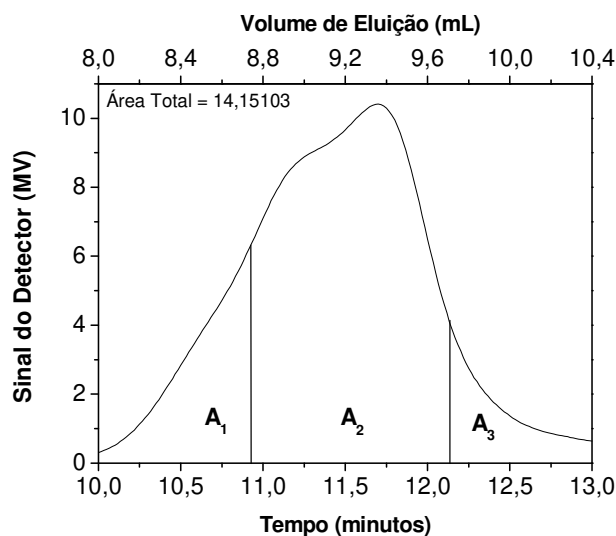


Figura 4.38. Fracionamento polimérico da amostra de AH produzida em fermentação submersa após três precipitações em EtOH no intervalo de 8 a 10,4 mL de volume de eluição (tempo de retenção de 10 a 13 minutos).

O percentual em área calculado para cada massa molar nas amostras de AH (após uma e três precipitações em etanol e ressusensões em solução salina) podem ser observados nas figuras 4.39 e 4.40, respectivamente.

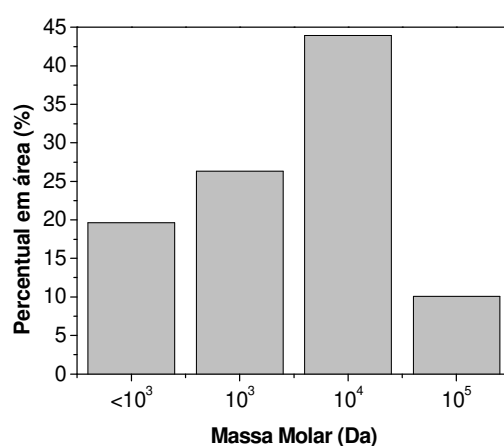


Figura 4.39. Distribuição da massa molar da amostra de AH produzida por fermentação de suco in natura com aeração após uma precipitação em EtOH com relação ao percentual da área de fracionamento polimérico.

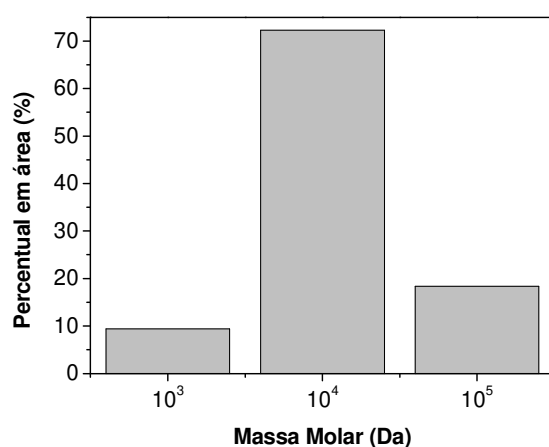


Figura 4.40. Distribuição da massa molar da amostra de AH por fermentação de suco *in natura* com aeração após três precipitações em EtOH com relação ao percentual da área de fracionamento polimérico.

Pela análise da amostra de AH produzida por fermentação submersa em reator com suprimento de oxigênio utilizando suco de caju *in natura* como meio após três precipitações em etanol e ressuspensões em NaNO_3 (0,1 M) com relação a massa molar, obteve-se os seguintes valores: $\overline{M}_n = 2,52 \times 10^4$ Da e $\overline{M}_w = 5,34 \times 10^4$ Da. A polidispersividade calculada para essa amostra foi de 2,12.

A Figura 4.41 mostra a sobreposição dos cromatogramas das amostras de AH produzido por fermentação submersa com suco de caju clarificado, após uma, duas e três precipitações em etanol e ressuspensões em NaNO_3 (0,1 M). As condições cromatográficas empregadas nesta análise foram as mesmas empregadas anteriormente, solução de 0,1 M de NaNO_3 como fase móvel, coluna Shodex OHPak SB806M HQ (7,8 x 300 mm), fluxo de 0,8 mL/min, temperatura ambiente, volume de injeção de 20 μL e o índice de refração (RI) como sistema de detecção.

Verifica-se, pela Figura 4.41, a presença de um pico cromatográfico intenso no intervalo de tempo de retenção de 15 a 16 minutos, explicado pela presença de etanol nas amostras de AH (utilizado nas etapas de pré-purificação).

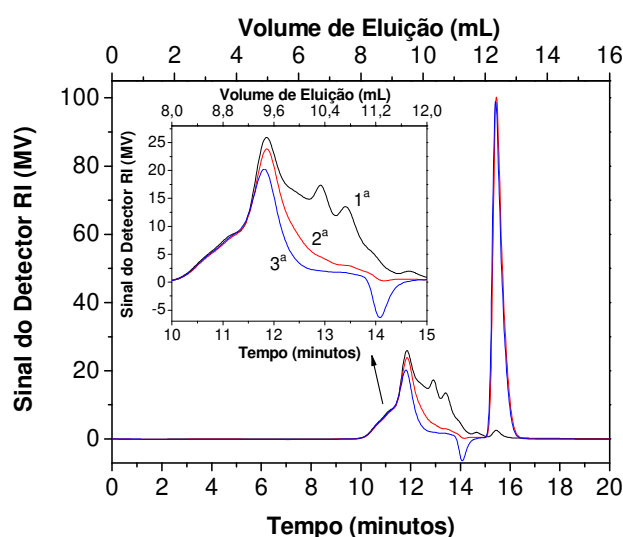


Figura 4.41. Sobreposição dos cromatogramas das amostras de AH produzidas em fermentação submersa com suco de caju clarificado em reator com aeração após uma (1ª —), duas (2ª —) e três (3ª —) precipitações em EtOH,. Uma ampliação do pico cromatográfico de AH é mostrado no canto superior esquerdo.

A presença de proteínas foi verificada pela análise da amostra de AH com uso de detector de absorção no UV/Visível a 280 nm (após uma e três precipitações em etanol e ressuspensões em solução salina) conforme é observado nas Figuras 4.42 e 4.43, respectivamente.

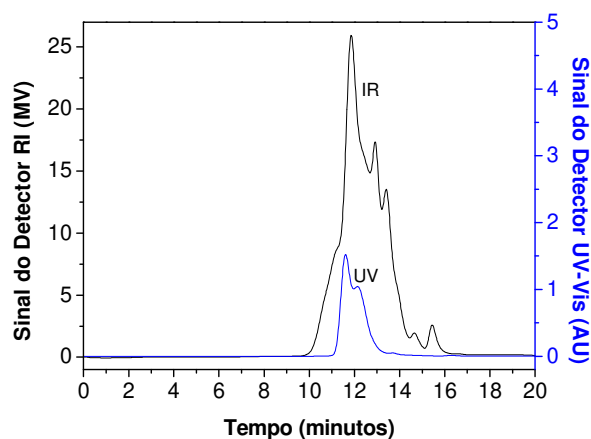


Figura 4.42. Cromatograma da amostra de AH produzida em fermentação submersa com suco de caju clarificado após uma precipitação em EtOH. RI (IR—) e UV/Vis em 280 nm (UV—).

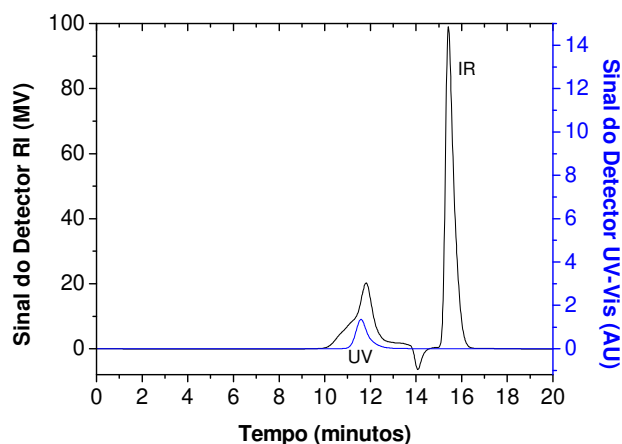


Figura 4.43. Cromatograma da amostra de AH produzida em fermentação submersa com suco de caju clarificado após três precipitações em EtOH. RI (IR—) e UV/Vis em 280 nm (UV—). Uma ampliação do pico cromatográfico de AH é ilustrado no canto superior esquerdo.

O fracionamento polimérico da amostra de AH (após uma e três precipitações em etanol e ressusensões em solução salina) pode ser observado nas figuras 4.44 e 4.45., respectivamente.

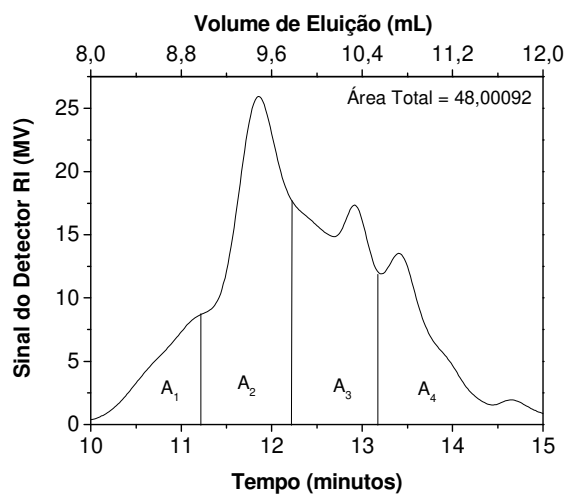


Figura 4.44. Fracionamento polimérico da amostra de AH produzida em fermentação submersa com suco de caju clarificado após uma precipitação em EtOH no intervalo de 8,0 a 12,0 mL de volume de eluição (correspondente ao intervalo de tempo de retenção de 10 a 15 minutos).

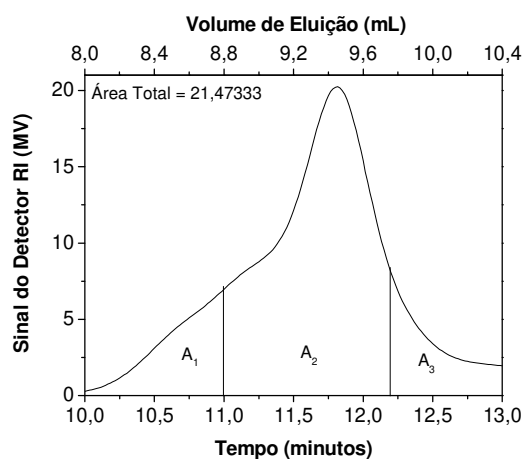


Figura 4.45. Fracionamento polimérico da amostra de AH produzida em Fermentação submersa com suco de caju clarificado após três precipitações em EtOH no intervalo de 7,2 a 10,4 mL de volume de eluição (correspondente ao intervalo de tempo de retenção de 9 a 13 minutos).

O percentual em área de cada massa molar na amostra de AH (após uma e três precipitações e ressuspensões em solução salina) pode ser observado nas figuras 4.46 e 4.47.

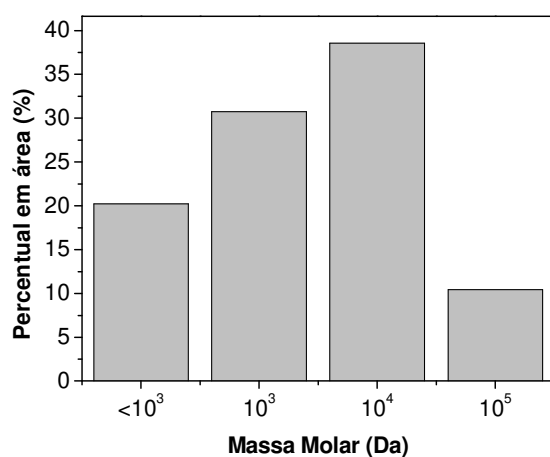


Figura 4.46. Distribuição da massa molar da amostra de AH produzida em fermentação submersa com suco de caju clarificado após uma precipitação em EtOH com relação ao percentual da área de fracionamento polimérico..

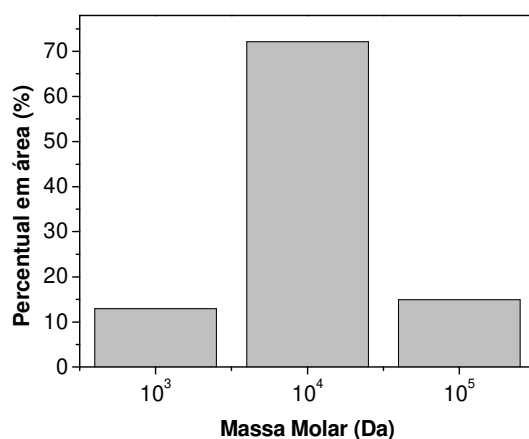


Figura 4.47. Distribuição da massa molar da amostra de AH produzida em fermentação submersa com suco de caju clarificado após três precipitações em EtOH com relação ao percentual da área de fracionamento polimérico.

