

# MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE CURVAS DE RUPTURA DE ATIVIDADE QUITOSANOLÍTICA PRODUZIDA POR *Paenibacillus ehimensis* USANDO ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO

PADILHA, C. E. A.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, J. A.<sup>1</sup>; MACEDO, G. R.<sup>1</sup>; SANTOS, E. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

**RESUMO** – Neste estudo é apresentada a modelagem matemática da adsorção de quitosanas produzidas por *Paenibacillus ehimensis* usando uma coluna de leito expandido. As corridas de adsorção foram realizadas em coluna de vidro 30,00 cm x 2,64 cm e a Streamline DEAE foi usado como adsorvente. Os experimentos foram executados em condições diferentes de concentração inicial (0,20 a 0,26 UA/mL), altura do leito fixo (5,0 e 7,5 cm) e velocidade de fluxo (80 a 240 cm/h). O modelo de taxa geral desenvolvido levou em consideração a transferência de massa, a adsorção, os efeitos hidrodinâmicos e a difusão no poro. O algoritmo metaheurístico *PSO* (*particle swarm optimization*) foi introduzido para estimar parâmetros cinéticos e de transferência de massa, propiciando maior ajuste do modelo. As simulações mostraram boa concordância com as curvas de ruptura experimentais, alcançando *SSR* de até 0,265, para os graus de expansão 1,00-2,60.

## 1. INTRODUÇÃO

As quitosanas (EC 3.2.1.132) são enzimas hidrolíticas que atuam nas ligações glicosídicas dos polímeros quitosana e quitina produzindo quitoooligosacarídeos (QOS), e são expressas por uma variedade de micro-organismos, em sua maioria bactérias (Sun *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008). Atualmente, já se conhece uma diversidade de benefícios relativos ao uso dos QOS devido a sua ação antitumoral (Shen *et al.*, 2009), prebiótica (Liang *et al.*, 2013), antibacteriana (Xia *et al.*, 2010). Um dos problemas da aplicação efetiva das enzimas microbianas, inclusive das quitosanas, é o alto custo envolvido na recuperação e purificação destes produtos.

A adsorção em leito expandido (ALE) é uma técnica integrativa que combina clarificação, recuperação e purificação parcial em uma única etapa, se valendo de conceitos de cromatografia e fluidização de sólidos. A alimentação da ALE pode ser efetuada com extrato bruto não tratado, uma vez que o fluxo ascendente promove a segregação das partículas adsorventes, evitando a

colmatação da coluna (Silveira *et al.*, 2009). A estabilidade da expansão do leito aproxima a ALE das características da coluna em leito fixo.

O desempenho do processo de adsorção em coluna pode ser avaliado pelas curvas de ruptura. Neste gráfico são registrados a concentração do efluente após a passagem na coluna e o tempo de corrida, revelando a saturação gradual do leito adsorvente pela molécula de interesse. A modelagem matemática da curva de ruptura torna-se, então, fundamental para entender o comportamento da adsorção e a otimização de parâmetros operacionais, sem a exigência de mais experimentos (Moraes *et al.*, 2009; Yun *et al.*, 2005).

Assim, o presente trabalho tem como enfoque a modelagem fenomenológica das curvas de ruptura de quitosanas usando a resina Streamline DEAE, um trocador aniônico. As quitosanas foram produzidas pela cepa *Paenibacillus ehimensis* e a coluna foi operada em leito fixo e leito expandido. No estudo buscou-se o ajuste das curvas de ruptura experimentais pelo auxílio da sub-rotina de estimação enxame de partículas (*Particle Swarm Optimization, PSO*).