A amostra de AH produzida em fermentação submersa com suco de caju clarificado em reator com suprimento de oxigênio, após três precipitações em etanol e ressuspensões em NaNO_3 (0,1 M) apresentou os seguintes valores para: $\overline{M}_n = 1,52 \times 10^4$ Da e $\overline{M}_w = 4,85 \times 10^5$ Da. A polidispersividade calculada para a amostra foi de 3,19.

A figura 4.60 mostra a sobreposição dos cromatogramas das amostras de AH produzido por FSS, utilizando bagaço de caju e recuperado por lixiviação, após uma, duas e três precipitações em etanol e ressuspensões em NaNO_3 (0,1 M). As condições cromatográficas empregadas nesta análise foram: solução de 0,1 M de NaNO_3 como fase móvel, coluna Shodex OHPak SB806M HQ (7,8 x 300 mm), fluxo de 0,8 mL/min, temperatura ambiente, volume de injeção de 20 μL e o índice de refração (RI) como sistema de detecção.

Um pico cromatográfico intenso no intervalo de tempo de retenção de 15 a 16 minutos é observado na figura 4.60, este pico é explicado pela presença de etanol nas amostras de AH (utilizado nas etapas de pré-purificação). A figura 4.61 mostra o cromatograma de uma amostra de etanol 10% analisado nas mesmas condições cromatográficas utilizadas para as amostras.

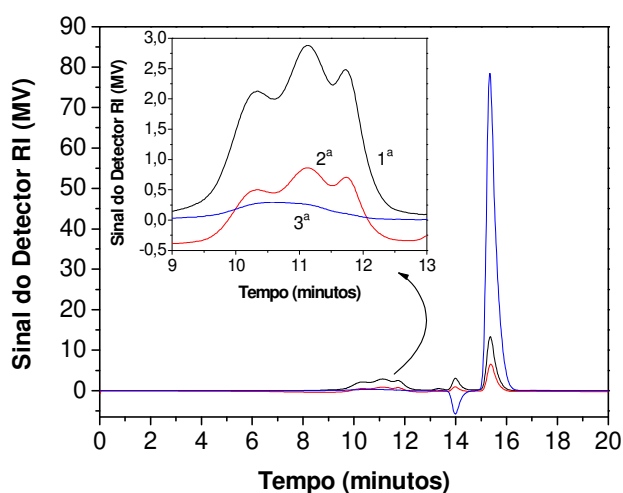


Figura 4.48. Sobreposição dos cromatogramas das amostras de AH produzidas em FES após uma (1^a —), duas (2^a —) e três (3^a —) precipitações em EtOH. Uma ampliação do pico cromatográfico de AH é mostrado no canto superior esquerdo.

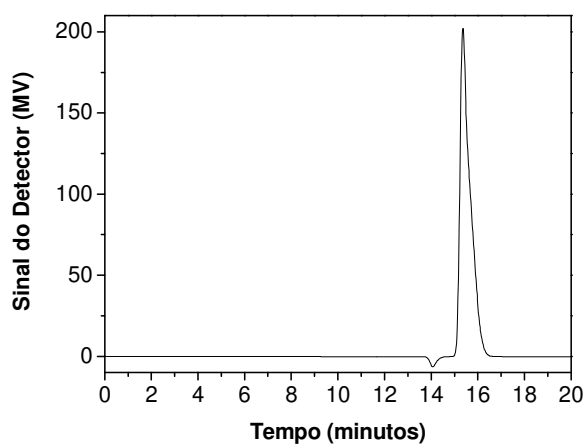


Figura 4.49. Cromatograma de uma amostra de etanol 10%, utilizando coluna Shodex, fluxo de 0,8 mL/min, solução de 0,1 M de NaNO_3 como fase móvel, temperatura ambiente, pressão na coluna de 220 psi, volume de injeção de 20 μL e o RI como sistema de detecção.

Com relação à presença de proteínas tem-se as análises das amostras de AH (após uma e três precipitações em etanol e ressusensões em solução salina) apresentadas nas Figuras 4.50 e 4.51, respectivamente.

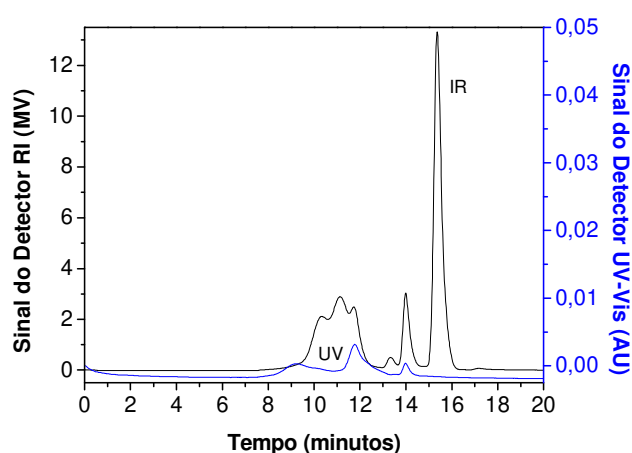


Figura 4.50. Cromatograma da amostra de AH produzida em FSS uma precipitação em EtOH. RI (IR—) e UV/Vis em 280 nm (UV—).

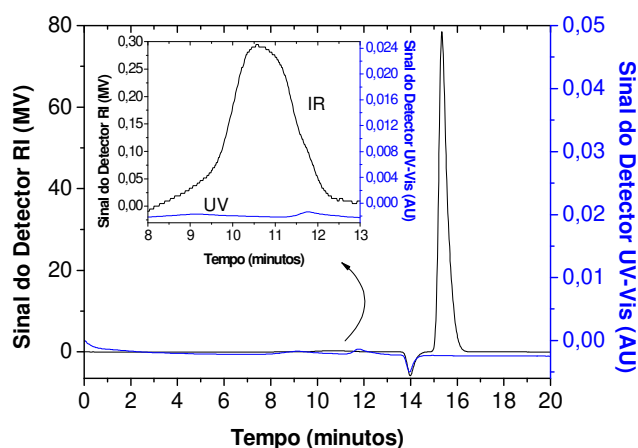


Figura 4.51. Cromatograma da amostra de AH produzida em FSS após três precipitações em EtOH. RI (IR—) e UV/Vis em 280 nm (UV—). Uma ampliação do pico cromatográfico de AH é ilustrado no canto superior esquerdo.

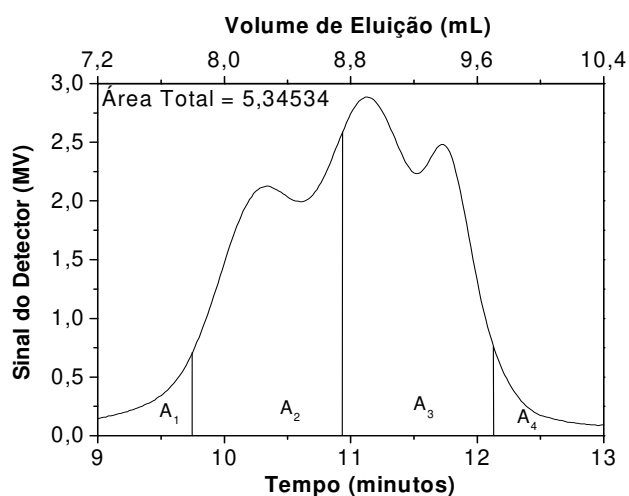


Figura 4.52. Fracionamento polimérico da amostra de AH produzida em FES solubilizada em NaNO_3 0,1 M após uma precipitação em EtOH no intervalo de 7,2 a 10,4 mL de volume de eluição (correspondente ao intervalo de tempo de retenção de 9 a 13 minutos)

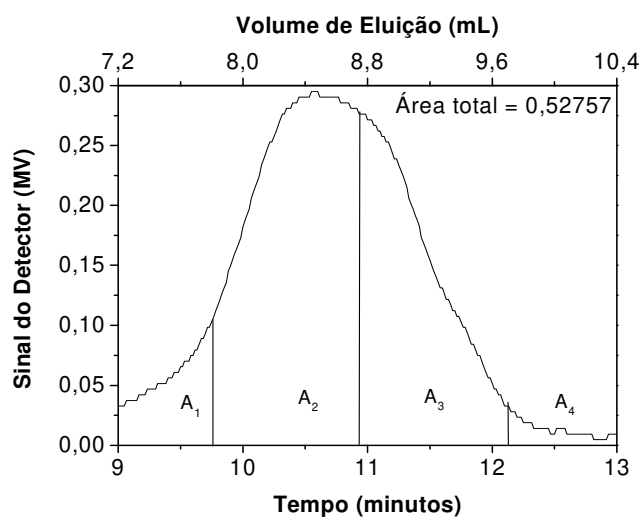


Figura 4.53. Fracionamento polimérico da amostra de AH produzida em FES após três precipitações em EtOH no intervalo de 7,2 a 10,4 mL de volume de eluição (correspondente ao intervalo de tempo de retenção de 9 a 13 minutos).

O fracionamento polimérico das amostras de AH (após uma e três precipitações em etanol e ressuspensões em solução salina) pode ser observado nas figuras 4.52 e 4.53, respectivamente.

O percentual em área de cada massa molar nas amostras de AH (após uma e três precipitações em etanol e ressuspensões em solução salina) é apresentado nas figuras 4.54 e 4.55.

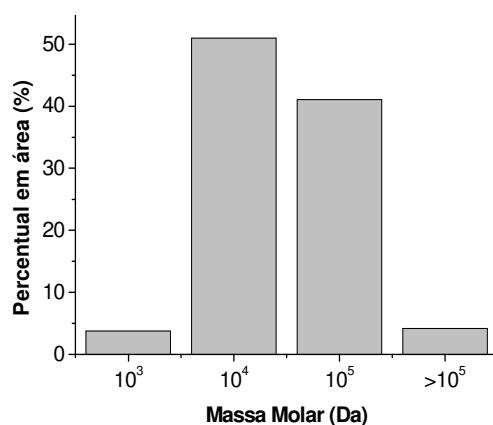


Figura 4.54. Distribuição da massa molar da amostra de AH produzida em FES após uma precipitação em EtOH com relação ao percentual da área de fracionamento polimérico.

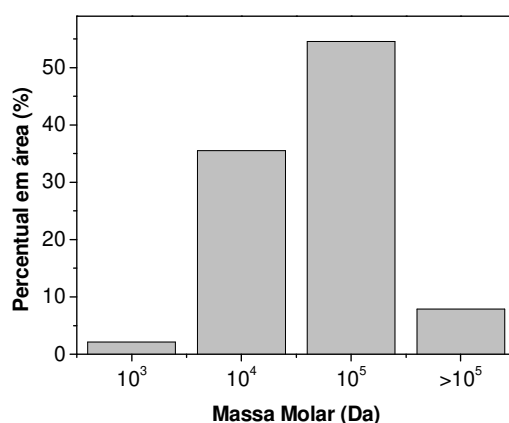


Figura 4.55. Distribuição da massa molar da amostra de AH produzida em FES após três precipitações em EtOH com relação ao percentual da área de fracionamento polimérico.

A análise da amostra de AH produzida em FES, após três precipitações em etanol e ressuspensões em NaNO_3 (0,1 M) com relação a massa molar, obteve-se os seguintes valores: $\overline{M}_n = 7,97 \times 10^4$ Da e $\overline{M}_w = 2,23 \times 10^5$ Da. A polidispersividade calculada para a amostra foi de 2,80.

Com relação à distribuição de massa molar, pode-se afirmar que as amostras de AH produzidas através da fermentação de suco clarificado em relação ao AH produzido a partir do suco *in natura* apresentam, após uma precipitação em etanol, um maior percentual de moléculas com massa molar na ordem de 10^3 . A fermentação em estado sólido, conforme se observa nos resultados expostos, gera AH de massa molar elevada (da ordem de grandeza de 10^4 e 10^5 Da), enquanto que a fermentação submersa produz maiores quantidades de AH massa molar da ordem de 10^3 Da. Observa-se, também que durante as etapas de pré-purificação perde-se significativas quantidades AH de massa molar mais baixa. Com relação às proteínas, observa-se que a contaminação protéica é pequena (comparando os sinais no detector), principalmente no AH obtido da fermentação em estado sólido.

Com relação à polidispersividade, observa-se que é maior para a amostra de AH produzido a partir de suco clarificado.

4.6. Análise Química por Espectroscopia no Infravermelho

Haxaire et al. (2002) em seu estudo sobre a hidratação do AH através de análises espectroscópicas no Infravermelho apresentam que a assinatura característica desse polissacarídeo no I.V. pode ser observada por:

1. Bandas em torno de 600 cm^{-1} que correspondem às moléculas residuais de H_2O . Vibrações rotacionais da molécula inteira de H_2O ;
2. A intensa banda que se estende entre 950 a 1200 cm^{-1} , correspondendo às vibrações de estiramento de C-O ($\nu_{\text{C-OH}}$) nos álcoois; O ombro em 1160 cm^{-1} é atribuído ao C-O-C antisimétrico em grupos glicosídicos;

3. Bandas na faixa de 1400 cm^{-1} , que seja de um simétrico $\nu_{\text{COO}^-}^s$ no grupo carboxilato simétrico $[\text{COO}^-]$ ou o CO^- no mesmo grupo que indica assimetria, permitindo distinguir de duas porções do $\text{C}=\text{O}$ e o CO^- ;
4. Bandas que se estendem de 1500 a 1700 cm^{-1} e são a superposição de bandas de amidas I e II e as bandas e de várias bandas de carbonila e de carboxila $\nu_{\text{C}=\text{O}}$;
5. Uma banda em torno de 2900 cm^{-1} , que é $\nu_{\text{C-H}}$ (estiramento do C-H);
6. Uma banda larga e intensa que se estende de 2500 a 3600 cm^{-1} . Esta é certamente devido a estiramentos $\nu_{\text{N-H}}$ e $\nu_{\text{O-H}}$ e bandas que pertencem aos grupos do N-H e ao O-H acoplados em ligações de hidrogênio. O ombro em 3100 cm^{-1} é característico de um ressonância de Fermi do $\nu_{\text{N-H}}$ com sobretudo da banda da amida II.

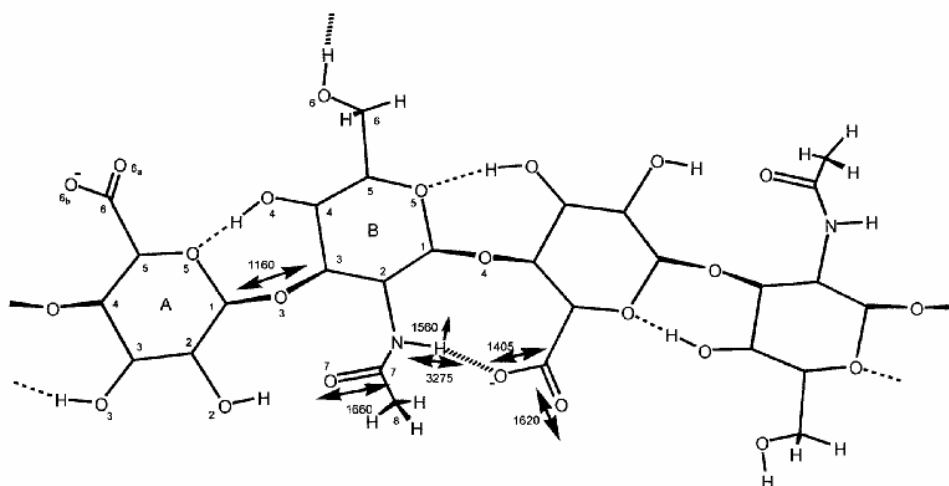


Figura 4.56. Representação do AH e os respectivos comprimentos de onda identificados para cada grupo na molécula.

As figuras 4.57, 4.58 e 4.59 apresentam os espectros no infravermelho do AH produzido nos diferentes processos.

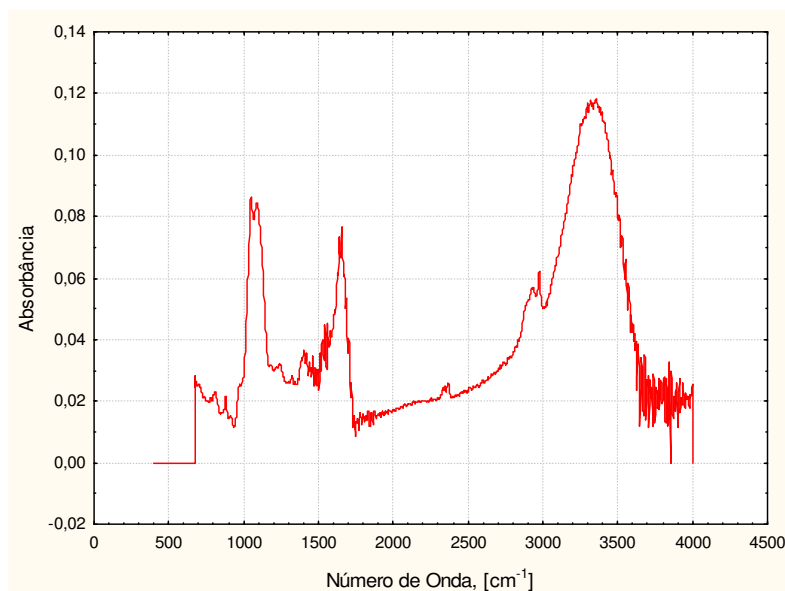


Figura 4.57. Espectro no infravermelho obtido para a amostra de AH produzida em fermentação submersa com suprimento de aeração utilizando como substrato meio de suco de caju in natura.

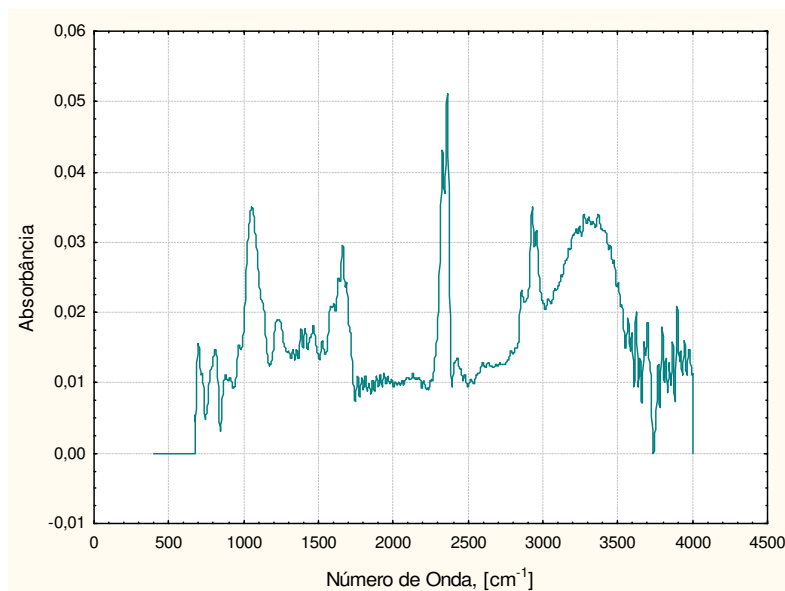


Figura 4.58. Espectro no infravermelho obtido para a amostra de AH produzida em fermentação submersa com suprimento de aeração utilizando como substrato meio de suco de caju clarificado.

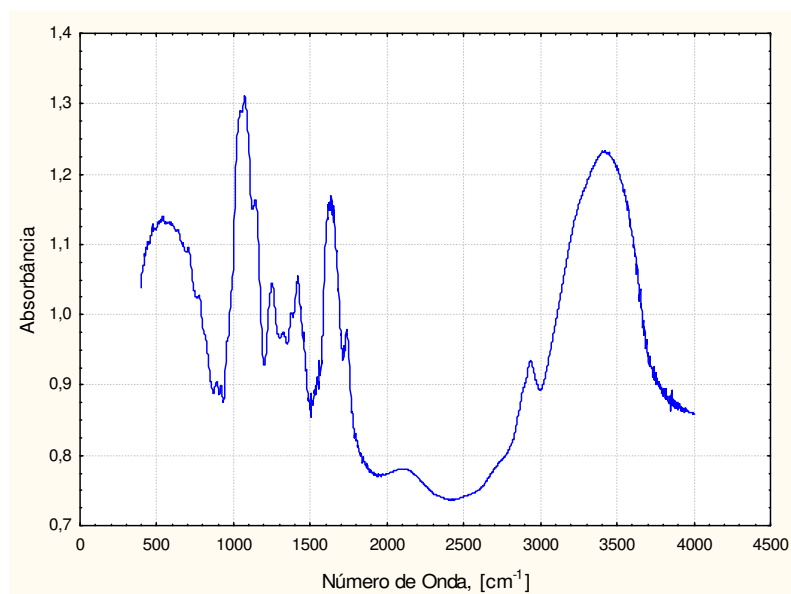


Figura 4.59. Espectro no infravermelho obtido para a amostra de AH produzida em fermentação semi-sólida em reator de leito fixo.

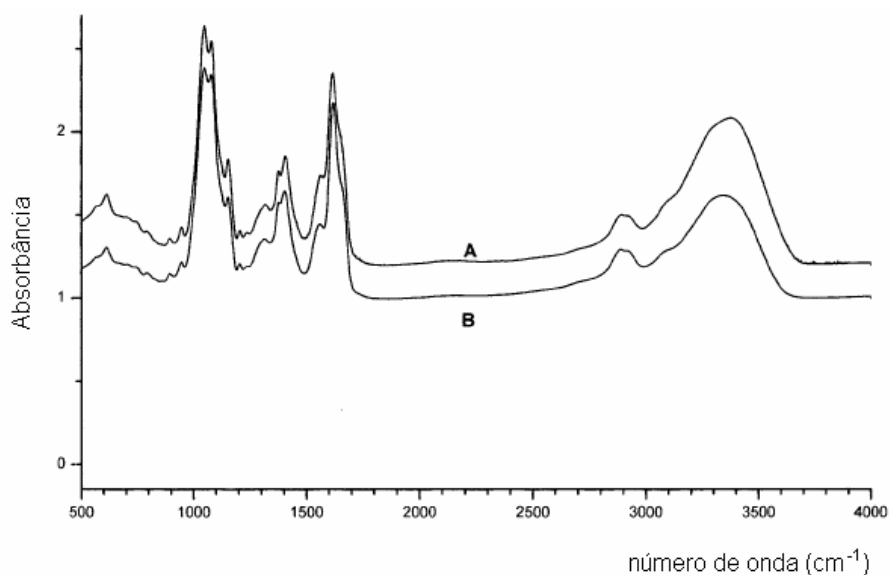


Figura 4.60. Espectro no infravermelho característico do AH obtido por Haxaire et al. (2002).

Observa-se que todos os espectros mostrados nas figuras apresentam as *assinaturas* características para moléculas de AH apresentadas por **Haxaire** et al. (2002). Diferenças entre os espectros estão intimamente ligados ao grau de hidratação da molécula e à características de pureza dessas amostras.

O espectro obtido para a amostra produzida em FSS foi feito em pastilha de KBr com análise em um equipamento FTIR (*Fourier Transform Infrared*) *Bomem MB-Series, Modelo B100*, no *Instituto de Química* da Universidade Estadual de Campinas, em enquanto as outras amostras (produzidas por fermentação submersa) foram analisadas diretamente em cristal de Germânio (técnica rápida) em um equipamento *Thermonicolet IR 200* do *Laboratório de Síntese de Substâncias Orgânicas Bioativas* do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Os espectros apresentados nas figuras 4.57 e 4.58 apresentam bandas próximas à 2500 cm^{-1} , características do CO_2 . Nessa técnica, a interferência da atmosfera de CO_2 gera essa banda de absorção no espectro, mais atenuada para o espectro da figura 4.57 e mais intensa para o espectro apresentado na figura 4.58.

4.7. Caracterização Reológica

O comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento do meio de fermentação ao longo do processo é mostrado nas figuras 4.61 e 4.62. A figura 4.61 mostra o comportamento da viscosidade em função de $\dot{\gamma}$ ao longo do tempo de fermentação para o processo de produção de AH com suco de caju *in natura*. A figura 4.62 mostra a o comportamento da viscosidade ao longo do tempo de fermentação para o processo com suco de caju clarificado. Em ambos os casos, observamos ser crescente a viscosidade aparente do meio de fermentação, isto é atribuído à evolução de AH no meio ao longo do cultivo submerso.

Observa-se pelo gráfico 4. 61, que, com o aumento de $\dot{\gamma}$ a viscosidade decai, para todos os perfis apresentados, no entanto esse comportamento muda

em $\dot{\gamma}$ aproximadamente igual a 672 s^{-1} , quando observamos o aumento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento.

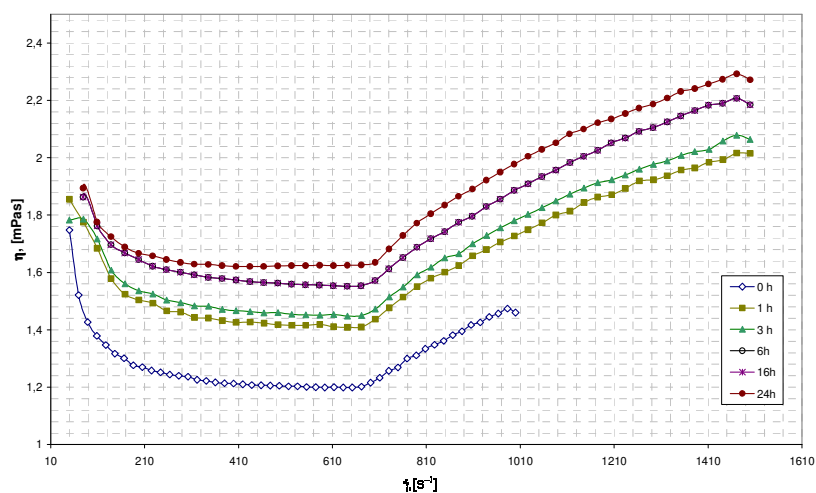


Figura 4.61. Comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento ao longo do processo fermentativo (suco de caju in natura).