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Produção de quitosanas

A cepa *Paenibacillus ehimensis* NRRL 23118 foi usada na produção de quitosanas. O concentrado celular, armazenado a 10 % v/v glicerol, foi transferido a Erlenmeyers de 250 contendo 50 mL do meio A (1,0 g.L<sup>-1</sup> peptona, 1,0 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 0,5 g.L<sup>-1</sup> sulfato de magnésio, 1,0 g.L<sup>-1</sup> fosfato dibásico de potássio, 2,0 g.L<sup>-1</sup> glicose, pH 7,0) e incubados a 309 K e 120 rpm durante 24 h. Alíquotas do meio A (5 mL) foram inoculadas em 45 mL do meio B (6,0 g.L<sup>-1</sup> peptona, 0,5 g.L<sup>-1</sup> sulfato de magnésio, 1,0 g.L<sup>-1</sup> fosfato dibásico de potássio, 1,0 g.L<sup>-1</sup> glicose, 3,0 g.L<sup>-1</sup> quitosana, pH 7,0). A produção foi realizada em *shaker* durante 48 h, nas mesmas condições do cultivo anterior (Araújo *et al.*, 2013). O produto foi armazenado em freezer a 253 K, acrescido de 0,05 % de azida de sódio.

### 2.2. Coluna e adsorvente

Uma coluna de vidro com diâmetro 2,64 cm e altura de 30,00 cm foi confeccionada para operar em leito expandido. Um pistão móvel foi utilizado para permitir diferentes graus de expansão do leito e o distribuidor consistia de um leito de microesferas de vidro com altura de 3,0 cm. A alimentação da coluna foi realizada por uma bomba peristáltica (Perimax 12, Spetec). A resina utilizada nos ensaios de adsorção foi a Streamline DEAE (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), um trocador aniônico da primeira geração de adsorventes próprios para adsorção em leito expandido.

### 2.3. Purificação de quitosanas

Em cada ensaio a coluna foi equilibrada com tampão Fosfato 50,0 mM e pH 8,0 e, em seguida, fez-se passar 200,0 mL de caldo fermentado clarificado com pH 8,0. As alturas do leito fixo de 5,0 e 7,5 cm foram selecionadas e as velocidades de fluxo variaram de 80 cm/h a 240 cm/h. As corridas foram realizadas em leito fixo ( $H/H_0 = 1$ ) e em leito expandido ( $H/H_0 = 1,80$ ,  $H/H_0 = 2,20$  e  $H/H_0 = 2,60$ ) na temperatura de 25°C. A concentração de atividade quitosanólítica

foi analisada na alimentação e na saída da coluna.

## 2.4. Determinação da atividade quitosanólítica

A atividade enzimática foi determinada através dos passos realizados em Araújo *et al.* (2013). A formação de açúcares redutores foi analisada pelo método DNS (Miller, 1959), usando D-glicosamina (Sigma Aldrich, Ohio, USA) como padrão. Uma unidade de atividade de quitosanase (1 UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1  $\mu\text{mol}$  de D-glicosamina por minuto nas condições estabelecidas.

## 3. MODELO MATEMÁTICO

O desenvolvimento do modelo matemático para o processo de adsorção de quitosanas em colunas de leito fixo e de leito expandido necessitou da definição de algumas hipóteses:

- i. O adsorvente foi considerado como uma esfera de densidade uniforme e grupos funcionais igualmente distribuídos. O tamanho das partículas seguiu uma distribuição axial definida por Tong e Sun (2002). O leito adsorvente apresentou empacotamento homogêneo.
- ii. O adsorvente foi adotado como um material poroso, no qual o adsorbato pode difundir-se livremente. Representou-se a difusão intraparticular pelo termo de difusividade efetiva ( $D_{ef}$ ).
- iii. O comportamento hidrodinâmico da fase líquida foi representado pelo modelo de dispersão axial.
- iv. A transferência de massa na superfície do adsorvente foi governada pelo coeficiente de transferência no filme líquido ( $k_f$ ).
- v. O equilíbrio de adsorção foi representado pelo modelo de Langmuir como visto na Equação 1, onde a concentração de atividade enzimática no poro ( $c^*$ ) está em equilíbrio local com a atividade retida nas paredes do adsorvente ( $q^*$ ). Os parâmetros  $\lambda$  e  $1/b$  são a capacidade máxima de adsorção das quitosanas e o coeficiente de adsorção, respectivamente.