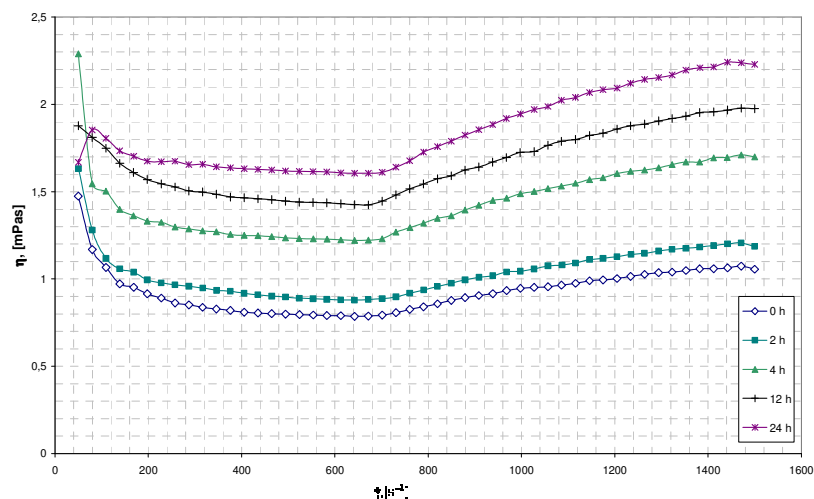


Figura 4.62. Comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento ao longo do processo fermentativo (suco de caju clarificado).

A mesma observação pode ser feita para o gráfico 4. 62, no entanto, é em 701 s^{-1} que a viscosidade passa a aumentar com o aumento da taxa de cisalhamento.

Esse comportamento de aumento da viscosidade com o aumento de $\dot{\gamma}$ observado para os perfis apresentados nas figuras 4.61 e 4.62 pode ser justificado pelo enovelamento das cadeias poliméricas do AH.

As curvas de fluxo, que mostram a relação da tensão de cisalhamento com o $\dot{\gamma}$ são mostradas nas figuras 4.63 e 4.64.

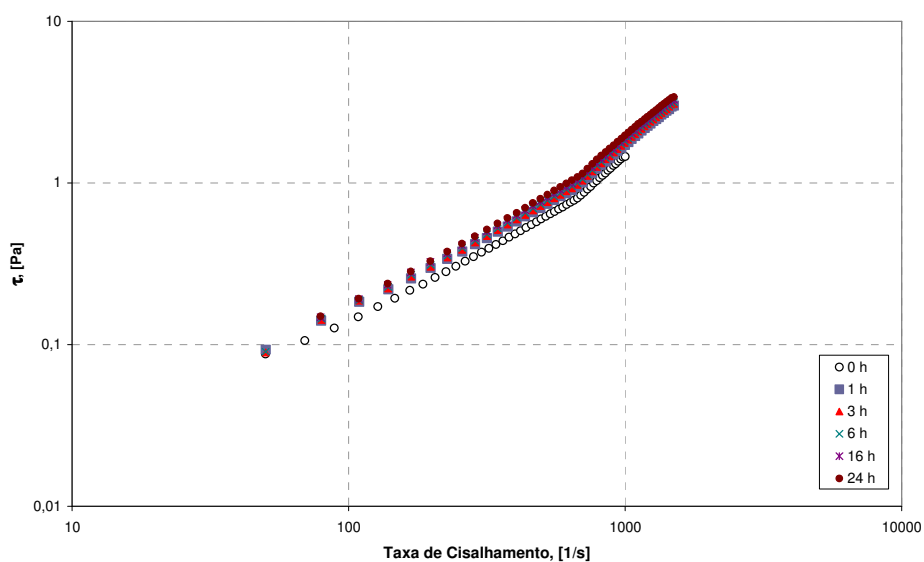


Figura 4.63. Comportamento da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento ao longo do processo fermentativo (suco de caju *in natura*).

Observa-se, portanto, a mudança do perfil τ em 672 s^{-1} . Tal comportamento, justificado através do enovelamento das cadeias de AH, também pode ser observado na figura 4.63.

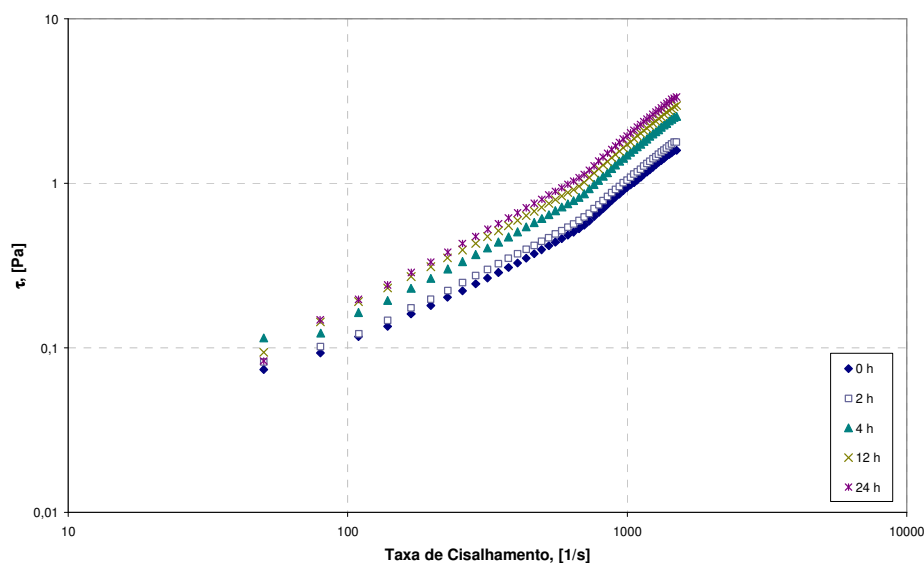


Figura 4.64. Comportamento da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento ao longo do processo fermentativo (suco de caju clarificado).

Através do ajuste $\log(\tau) = f[\log(\dot{\gamma})]$ é possível ajustar dois modelos de **Ostwald- Waele** para cada perfil.

$$\eta = k(\dot{\gamma})^{n-1} \quad (\text{Equação 2.10})$$

Para o meio de suco de caju *in natura* fermentado, os parâmetros do modelo de **Ostwald- Waele** são mostrados na tabela 4.7. Os parâmetros do modelo de **Ostwald- Waele** para meio de suco de caju clarificado fermentado são mostrados na tabela 4. 8.

Tabela 4.7. Parâmetros do modelo de **Ostwald- Waele** para meio de suco de caju *in natura* fermentado.

Tempo de Fermentação (h)	$\dot{\gamma} < 672 \text{ s}^{-1}$		$\dot{\gamma} > 672 \text{ s}^{-1}$	
	n	k	n	k
0	0,89	2,63	1,53	4,41
1	0,89	2,56	1,39	3,93
3	0,91	2,60	1,43	4,07
6	0,91	2,60	1,43	4,06
16	0,92	2,20	1,44	4,06
24	0,94	2,64	1,42	3,99

Tabela 4.8. Parâmetros do modelo de **Ostwald- Waele** para meio de suco de caju *clarificado* fermentado.

Tempo de Fermentação (h)	$\dot{\gamma} < 701 \text{ s}^{-1}$		$\dot{\gamma} > 701 \text{ s}^{-1}$	
	n	k	n	k
0	0,80	2,55	1,39	4,18
2	0,81	2,55	1,40	4,20
4	0,84	2,47	1,41	4,08
12	0,89	2,55	1,40	3,99
24	0,96	2,67	1,43	4,01

Assim, observamos o meio de fermentação para $\dot{\gamma} < 672 \text{ s}^{-1}$ (*in natura*) e $\dot{\gamma} < 701 \text{ s}^{-1}$ (clarificado) comportando-se como um fluido pseudoplástico e para $\dot{\gamma} > 672 \text{ s}^{-1}$ (*in natura*) e $\dot{\gamma} > 701 \text{ s}^{-1}$ (clarificado) comportando-se como um fluido dilatante.

4.8. Clarificação do Suco de Caju

A clarificação do suco de caju, feita conforme **Cianci et al. (2005)** apresentou perfil de fluxo acumulado (J_a) e fluxo permeado pontual (J_p) mostrado nas figuras 4.65 e 4.66.

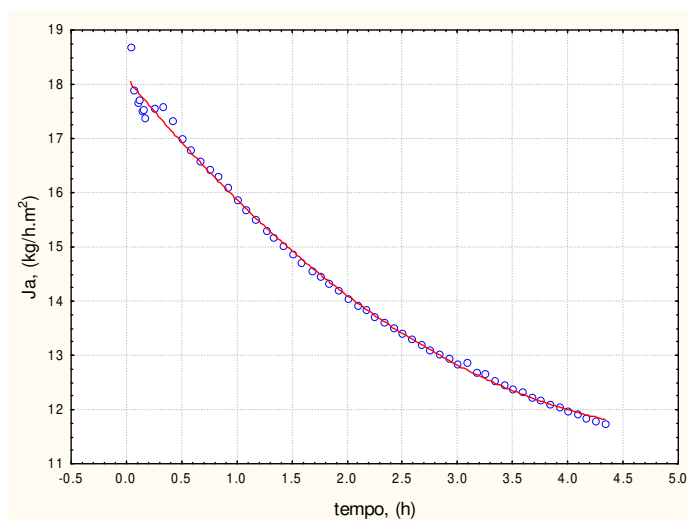


Figura 4.65. Perfil do fluxo acumulado (J_a) ao longo do tempo de processamento.

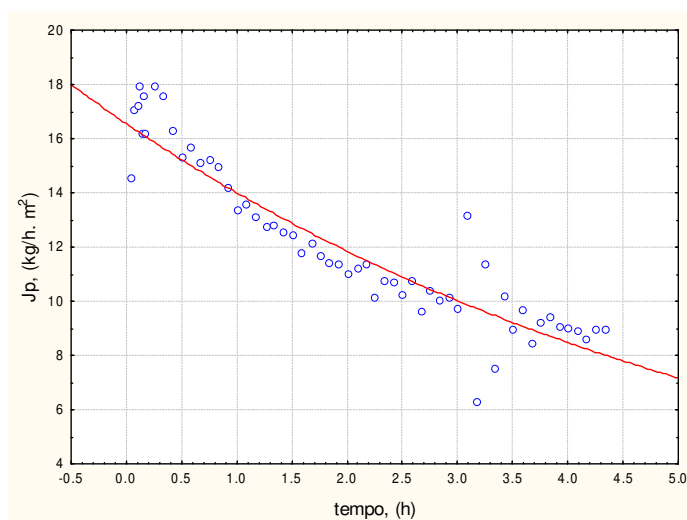


Figura 4.66. Perfil do fluxo pontual (J_p) ao longo do tempo de processamento.

O modelo matemático exponencial para o fluxo acumulado ao longo do tempo foi ajustado pela linearização da equação 4.15., aplicando, algebricamente, as etapas descritas pelas equações 4.16 a 4.20.

$$J = J_f + (J_o - J_f)e^{-\lambda t} \quad (\text{Equação 4.4})$$

$$(J - J_f) = (J_o - J_f)e^{-\lambda t} \quad (\text{Equação 4.5})$$

$$\ln(J - J_f) = \ln[(J_o - J_f)e^{-\lambda t}] \quad (\text{Equação 4.6})$$

$$\ln(J) = \ln(J_o - J_f) \cdot \ln(J_f) - \ln(J_f) \cdot \lambda t \quad (\text{Equação 4.7})$$

$$\ln(J) = \frac{\ln(J_o)}{\ln(J_f)} \cdot \ln(J_f) - \ln(J_f) \cdot \lambda t \quad (\text{Equação 4.8})$$

$$\ln(J) = \ln(J_o) - \ln(J_f) \cdot \lambda t \quad (\text{Equação 4.9})$$

Dessa forma, um ajuste linear de uma curva de $\ln(J)$ ao longo do tempo nos daria os parâmetros para o ajuste exponencial.

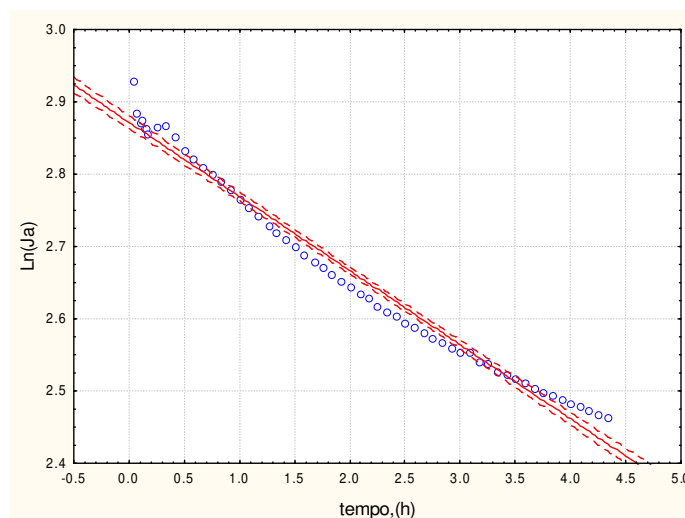


Figura 4.67. Ajuste linear de $\ln(Ja)$ ao longo do tempo .

O ajuste mostrado na figura 4.67 tem fortíssima correlação entre as variáveis, demonstrado pelo R^2 para o ajuste, que foi de 0,9819.

A equação 4.10 traz o modelo ajustado conforme a equação 4.9.

$$2.8718 - 0.1026t = \ln(J_a) \quad (\text{Equação 4.10})$$

Considerando J_f como sendo J_a no tempo de 260 minutos, 11,745 kg/h.m², teremos como a taxa de decaimento (λ) 0,0416 kg.h⁻¹.

O comportamento linearmente crescente para o fator de concentração e a massa permeada ao longo do processamento são apresentados na figura 4.68.

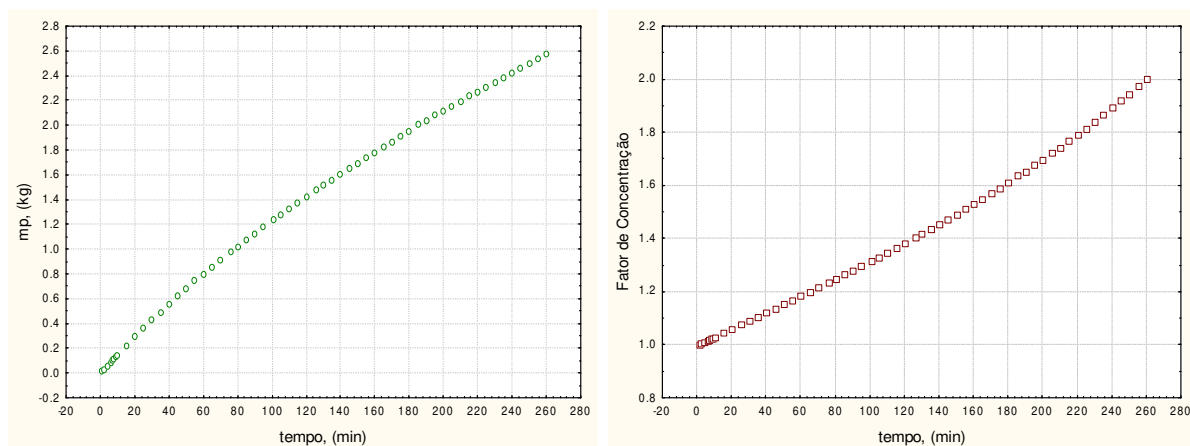


Figura 4.68. Comportamento da massa permeada e do fator de concentração ao longo do tempo de processamento .

O processo de clarificação do suco de caju mostrou que a redução do teor de taninos foi significativa, assim, no suco *in natura* o teor de taninos estava em torno de 0,34%, enquanto que no clarificado o percentual foi de 0,021%.

CAPÍTULO 5

Conclusões

Este capítulo traz as conclusões deste trabalho. Traz, portanto as conclusões sobre a produção do AH em via fermentativa utilizando caju como substrato em processos conduzidos em meio líquido e meio sólido. Ao final do capítulo são apresentadas sugestões para trabalhos futuros.

5.1. Conclusões

- A conservação e preparo do estoque de culturas ultracongeladas deve ser feito rigorosamente pois influencia diretamente na produção de AH.
- O ensaio para a determinação da melhor forma de pré-cultivo da cepa de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 mostrou que os melhores resultados para a produção de AH e crescimento celular foram obtidos com o pré-cultivo em BHI, inóculo propagado em suco de caju e fermentação conduzida em suco de caju suplementado.

- O tempo adequado para a propagação do inoculo foi de 12 horas, quando as células estão em fase exponencial de crescimento. A adaptação da cultura ao meio líquido no preparo do inóculo teve duração média de aproximadamente 8 horas.
- Todos os ensaios fermentativos apresentaram parâmetros cinéticos coerentes aos dados obtidos pela caracterização da fermentação, com ajustes lineares para os fatores de rendimento e velocidade específica de crescimento celular.
- Os processos de produção de AH em por fermentação mostraram que o crescimento e a produção de AH são influenciados pelas condições de aeração do meio, desse modo, processos conduzidos em ausência de aeração forçada apresentaram resultados para crescimento celular e evolução de biomassa inferiores aos obtidos em sistemas agitados e aerados. O favorecimento das condições de aeração do meio, observados em ensaios em reator mostram que P_x aumenta em aproximadamente 65% e P_p em 77% em processos conduzidos com suplementação de oxigênio quando comparados a processos sem aeração forçada.
- Ensaios comparativos entre processos conduzidos com suco de caju *in natura* e clarificado mostram que a redução dos taninos no suco clarificado não produz diferenças expressivas na produtividade ou crescimento celular (em torno de 6%).
- Estudos preliminares da produção de AH em meio sólido, conduzidos em reatores de leito fixo mostram que há factibilidade da produção deste biopolímero através desse tipo de processo. Valores obtidos para a produção de AH em FES chegaram a 0,0070 g de AH/ g de

bagaço de caju, numa produtividade de 0,00029 g de AH g por cada 1 g de bagaço em uma hora.

- Estudos da transferência de oxigênio no meio sólido mostram que há grande limitação, expressa pelo módulo de *Thiele* observado (Φ), de oxigênio dentro do bagaço, o que sugere estudos mais aprofundados para otimização desse processo. O K_La obtido pelo balanço de oxigênio no cultivo não foi constante ao longo do processo, tal variação pode estar relacionada com o teor de umidade e a espessura do filme líquido externo que também variam ao longo do tempo de fermentação, assim maiores valores para o teor de umidade significam menores valores para o K_La .
- O K_La observado para os processo de fermentação submersa com suco de caju *in natura* foi de $0,020\text{ s}^{-1}$ enquanto que para a fermentação com suco de caju clarificado o K_La foi de $0,008\text{ s}^{-1}$. A diferença no K_La nas duas situações, certamente está relacionada com as mudanças físico-químicas do meio pelo incremento na produção de AH e células.
- A massa molar do AH produzido por fermentação sem aeração forçada flutuou entre um mínimo valor de 17106 Da, no tempo inicial de fermentação e um valor máximo observado ao final do ensaio (24 h) de 19748 Da. Ao longo da fermentação, os valores para a massa molar apresentaram-se dispersos em torno de um valor médio de 18390.5 Da.
- Para o AH produzido com suprimento de oxigênio nos processos de fermentação submersa e em estado sólido a caracterização para o fracionamento e quantificação da massa molar do AH, após uma precipitação em etanol mostrou um maior percentual de moléculas

com massa molar na ordem de 10^3 . A fermentação em estado sólido gerou AH de massa molar elevada (da ordem de grandeza de 10^4 e 10^5 Da), enquanto que a fermentação submersa produziu maiores quantidades de AH massa molar da ordem de 10^3 - 10^4 Da.

- Perdas nas etapas de pré-purificação são significativas para AH de massa molar mais baixa.
- A contaminação por proteínas, observada comparando os sinais no detector, são pequenas, principalmente no AH obtido da fermentação em estado sólido.
- A polidispersividade, observada para todas as amostras é maior que 2. Polidispersividade maior que 3 é encontrada para o processo com suco clarificado.
- No estudo da clarificação do suco de caju, observou-se que o fluxo permeado segue um modelo exponencial que pode ser linearizado. A taxa de decaimento do fluxo permeado acumulado ajustado pelo modelo foi $0,0416 \text{ kg.h}^{-1}$ para as condições do ensaio.

5.2. Sugestões para Futuros Trabalhos

- Estudos de preparo do inóculo em suco clarificado visando a melhor adaptação do microrganismo, observando os efeitos da adaptação da cepa na produção de AH.

- Estudos de otimização da transferência de oxigênio na fermentação submersa utilizando suco de caju como substrato.
- Estudos da influência da suplementação de sais e de nitrogênio na produção de AH.
- Estudos de modelagem dos processos fermentativos conduzidos em suco de caju.
- Estudos de modelagem matemática para a FES em reatores de leito fixo.
- Estudos de transferência de oxigênio no cultivo em estado sólido para produção de AH visando contornar a limitação à transferência de massa no interior do bagaço.
- Estudos reológicos do AH produzido na fermentação submersa e semi-sólida a fim de investigar características desse polímero e seu comportamento reológico.

CAPÍTULO 6

Referências Bibliográficas

Este capítulo traz as referências bibliográficas usadas no texto listadas em ordem alfabética em relação ao primeiro autor.

ADAM, N.; GHOSH, P. Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial. **Inflammation Research**, v. 50, p.294-299, 2001.

AEBISCHER, P., GODDARD, M., MOLDAUER, J. G., MULHAUSER, P. J., RATHBUN, A. M., SANBERG, P. R., VASCONCELLOS, A. V., WARNER, N. F. Implantable Therapy System and Methods. United States Patent n. 6,179,826. January 30, 2001.

AKASAKA, H., KOMASAKI, H., ARAI, T. Fermentation method for producing hyaluronic acid. United States Patent n. 4,801,539, 1989.

AKASAKA, H.; SUSUMU, S.; YANAGI, M.; FUKUSHIMA, S.; MITSUI, T.. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists Japan**, v.22, p.35-42, 1988.

- ALTMAN, R. D., ROLAND, M. A randomized clinical trial of intra-articular sodium hyaluronate in patients with osteoarthritis of the knee. *American Journal of Orthopedics*. v.28, n.11, 1999.
- ARMSTRONG, D.C. **The molecular weight properties of hyaluronic acid produced *Streptococcus zooepidemicus***. 1997. Queensland: University of Queensland, 1997. (PhD. Thesis).
- ARMSTRONG, D.C.; COONEY, M.J.; JOHNS. M.R. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 309–312, 1997.
- ARMSTRONG, D.C.; JOHNS. M.R. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2759–2764, 1997.
- BALAZS, E.A.; LAURENT, T.C. Viscosity function of hyaluronic acid as a polyelectrolyte. **Journal of Polymer Science**, v.6, p.665-667, 1951.
- BALAZS, E.A. Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. In: GARG, H.G.; HALES, C.A. **Chemistry and biology of hyaluronan**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2004. p.415-455.
- BEATY, N.B.; TEW, W.P.; MELLO, R.J. Relative molecular weight and concentration determination of sodium hyaluronate solutions by gel-exclusion

high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.147, p.387-395, 1985.

BLANK, L.M.; MCLAUGHLIN, R.L.; NIELSEN, L.K. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 685-693, 2005.

BORZANI, W., AQUARONE, E., LIMA, U. A., SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial*. Editora Edgard Blucher Ltda. Volume 2. 1a Edição 2001.

BRANDT, K. D.; MICHALSKI, J.; BLOCK, J. A.; CALDWELL, J. R. *Clinical Experience with Orthovisc in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee*. Anika Therapeutics. 1999.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas**: revista de ecotoxicologia e meio ambiente, Curitiba, v. 13, p.129-146, jan./dez.2003.

BROWN, K. K., RUIZ, L. C., RINJ, I. Ultrapure hyaluronic acid and method of making it. United States Patent n. 4,782,046, 1988.

CHONG, B.F., BLANK, L. **Metabolic Engineering of Hyaluronic Acid Production**. The Department of Chemical Engineering, University of Queensland, St. Lucia, Australia, 1998.

CHONG, B.F.; BLANK, L.M.; MCLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L.K. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n.4, p. 341-351, 2005.

- CHONG, B.F.; NIELSEN, L.K. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 33-41, 2003.
- COONEY, M.J.; GOH, L.-T.; LEE, P. L.; JOHNS, M. R. Structured model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: physiological implications of glucose and complex-nitrogen-limited growth. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 898-910, 1999.
- DAY, A. J.; SHEEHAN, J. K.. Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. **Current Opinion in Structural Biology**, v.11, p.617–622, 2001.
- DORAN, P. M. Bioprocess Engineering Principles. Edition Academic Press, 1995, 417 p.
- DOUGHERTY, B., A., RIJN, I. Molecular Characterization of hasB from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group a Streptococci. *Journal of Biological Chemistry*. V.268, n.10, p.7118-7124. April, 1993.
- DEANGELIS, P.L. Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. **Glycobiology**, v. 12, n. 1, p. 9R-16R, 2002.
- DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. **Journal of Biological Chemistry**, v.167, p.189-198, 1946.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, V. 13. p.113-125. 2003.

- DURAND, A., RENAUD, R., MARATRAY, J.,ALMANZA, S. The INRA-Dijon reactors: Designs and applications. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B.K.,
- ELLWOOD, D. C., EVANS, C. G. T., DUNN. G. M., MCINNES, N., YEO, R. G. Production of hyaluronic acid. United States Patent n.5,563,051. October 8,1996.
- EVANKO, S.; WIGHT, T. Intracellular hyaluronan:. In: Hyaluronan synthesis, function, catabolism. Disponível em: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA20/HA20E.html>. Acesso em 13 jul. 2006.
- FOUISSAC, E.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte. **Macromolecules**, v.26, p.6945–6951, 1993.
- GOLDENHEIM, P., LACOUTURE, P., DONIGI-GALE, D., CHASIN, M., SACKLER, R. Prolonged Anesthesia in Joints and Body Spaces. United States Patent n.6,248,345. June 19, 2001.
- GÓMEZ-ALEJANDRE, S., SÁNCHEZ, E., ABRADELO, C., REY-STOLLE, M. F., HERNÁNDEZ-FUENTES, I. Partial Specific Volume of Hyaluronic acid in Diferent media and conditions. International Journal of Biological Macromolecules. v.27, p.287-290, 2000.
- GOWTHAMAN, M.K.; RAGHAVA RAO, K.S.M.S.; GHIDYAL, N.P. & KARANTH, N.G. Estimation of K_La in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. **Process Biochemistry**. V.30, p.9-15. 1995.

GOWTHAMAN, M.K.; RAGHAVA RAO, K.S.M.S.; GHILDYAL, N.P. & KARANTH, N.G. Gas concentration and temperature gradients in a packed bed solid-state fermentor. **Biotechnology Advances**. V. 11, p. 611–620. 1993.