$$q^* = \frac{\lambda b c^*}{1 + b c^*} \quad (1)$$

O balanço de massa na fase fluida em um elemento de volume da coluna pode ser expresso pela Equação 2.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - \frac{u}{\varepsilon} \frac{\partial c}{\partial z} - \frac{3k_f(1-\varepsilon)(c-c_f)}{\varepsilon R_i} \quad (2)$$

$$t = 0; \quad c(z, 0) = 0 \quad \text{para } 0 \leq z \leq H \quad (3)$$

$$z = 0; \quad c = c_0 + \frac{(1-\varepsilon) D_{ax}}{u} \frac{\partial c}{\partial z} \quad \text{para } t > 0 \quad (4)$$

$$z = H; \quad \frac{\partial c}{\partial z} = 0 \quad \text{para } t > 0 \quad (5)$$

Na fase sólida, a dispersão se insere em termos da quantidade de atividade enzimática adsorvida, gerando a Equação 6 (Wright e Glasser, 2001; Tong *et al.*, 2003).

$$(1 - \varepsilon) \frac{\partial \bar{q}}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2 \bar{q}}{\partial z^2} + \frac{3k_f(1 - \varepsilon)(c - c_f)}{R_i} \quad (6)$$

$$t = 0; \quad \bar{q}(z, 0) = 0 \quad \text{para } 0 \leq z \leq H \quad (7)$$

$$z = 0; \quad \frac{\partial \bar{q}}{\partial z} = 0 \quad \text{para } t > 0 \quad (8)$$

$$z = H; \quad \frac{\partial \bar{q}}{\partial z} = 0 \quad \text{para } t > 0 \quad (9)$$

Quando se utiliza adsorventes porosos em processos de adsorção é importante a inclusão do modelo de dispersão do poro (PDM) (Wright e Glasser, 2001; Tong *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2005), conforme a Equação 10.

$$\varepsilon_p \frac{\partial c_i}{\partial t} = \frac{\partial q_i}{\partial t} + \varepsilon_p D_{ef} \left( \frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) \quad (10)$$

$$t = 0; \quad c = c_0; \quad c_i = 0; \quad q_i = 0 \quad (11)$$

$$r = 0; \quad \frac{\partial c_i}{\partial r} = 0 \quad \text{para } t > 0 \quad (12)$$

$$r = R; \quad \frac{\partial c_i}{\partial z} = \frac{R}{3\varepsilon_p D_{ef}} \frac{\partial \bar{q}}{\partial t} \quad \text{para } t > 0 \quad (13)$$

A otimização por enxame de partículas é um algoritmo de busca estocástico inspirado na movimentação de pássaros em busca de alimento. Cada elemento ou partícula do enxame procura a melhor solução baseado na melhor posição encontrada por ele próprio e pelo conjunto de partículas. As partículas se movem pelo intervalo de busca e trocam informações com as outras partículas, de acordo com as Equações 14 e 15 (Burkert *et al.*, 2011).

$$v_{p,d}^{k+1} = w \cdot v_{p,d}^k + c_1 \cdot r_1 (x_{p,d}^{ind} - x_{p,d}^k) + c_2 \cdot r_2 (x_d^{glob} - x_{p,d}^k) \quad (14)$$

$$x_{p,d}^{k+1} = x_{p,d}^k + v_{p,d}^{k+1} \quad (15)$$

Nas Equações 14 e 15,  $p$  representa a partícula,  $d$  é a direção de busca,  $k$  é o número de iterações,  $v$  é a velocidade da partícula,  $x$  é a posição da partícula,  $x^{ind}$  é a melhor posição da partícula e  $x^{glob}$  é a melhor posição encontrada pelo enxame. Os termos  $r_1$  e  $r_2$  são dois números randômicos que se distribuem entre 0 e 1. Os parâmetros  $w$ ,  $c_1$  e  $c_2$  tratam-se do peso inercial, parâmetro de cognição e parâmetro social, respectivamente.