GUITIÉRREZ-CORREA, M. & VILLENA, G.K. Surface adhesion fermentation: a new fermentation category. **Rer. peru biol**. V. 10 (2), p.113-124, 2003.

HASAN, S.D.M. Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* obtida por fermentação em estado sólido. **Tese de Doutorado FEQ – UNICAMP**. Campinas, 2002.

HABASSED, X. Drugs of Today. Supl.6: 1-21, 1997.

HANEY, A.F., DOTY, E. A Barrier Composed of Chemically Cross-linked Hialuronic Acid (Incert) Reduces Postoperative Adhesion Formation. Fertility and Sterility. v.70, n.1, p.145-151, July, 1998.

HUMPHREY, A.E., TAGUCHI, H. Dynamic Measurement of Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems. Journal Ferm. Technol. V.44, n.12, p.881-889, 1966.

HARDINGHAM, T. Solution properties of hyaluronan. In: GARG, H.G.; HALES, C.A. **Chemistry and biology of hyaluronan**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2004. p.1-19.

HASCALL, V.C.; LAURENT, T.C. Hyaluronan: structure and physical properties. Disponível em:

<<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>. Acesso em: 11 ago. 2005.

HOLMSTRÖM, B., RICICA, J. Production of hyaluronic acid by a *Streptococcal* strain in batch culture. **Applied Microbiology**, v.15, p.1409-1413, 1967.

HUMPHREY, A.E., TAGUCHI, H. Dynamic measurement of volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. **Journal Ferm. Technol.** v.44, n.12, p.881-889, 1966.

JOHNS, M.R.; GOH, L.T.; OEGGERLI, A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 5, p. 507-512, 1994.

JERNBERG, G. R. Surgical Implant and Method for Controlled Release of Chemotherapeutic Agents. United States Patent n. 5,290,271. March 1, 1994.

KAKEHI, K., YASUEDA, S., KINOSHITA, M., Hyaluronic acid: Separation and biological implications, **J. Chromatogr., B**, **797**, 347- 355, 2003.

KENDALL, F.E., HEIDELBERGER, M., DAWSON, M. H. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic *Streptococcus*. **Journal of Biological Chemistry**. v.118, p.61-69, 1937.

KIM, J., YOO, S., OH, D., KWEON, Y., PARK, D., LEE, C., GIL, G. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.440-445, 1996.

KOGAN, G.; SOLTES, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. **Biotechnology Letters**, v.29, p.17-25, 2007.

LANCEFIELD, R.C. A serological differentiation of human and other groups of streptococci. **Journal of Experimental Medicine**, v.59, p.141-158, 1933.

LAPCIK JR., L.; LAPCIK, L.; DE SMEDT, S.; DEMEESTE, J.; CHABRECEK, P. Hyaluronn: preparation, structute, properties and applications. **Chemical Reviews**, v. 98, n.8, p.2663-2684, 1998.

LAURENT, T.C. "The tree": hyaluronan research in the 20th century. Disponível em:
<<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA23/HA23.pdf>>. Acesso em:
11 ago. 2005.

LONSANE, B.K.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZALES, G.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M.M. Scale-up strategies for solid state fermentation system. **Process Biochemistry**, V.27, p.259-273, 1992.

MITCHELL, D.A.; DO, D.D.; GREENFIELD, P.F. & DOELLE, H.W. A semimechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporium* in a model solid-state fermentation system. **Biotechnology and Bioengineering**, V.38, p.353-362. 1991.

- MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; STUART, D.M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, V. 35, p. 1211-1255. 2000.
- MITCHELL, D.A.; PANDEY, A.; SANGURASAK, P. & KRIEGER, N. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid state fermentation. **Process Biochemistry**, V.35, pp.167-178. 1999.
- MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F. & KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, V. 3641, p. 1-11. 2002.
- NIMROD, A.; GREENMAM, B.; KANNER, D.; MOSHE, B. AND LANDSBERG, Y. Method of producing high molecular weight sodium hyalluronate by fermentation of streptococcus. United State Patent: 4,780,414, 1988.
- OGRODOWSKI, C.S. **Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*: estudo da fermentação de caracterização do produto**. 2006. 103p. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006. (Tese de Doutorado).
- OGRODOWSKI, C.S.; HOKKA, C.O.; SANTANA, M.H.A. Influência da relação C/N e da adição de lisozima no rendimento e propriedades do ácido hialurônico produzido por fermentação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 25., 2004, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: AIDIS, 2004. p. 1-8, 1.
- OLIVEIRA, A.H. S. Produção e Caracterização do ácido hialurônico obtido por fermentação do suco de caju com *Streptococcus zooepidemicus*. 2004. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (Dissertação de Mestrado).

- OOIJKAAS, L.P.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J. & RINZEMA, A. Growth and sporulation stoichiometry and kinetics of *Coniothrium minitans* on agar media. **Biotechnology and Bioengineering**. V.69, n.3, p.292-300. 2000b.
- OOIJKAAS, L.P.; WEBER, F.J.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation produciton systems. **Trends in Biotechnology**, V.18. p.355-360. 2000a.
- OOSTRA, J.; COMTE, E.P.I.; VAN DER HEUVEL, J.C.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, V.75, n.1, p.13-24. 2001.
- PANDEY, A. & RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**, V.14, p.486-488. 1992.
- PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. V.13.p.81-84. 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. & MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-Bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, V.35, p.1153-1169. 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON & NIGAM, P. **Solid-state fermentation in biotechnology. Fundamentals and Aplications**. Asiatech Publishers, INC. New Delhi. 2001

- PREHM, P. Hyaluronan. In: VANDAMME, E.J.; DE BAETS, S.; STEINBUCHER, A. **Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology, applications**. v.5. Polysaccharides I. Polysaccharides from prokaryotes. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. p. 379-404.
- RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALES, G. **Advances in Solid State Fermentation**. Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation. Montpellier, França. p.75-92. 1997.
- RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V. & KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. V.13, p.127-135. 2003.
- RIBANI, M, BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H, JARDIM, I. C. S. F.. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim Nova** 27: 771-780, 2004.
- SCOTT, J.E.; CUMMINGS, C.; BRASS, A.; CHEN, Y. Secondary and tertiary structures in aqueous solution: a C-13 NMR study. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p.4850-4855, 1999.
- ŠOLTÉS, L.; MENDICHI, R.; KOGAN, G.; SCHILLER, J.; STANKOVSKÁ, M.; ARNHOLD, J. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. **Biomacromolecules**, v.7, p. 659-668, 2006.
- STEEF, J.F. **Rheological methods in food engineering**. 2. ed. Michigan: Freeman Press, 1996. p.1-91

SUZUKI, M., ISHGAKI, K., OKADA, M., ONO, K., KASAI, S., IMAMORI, K. (2001), Intraarticular Preparation for the Treatment of Arthropathy. United States Patent n. 6,197,326.

SWANN, D. A.; SULLIVAN, B. P.; JAMIESON, G.; RICHARDSON, K. R.; SINGH, T. Biosynthesis of hyaluronic acid. United States Patent: 4,897,349, 1990.

THIBAUT, J.; POULIOT, K.; AGOSIN, E. & PÉREZ-CORREA, R. Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and K_La in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. V. 36, p. 9-18. 2000.

THONARD, J. C., MIGLIORE, S. A., BLUSTEIN, R. Isolation of hyaluronic acid from broth cultures of *Streptococci*. **Journal of Biological Chemistry**, v.239, p.726-728, 1963.

VOGEL, H.C.; TODARO, C.L. **Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment**. 2. ed. New Jersey: Noyes Publications, 1997. 801 p.

YAMADA, T. , KAWASAKI, T., Microbial Synthesis of Hyaluronan and Chitin: New Approaches. **J. Biosci. Bioeng.**, Vol. **99**, 521-528 , 2005 .

Anexo

O apêndice deste trabalho traz a padronização e validação da metodologia analítica da metodologia analítica usada na caracterização da fermentação e do AH produzido.

A. Adequação e Validação da Metodologia Analítica

As análises cromatográficas foram realizadas para a quantificação dos açúcares sacarose, glicose e frutose, e também do ácido hialurônico.

A adaptação da metodologia analítica foi feita tomando por base trabalhos desenvolvidos para análises semelhantes. O procedimento foi padronizado e perfeitamente seguido após a sua validação.

A validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica. (**Barros**, 2002).

A.1. Determinação Quantitativa de Açúcares

Inicialmente foi verificado que a presença de ácido hialurônico no meio de fermentação causa interferências no método de determinação de açúcares. Amostras de AH em meio aquoso, tratadas pela metodologia de quantificação adotada por **Miller** (1959), método do reagente DNS, produziram evolução de cor durante a reação usada como controle. Para reduzir ou eliminar essas interferências, foram implementadas metodologias cromatográficas em substituição aos métodos químicos tradicionalmente usados para determinação de açúcares.

Nos ensaios realizados para a quantificação dos açúcares utilizando sistemas de CLAE em fase reversa com coluna de octadecilsilano (C18), observou-se que não houve separação cromatográfica entre os açúcares, assim como foi observado e descrito por **Nascimento et al** (2003), que verificou a separação pelo pico da sacarose e o pico único equivalente à glicose e frutose. Os ensaios foram feitos a 25 °C com duração de até 20 minutos. Diante desse resultado, a quantificação, foi expressa como conteúdo total de açúcares sacarose, glicose e frutose presentes nas amostras. Um cromatograma típico dessa análise é mostrado na Figura A.1.

Para assegurar uma ampla identificação do pico cromatográfico obtido e sua correspondência à mistura foram feitas adições sucessivas de padrões de açúcares às amostras analisadas. Fez-se adição, separadamente, de sacarose, glicose e frutose. A resposta analítica foi crescente, no tempo de retenção identificado, para adição de açúcar, o que nos assegura que o pico correspondente ao tempo de retenção médio de 5 minutos corresponde aos açúcares em mistura.

Calibrações isoladas também foram feitas, com soluções padrão de cada um dos açúcares (sacarose, glicose e frutose) seguindo a mesma metodologia de preparo das amostras e empregando a mesma fase móvel, acetonitrila-água

(20:80 v/v), em mesmo fluxo e sob as mesmas condições de temperatura (25°C). A calibração obtida foi comparada à obtida da mistura dos açúcares.

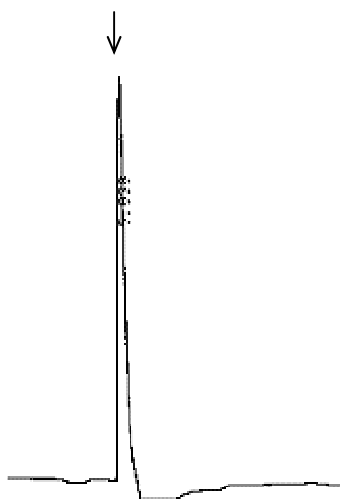


Figura A.1.. Cromatograma característico para a mistura de açúcares.

A Figura A.2. mostra a curva da resposta analítica em função da concentração do analito para a análise dos padrões da mistura de açúcares.

Os valores obtidos para a resposta analítica, a área do pico cromatográfico, nas determinações feitas para a curva padrão da mistura de açúcares, apresentam grande dispersão em torno de seu valor médio, o que, em parte, pode ser justificado pelo fato de serem feitas determinações em mistura de açúcares, que se dá por não ter havido separação cromatográfica nas condições empregadas.

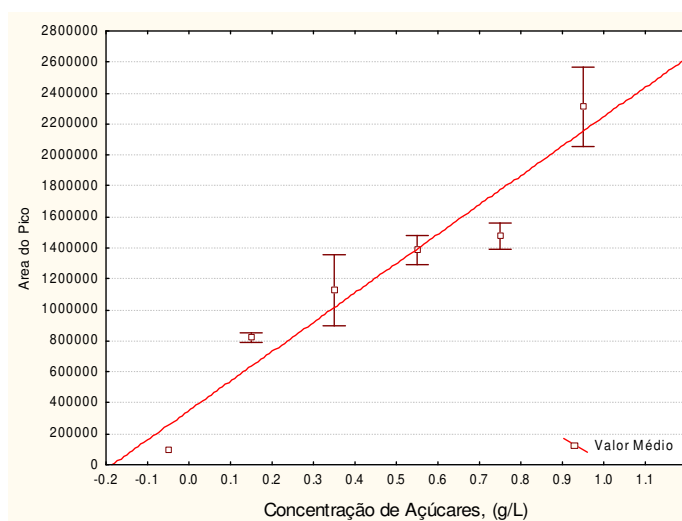


Figura A.2. Curva da resposta analítica em função da concentração do analito na calibração do método de análise de açúcares.

Na Figura A.3. é apresentada a curva da resposta analítica em função da concentração de sacarose, glicose e frutose feitas nas concentrações de 0,2 g/L, 0,6 g/L e 1,0 g/L, para a calibração individual de cada um dos açúcares.

Como podemos observar, pela curva, a dispersão dos valores obtidos para resposta analítica (área do pico) para cada açúcar são bem menores em relação aos observados nas determinações da mistura, o que reforça a nossa justificativa inicial à dispersão dos valores obtidos para a determinação da mistura. Assim, determinações feitas para um único açúcar apresentam menores desvios em relação ao valor médio para a resposta analítica, indicando maior precisão na análise.

As funções obtidas para os ajustes lineares, calculadas pelo método dos mínimos quadrados, nos indicam que a calibração para medida de açúcares como mistura aproxima-se das demais calibrações, o que nos garante a possibilidade de usá-la como método analítico seguro para a quantificação do conteúdo de açúcares no meio de fermentação.