As simulações do modelo de taxa geral foram realizadas usando a linguagem Fortran, no software Microsoft Visual Studio 2010. O método de diferenças finitas foi usado para as discretizações nas coordenadas espaciais  $z$  e  $r$ , sendo adotados trinta pontos em cada caso. Os balanços diferenciais descritos nas Equações 2, 6 e 10 foram resolvidos pela rotina DASSL IMSL. No algoritmo *PSO* foram usadas 20 partículas e 20 iterações; o peso inercial e os parâmetros de cognição e social foram fixados em 0,7, 1,0 e 1,0, respectivamente. Os intervalos de busca do *PSO* para os parâmetros do modelo foram:  $\varepsilon \in [0,5; 0,9]$ ,  $D_{ax} \in [1.10^{-9}; 1.10^{-4}]$ ,  $D_s \in [1.10^{-9}; 1.10^{-4}]$ ,  $k_f \in [1.10^{-12}; 1.10^{-6}]$ ,  $D_{ef} \in [1.10^{-12}; 1.10^{-6}]$ ,  $\lambda \in [0,1; 50]$ ,  $b \in [0,1; 10]$ .

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O uso de correlações para determinação de parâmetros cinéticos e hidrodinâmicos é uma prática bem comum na modelagem de processos de adsorção, entretanto, há situações em que esta prática torna-se falha, como, por exemplo, a aplicação de extrato bruto para adsorção para quitosanas (Morales *et al.*, 2009). Para tanto, o emprego de uma rotina de estimação de parâmetros (como o *PSO*) é importante para contornar estes obstáculos.

A Figura 1 mostra as curvas de ruptura experimentais e simuladas, além das variáveis operacionais: concentração de alimentação, altura do leito sedimentado e velocidade de fluxo. As curvas de ruptura experimentais diferem entre si, principalmente por causa da velocidade de fluxo, e se assemelham a uma função sigmoideal (*S-shape*). Os parâmetros do modelo estimados pelo *PSO* estão dispostos na Tabela 1 e foram usados para simular a adsorção das quitosanas. Nota-se pela Tabela 1 que o estimador também conseguiu reconhecer as tendências de alguns parâmetros como a dispersão axial, o coeficiente de transferência de massa, a capacidade máxima de adsorção, a constante de adsorção e, principalmente, a porosidade do leito.

Os dados experimentais e simulados foram comparados mediante a soma quadrática residual (*SSR*), conforme a Equação 16. Através deste cálculo observa-se uma boa concordância entre as curvas experimentais e simuladas, apesar do afastamento considerável nas regiões  $C/C_0 < 0,2$ . Os valores de *SSR* foram iguais a 0,461, 0,265, 0,487 e 0,373 para os casos A, B, C e D, respectivamente.

$$SSR = \left( \frac{C}{C_0}^{exp} - \frac{C}{C_0}^{calc} \right)^2 \quad (16)$$

Outro paralelo entre as curvas de ruptura experimentais e simuladas foi realizado a partir da eficiência do processo, como se pode observar na Equação 17. A Tabela 2 mostra os valores da eficiência do processo provenientes das curvas de ruptura experimentais e simuladas nas quatro situações testadas. Neste trabalho a eficiência do processo foi calculada quando a concentração de

saída atingiu 15 % da concentração inicial. Nos casos do leito fixo (A) e do leito expandido na velocidade 160 cm/h (C) a função eficiência experimental e calculada foram próximas, nos casos B e D, em contrapartida, elas foram bem diferentes. Este afastamento foi causado provavelmente por instabilidades na expansão do leito durante o início das corridas, o que provocou saídas  $C/C_0$  mais elevadas do que na curva simulada.

$$\phi_{15\%} = \frac{\left(0,15 \cdot t_{C/C_0=0,15} - \int_0^{t_{C/C_0=0,15}} C/C_0 \cdot dt\right)}{0,15 \cdot t_{C/C_0=0,15}} \cdot 100 \quad (17)$$