As equações A.1, A.2, A.3 e A.4, ajustes lineares para as calibrações nas determinações de sacarose, glicose, frutose e para a mistura de açúcares, respectivamente, mostram certa similaridade entre as inclinações e os seus interceptos.

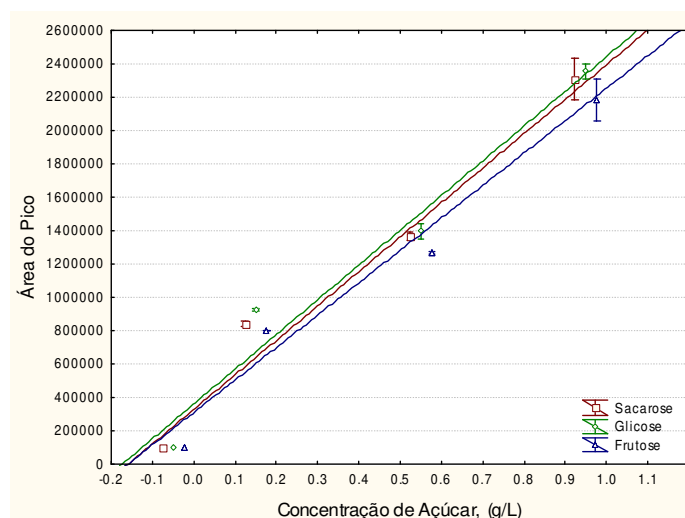


Figura A.3. Curva da resposta analítica em função da concentração de sacarose, glicose e frutose nas calibrações individuais.

$$\text{Área do Pico} = 2,7838 \times 10^5 + 1.9983 \times 10^6 [\text{Sacarose}] \quad (\text{Equação A.1})$$

$$\text{Área do Pico} = 3,2306 \times 10^5 + 1.998 \times 10^6 [\text{Glicose}] \quad (\text{Equação A.2})$$

$$\text{Área do Pico} = 2,6081 \times 10^5 + 1.8827 \times 10^6 [\text{Frutose}] \quad (\text{Equação A.3})$$

$$\text{Área do Pico} = 2.3572 \times 10^5 + 2.0775 \times 10^6 [\text{Açúcares}] \quad (\text{Equação A.4})$$

Os valores para os coeficientes de correlação R^2 são mostrados na tabela A.1.

Tabela A.1. Coeficientes de correlação (R^2) para as calibrações obtidas.

Calibração	Coeficiente de Correlação (R^2)
Sacarose	0,9695
Glicose	0,9504
Frutose	0,9663
Mistura	0,9769

Pelos valores apresentados na tabela A.1. associados com a caracterização feita por **Brito et al.**(2003), temos que, para todas as determinações, as correlações são fortíssimas.

A linearidade foi avaliada levando-se em conta os valores de R^2 obtidos. Dessa forma, visualmente observando a curva de calibração para os valores médios das áreas dos picos para a mistura, aceita-se a linearidade na faixa de concentração adotada para a calibração.

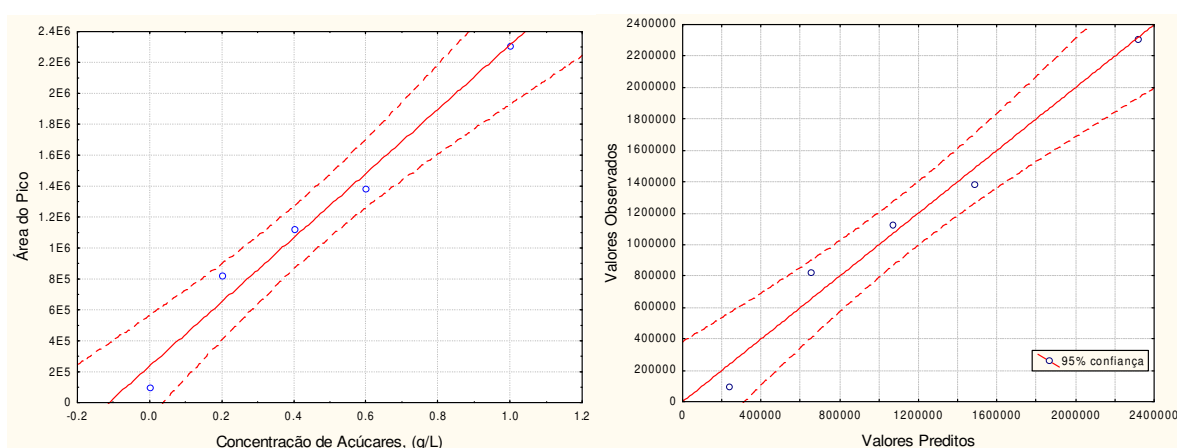


Figura A.4. Curva de ajuste médio e curva de valores preditos vs. valores observados.

O método apresentou uma sensibilidade de $2,077 \times 10^6$, que significa que a alteração de uma unidade na concentração leva a alteração 0,00000048146 unidade no sinal/ resposta (área do pico).

Os limites de detecção e quantificação obtidos pelas equações 3.4 e 3.5 respectivamente, mostram que há possibilidades, usando essa metodologia analítica, de se observar a existência através de detecção analítica, de açúcares em concentrações acima de 0,15 g/L ao passo que a quantificação só poderá ser efetuada com significância estatística em concentrações acima de 0,5 g/L, desse modo, concentrações entre 0,15 e 0,5 g/L poderão ser detectadas, mas não poderão ser seguramente quantificadas.

A.2. Determinação da Concentração Celular

A determinação da concentração celular foi feita através de leituras da densidade ótica a 600 nm, DO_{600} , a qual foi correlacionada com a massa celular seca. A principal vantagem dessa metodologia é a sua praticidade, bem como a redução do tempo de análise. Enquanto que em uma determinação gravimétrica, 12 horas, no mínimo são gastas para que se obtenha o conteúdo em biomassa, em leituras de DO_{600} apenas alguns minutos são dispensados para essa determinação.

A curva de calibração entre a DO_{600} e a massa seca de células para a determinação da biomassa bacteriana produzida na fermentação submersa é apresentada na Figura 4.5. A correlação entre as leituras da DO_{600} e a concentração celular determinada mostra a viabilidade de seu uso como método analítico.

A função de resposta analítica mostrou-se linear com o aumento da concentração celular. A boa repetitividade, pode ser observada pelos desvios-padrão associados aos pontos da calibração.

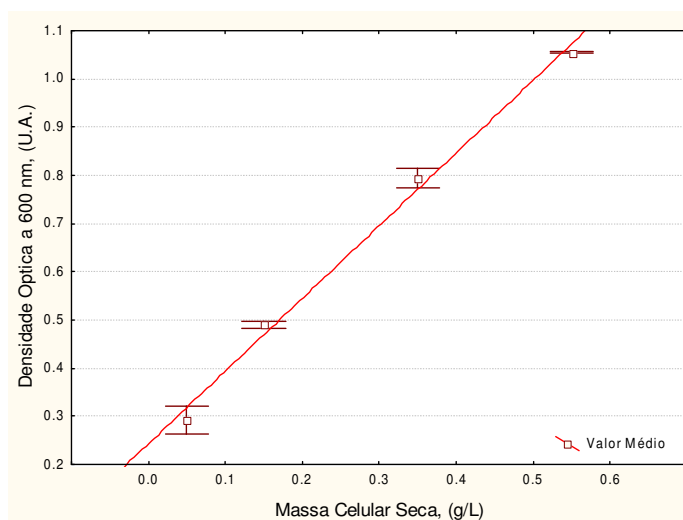


Figura A.5. Curva da resposta analítica em função da concentração do analito na calibração do método de análise do conteúdo em biomassa correlacionando com Densidade óptica.

A correlação entre DO_{600} e concentração celular apresentou-se fortíssima, seguindo a definição de **Brito et al.**(2003) para um coeficiente de correlação R^2 igual a 0,9980.

A função analítica obtida para a resposta na calibração é mostrada pela equação A.5.

$$DO_{600} = 0.1799 + 1.485 \times [\text{Células}] \quad (\text{Equação A.5})$$

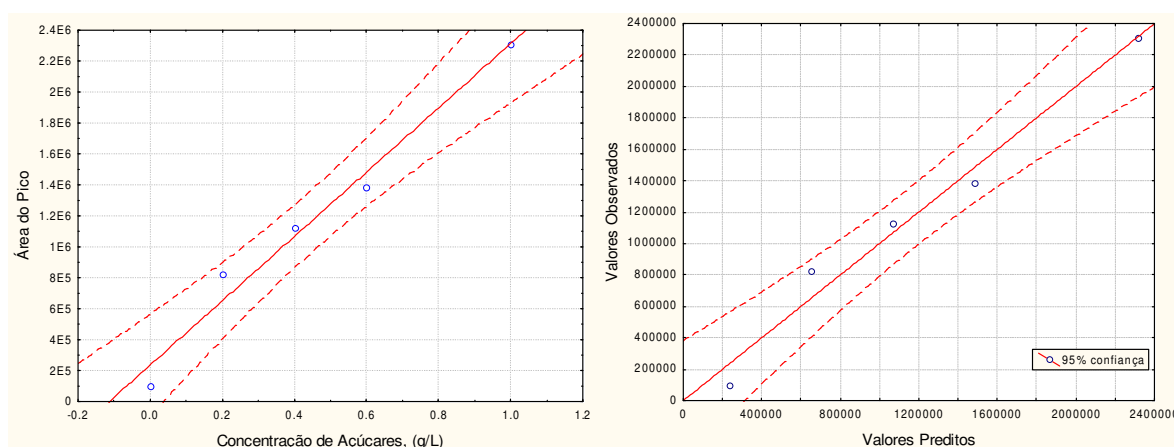


Figura A.6. . Curva de ajuste médio e curva de valores preditos vs. valores observados.

A sensibilidade do método analítico, numericamente igual a inclinação da curva de calibração para a resposta analítica é igual a 1, 485, nos informando que, para o acréscimo de uma unidade na concentração teremos a resposta analítica 0,67 vezes maior.

Através dessa metodologia analítica, pode-se detectar a presença de células em concentrações superiores a 0,02 g/L e, seguramente quantificar concentrações superiores a 0,068 g/L de células. Dentro do intervalo entre 0,02 e 0,068 g/L há a possibilidade, apenas, de detecção, não sendo segura a quantificação com uso da calibração analítica.

A.3. Determinação da Concentração de AH

A concentração de AH foi adaptada da metodologia de **Beaty et al. (1984)**.

A grande vantagem desse método é o fato de que não há necessidade de se obter um padrão analítico comercial para AH, que, pode ser substituído por *padrões* obtidos da própria separação do AH do meio de fermentação.

Há, para tanto que se observar a rigorosa secagem do AH produzido e recuperado do meio com nitrogênio, para que nenhum resíduo de etanol possa contribuir com o erro na determinação mássica feita na etapa da calibração. A identificação da concentração nominal de AH é feita por gravimetria enquanto que a real concentração de AH existente na massa precipitada e recuperada é obtida pelo método do reagente carbazol.

Através de determinações cromatográficas, feitas com uso do sistema CLAE anteriormente descrito, fez-se uma calibração, inicialmente considerando a concentração nominal e, posteriormente corrigindo as concentrações para concentrações reais obtidas com uso do método químico.

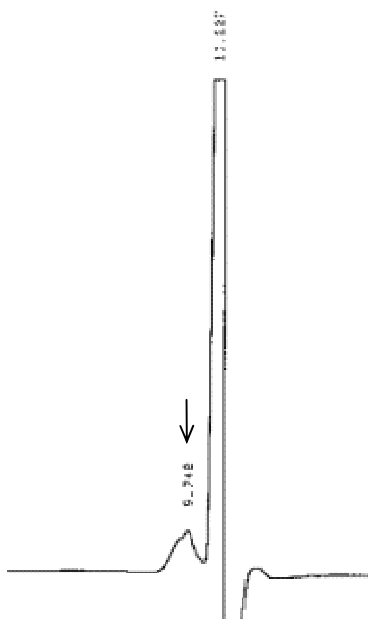


Figura A.7. Cromatograma obtido para a calibração do método de determinação da concentração de AH

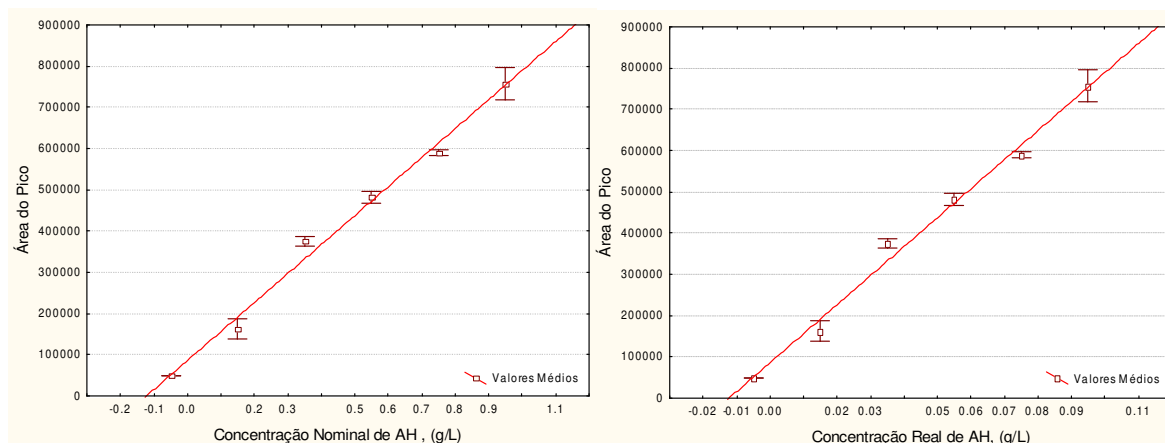


Figura A.8. Curva da resposta analítica em função da concentração do analito na calibração do método de análise da concentração de AH (concentração nominal e concentração real).