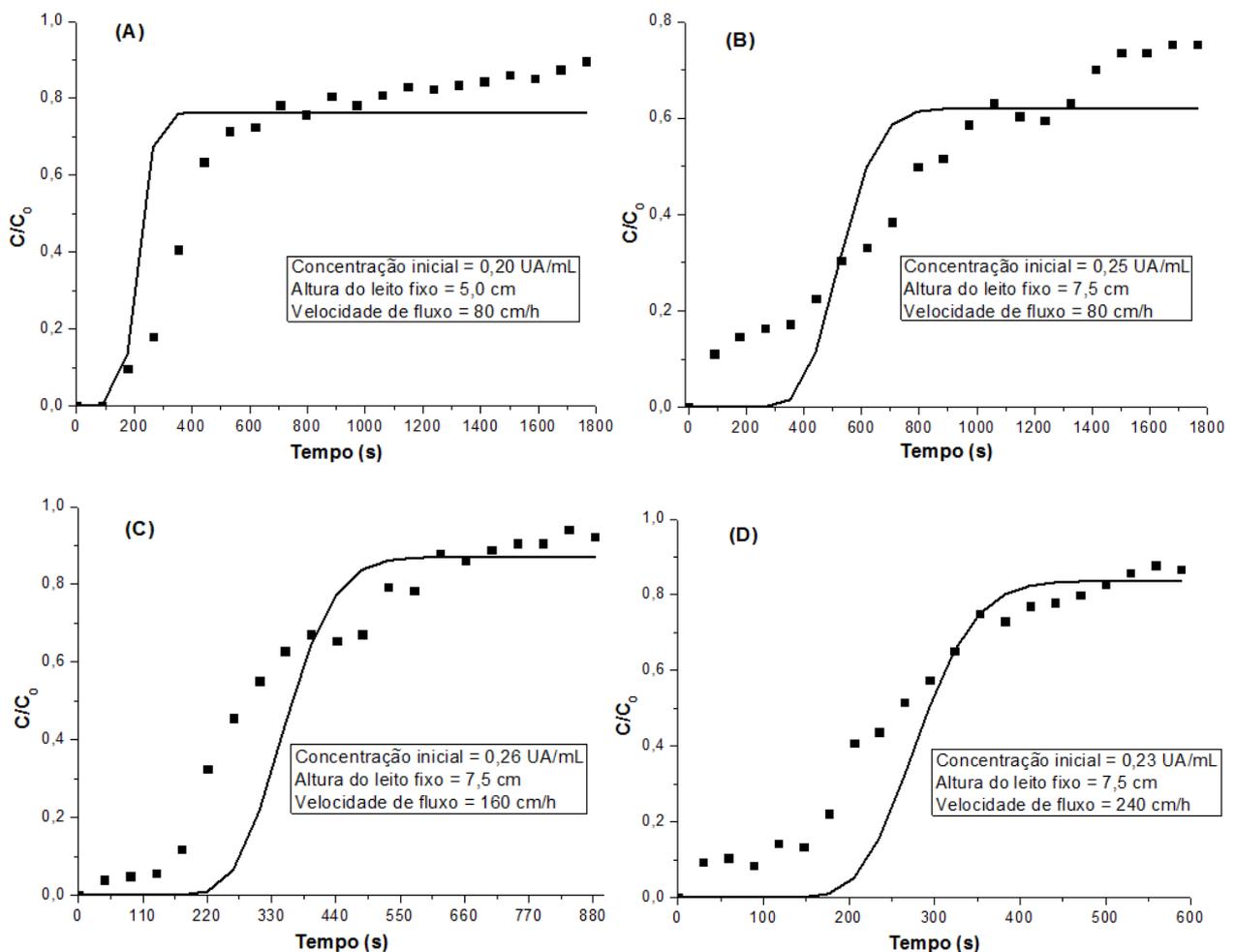


Figura 1 – Curvas de ruptura da adsorção de quitosanasas em leito fixo (A) e expandido (B, C e D). Os pontos (■) são os dados experimentais. As linhas contínuas (—) são os dados simulados.

Tabela 1 – Parâmetros estimados pelo algoritmo *PSO* nas quatro simulações

Parâmetros	Simulação A	Simulação B	Simulação C	Simulação D
$\varepsilon_L$	0,549	0,628	0,809	0,832
$D_{ax}$ ( $10^{-5}$ cm <sup>2</sup> /s)	0,446	1,198	0,260	6,466
$k_L$ ( $10^{-6}$ cm/s)	1,618	5,835	5,271	9,648
$D_{sol}$ ( $10^{-8}$ cm/s)	3,104	20,735	3,805	9,655
$D_{ef}$ ( $10^{-8}$ cm <sup>2</sup> /s)	6,244	20,912	1,117	8,810
$\lambda$ (UA/g)	26,661	25,272	29,703	36,014
$b$ (mL/UA)	4,301	3,092	4,996	4,493

Tabela 2 – Eficiência experimental e calculada para a adsorção de quitosanases em colunas de leito fixo e expandido.

Eficiência	A	B	C	D
$\phi_{15\%}^{exp}$ (%)	72,85	39,62	61,59	33,79
$\phi_{15\%}^{calc}$ (%)	75,59	87,62	64,58	88,94

## 5. CONCLUSÃO

O objetivo do trabalho foi elaborar um modelo de taxa geral para simular as curvas de ruptura de quitosanases produzidas por *Paenibacillus ehimensis* em Streamline DEAE, se valendo da ferramenta de estimação de parâmetros *PSO*. Como desejado, as curvas de ruptura experimentais demonstraram um comportamento semelhante a uma sigmóide, o que facilitou a tarefa do modelo. O estimador *PSO* organizou adequadamente cada conjunto de parâmetros a uma situação específica, possibilitando curvas de ruptura simuladas próximas das curvas de ruptura experimentais. Enfim, mostra-se válido o uso de rotinas de estimação na modelagem matemática de sistemas ALE para recuperação de quitosanases.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, N. K.; ASSIS, C. F.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R.; FARIAS, L. F.; JÚNIOR, H. A.; PEDROSA, M. F. F.; PAGNONCELLI, M. G. B. Production of Enzymes by *Paenibacillus chitinolyticus* and *Paenibacillus ehimensis* to Obtain Chitoooligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 170, p. 292-300, 2013.
- BURKERT, C. A. V.; BARBOSA, G. N. O.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F. Mathematical modeling and experimental breakthrough curves of cephalosporin C adsorption in a fixed-bed column. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 1270-1277, 2011.
- GAO, X. -A.; JU, W. -T.; JUNG, W. -J.; PARK, R. -D. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11. *Carbohydrate Polymers*, v. 72, p. 513-520, 2008.
- LIANG, T. -W.; LIU, C. -P.; WU, C.; WANG, S. -L. Applied development of crude enzyme from *Bacillus cereus* in prebiotics and microbial community changes in soil. *Carbohydrate Polymers*, v. 92, p. 2141-2148, 2013.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing Sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, 3, p. 426-428, 1959.

- SHEN, K. -T.; CHEN, M. -H.; CHAN, H. -Y.; JENG, J. -H.; WANG, Y. -J. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 1864-1871, 2009.
- SILVEIRA, E.; SOUZA-JÚNIOR, M. E.; SANTANA, J. C. C.; CHAVES, A. C.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Expanded bed adsorption of bromelain (E.C. 3. 4.22.33) from *Ananas comosus* crude extract. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 26, 2009.
- SUN, Y.; HAN, B.; LIU, W.; ZHANG, J.; GAO, X. Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium sp.* OU01. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1548-1553, 2007.
- TONG, X. -D.; SUN, Y. Particle size and density distributions of two dense matrices in an expanded bed system. *Journal of Chromatography A*, v. 977, p. 173-183, 2002.
- TONG, X. -D.; XUE, D.; SUN, Y. Modeling of expanded bed protein adsorption by taking into account the axial particle size distribution. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, p. 265-272, 2003.
- WRIGHT, P. R.; GLASSER, B. J. Modeling Mass Transfer and Hydrodynamics in Fluidized-Bed Adsorption of Proteins. *AIChE Journal*, v. 47, 474-488, 2001.
- XIA, W. S.; LIU, P.; ZHANG, J. L.; CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 170-179, 2010.
- YUN, J.; LIN, Q. -X.; YAO, S. -J. Predictive modeling of protein adsorption along the bed height by taking into account the axial nonuniform liquid dispersion and particle classification in expanded beds. *Journal of Chromatography A*, v. 1095, p. 16-26, 2005.