A Figura A.7. mostra a resposta analítica em função das concentrações nominais e reais de AH no analito. A correspondência entre a concentração nominal de AH obtida por gravimetria e a obtida pela determinação química, específica para AH, é dada pela equação 4.6.

$$[AH_{\text{real}}] = [AH_{\text{nominal}}] / 10 \quad (\text{Equação A.6})$$

De modo que, uma amostra que tenha como valor nominal para concentração de AH 1 g/L, na verdade deverá conter, em média 0,1 g/L de AH.

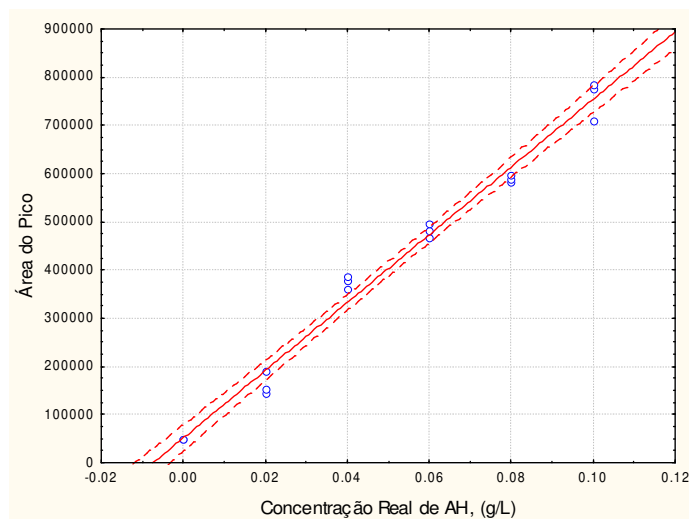


Figura A.9. Dispersão de valores obtidos para a calibração do método de análise da concentração de AH.

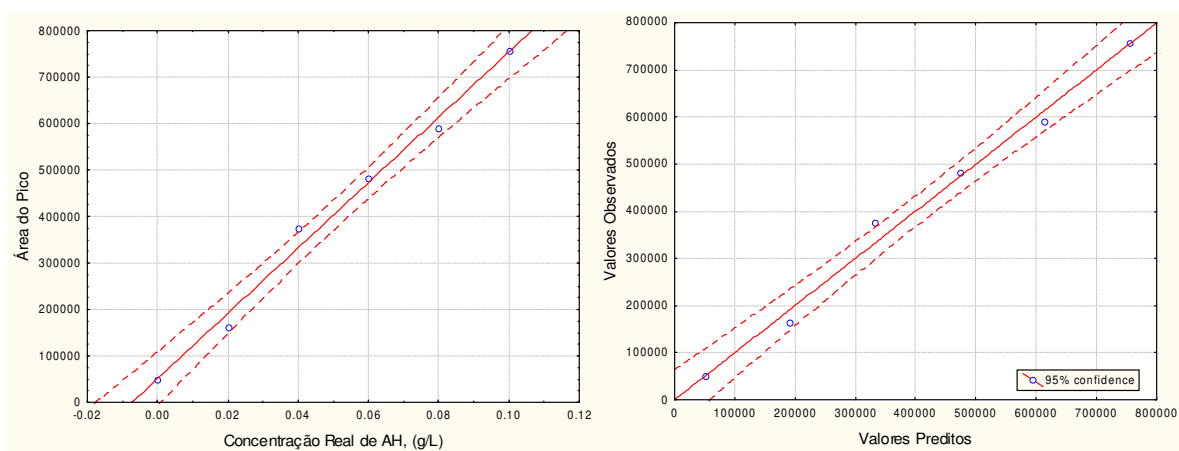


Figura A.10. Curva de ajuste médio e curva de valores preditos vs. valores observados.

A correlação entre a concentração de AH na amostra e a área do pico obtido para cada análise cromatográfica é fortíssima, visto que o coeficiente R^2 é

igual a 0,9905 para a calibração, aceitando-se, portanto, a linearidade da curva no intervalo usado para a calibração.

A função analítica ajustada para os valores da dispersão foi:

$$\text{Área do Pico} = 51101,9365 + 7,0295 \times 10^6 [\text{AH}] \quad (\text{Equação A.7})$$

A sensibilidade do método, determinada pelo ajuste linear por mínimos quadrados foi $7,0295 \times 10^6$.

Os limites de detecção e quantificação, respectivamente obtidos pelas equações 3.4 e 3.5, foram 0,009 g/L e 0,3 g/L. Assim, 0,009 g/L é a menor concentração que se pode detectar e 0,3 g/L é a menor concentração de AH que se pode quantificar com segurança e significância estatística com uso da calibração, o intervalo intermediário de concentração não pode ser, seguramente quantificado, embora possa ser detectado pelo equipamento.

A.4. Determinação da Massa Molar do AH Produzido

A calibração analítica para a determinação da massa molar do AH foi feita indiretamente, através de injeção de padrões cromatográficos de Dextrana para determinação de massa molar.

A determinação das diferenças entre as massas molares foi feita através da diferença entre os tempos de retenção das amostras e a curva de calibração foi obtida pela linearização da curva exponencial seguindo a equação A.8.

$$\text{Log}(M_w) = f(T_r). \quad (\text{Equação A.8})$$

A principal vantagem desse método é o fato de se poder determinar a massa molar do AH simultaneamente à determinação da concentração, visto que o sistema cromatográfico é o mesmo usado nas duas metodologias.

O comportamento da massa molar em função do tempo de retenção, obtido para os padrões de dextrana é mostrado na Figura A.11.

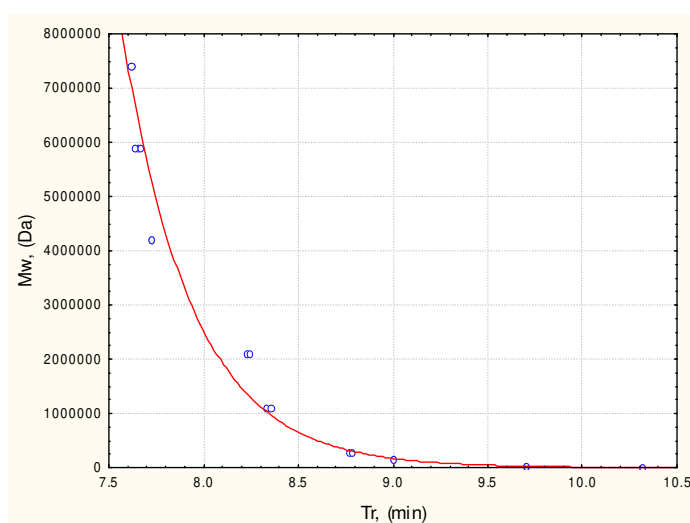


Figura A.11. . Comportamento da massa molar de dextrana em função do tempo de retenção da amostra.

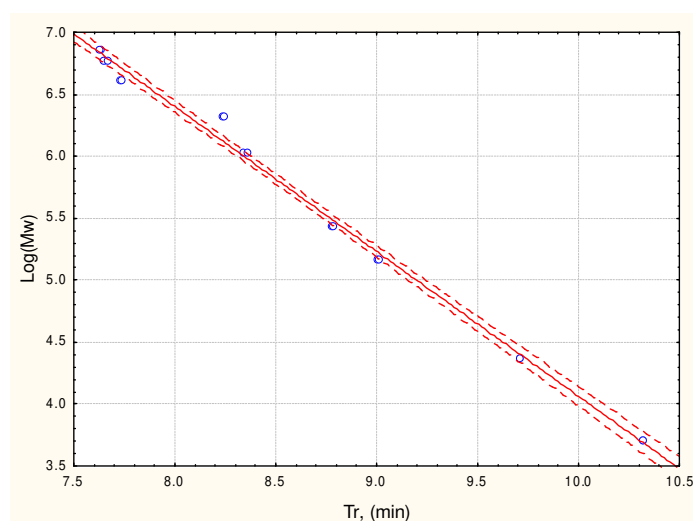


Figura A.12. . Curva linearizada para a calibração do método de determinação da massa molar do AH.

A Figura A.12. apresenta o comportamento linear do Log(Mw) em função de T_r .

A função analítica obtida para a calibração e para a linearização da curva de calibração da massa molar são mostradas nas equações A.9. e A.10., respectivamente.

$$Mw = 5.7525E15x e^{(-2.6934 \cdot tr)} \quad (\text{Equação A.9})$$

$$\text{Log}(Mw) = 15.7599 - 1.1697x T_r \quad (\text{Equação A.10})$$

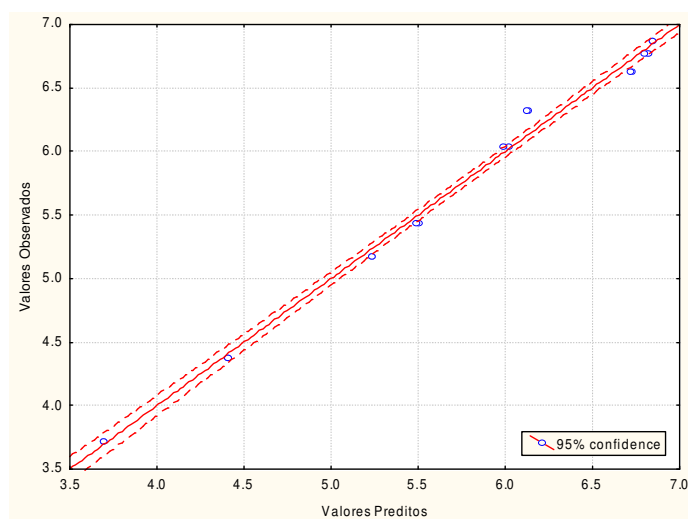


Figura A.13. Valores observados vs. valores preditos para a calibração do método de determinação da massa molar.

O coeficiente de correlação obtido para a linearização da função logarítmica da Mw foi 0,9941, mostrando, portanto, uma forte correlação entre Mw e T_r nas determinações cromatográficas.

A.5. Determinação do Teor de Polifenóis

A calibração para polifenóis foi feita com o intuito de avaliar o teor total de taninos no suco de caju.

A curva abaixo apresentada traz o gráfico analítico entre a concentração de D-catequina padrão e a absorbância a 760 nm.

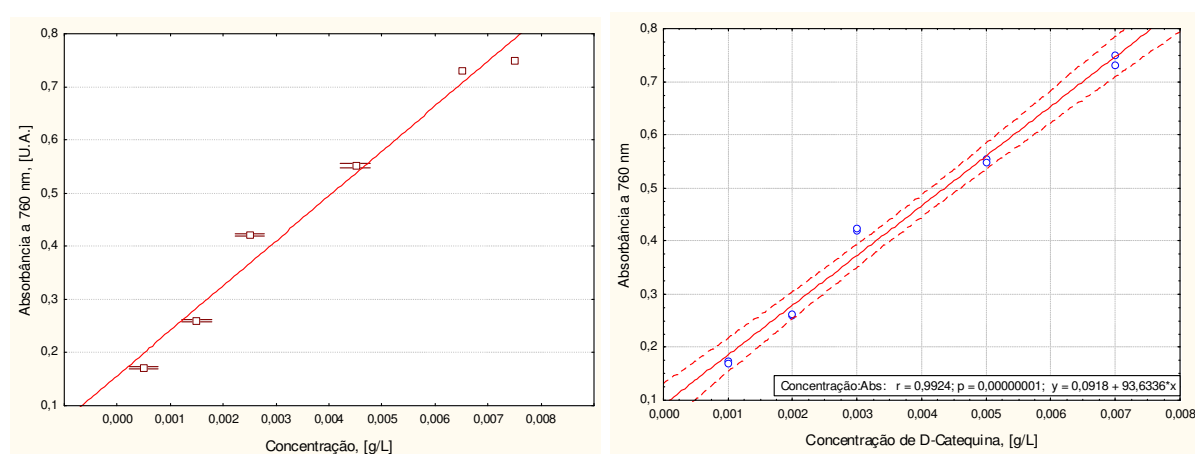


Figura A.14. . Curva de calibração do método de determinação de polifenóis no suco de caju.

A calibração analítica apresentada na equação A.11. mostra que há uma correlação fortíssima em perfil linear para a absorbância a 760 nm e a concentração de polifenóis, que podemos observar pelo valor do r^2 que foi de 0,98.

$$\text{Absorbância} = 0,0918 + 93,6336 \cdot [\text{D-Catequina}] \quad (\text{Equação A.11})$$

A sensibilidade do método, determinada pelo ajuste linear por mínimos quadrados foi 93,6336.

Os limites de detecção e quantificação, respectivamente obtidos pelas equações 3.4 e 3.5, foram 0,0029 g/L e 0,0098 g/L.