

RENATA CRISTINA FERREIRA

**SEPARAÇÃO DE α -LACTOALBUMINA E β -LACTOGLOBULINA DE
PROTEÍNAS DE SORO DE QUEIJO POR ADSORÇÃO EM COLUNAS DE
LEITO FIXO**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para obtenção
do título de “*Magister Scientiae*”.**

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

A Deus.
A minha família.
A Paulo.
A meus avós (*in memoriam*).

AGRADECIMENTO

A meus pais, a Paulo e a minha família, pelo apoio, pelo incentivo e pelo carinho em todos os momentos.

Ao professor Luis Antonio Minim, orientador e amigo, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos professores Jane Sélia dos Reis Coimbra e José Antônio Marques Pereira, pelas importantes sugestões e pela atenção dispensada.

À Universidade Federal de Viçosa e à CAPES, por viabilizar a execução deste trabalho.

Aos professores Sônia Denise Ferreira Rocha e Afonso Mota Ramos, pela participação na banca de defesa de tese.

Aos amigos Rafael, Abraham e Sérgio, pelo auxílio na realização dos experimentos e no desenvolvimento dos programas computacionais.

Aos colegas Mariana, Carol, Kelly, Fernanda, Lauro, Alexandre, Cássio, Edwin, Ximena, pela convivência e pelo auxílio nas atividades desenvolvidas no LPS (Laboratório de Processos de Separação).

Aos amigos, pelo incentivo e pelo auxílio espontâneos, os quais viabilizaram este curso; em especial, a Gizella, Sr. Rubens e família, Mauren, Elias, Raquel, Ricardo, Luciana e Amauri.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos e pelas colaborações.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Soro de queijo.....	4
2.1.1. Alfa-lactoalbumina.....	6
2.1.2. Beta-lactoglobulina.....	6
2.2. Processos cromatográficos.....	7
2.3. Adsorção.....	9
2.3.1. Aspectos gerais dos processos de adsorção.....	10
2.3.2. Características dos adsorventes.....	12
2.3.3. Adsorção em colunas.....	14
2.3.3.1. Isoterma de Langmuir.....	14
2.3.3.2. Isoterma de Freundlich.....	16
2.3.3.3. Isotermas competitivas.....	17
2.3.3.4. Adsorção em leito fixo.....	20
2.3.3.5. Adsorção em leitos expandidos e fluidizados.....	22
2.4. Modelagem matemática aplicada ao processo de adsorção.....	24

	Página
2.4.1. Modelagem de tanques agitados.....	25
2.4.1.1. Balanço de massa na partícula.....	25
2.4.2. Modelagem da coluna cromatográfica.....	28
2.4.2.1. Estrutura dos modelos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1. Adsorvente.....	36
3.2. Adsorvato.....	37
3.3. Experimentos para seleção do pH e força iônica na adsorção.....	37
3.4. Análise de proteínas.....	39
3.5. Cinéticas de adsorção.....	40
3.6. Isotermas de adsorção.....	41
3.7. Caracterização do leito.....	43
3.8. Determinação da difusividade na partícula.....	50
3.9. Determinação dos parâmetros de transferência de massa e disper- são axial na coluna.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Curvas de calibração das proteínas α -la e β -lg.....	52
4.2. Seleção do pH e força iônica para adsorção.....	55
4.3. Determinação da difusividade na partícula.....	59
4.4. Isotermas de adsorção de proteínas obtidas por análise fron- tal.....	61
4.5. Determinação da porosidade da partícula e do leito de resina.....	63
4.6. Determinação dos parâmetros de transferência de massa e disper- são axial na coluna.....	66
5. CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

RESUMO

FERREIRA, Renata Cristina, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Separação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina de proteínas de soro de queijo por adsorção em colunas de leito fixo.** Orientador: Luis Antonio Minim. Conselheiros: Jane Sélia dos Reis Coimbra e José Antonio Marques Pereira.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em escala preparativa ou de processo, tem tido importante papel na produção de substâncias com elevado grau de pureza. Tendo em vista que a CLAE tem custo relativamente elevado e, ao mesmo tempo, é uma etapa de alta resolução e seletividade, um conhecimento abrangente de sua dinâmica é essencial aos propósitos de projeto e de operação de equipamentos. Embora existam muitos estudos sobre o processo de adsorção de proteínas puras em vários adsorventes, poucas pesquisas têm sido feitas para sistemas multicomponentes mais realísticos, como é o caso das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina presentes no soro de queijo. Estas representam mais de 50% das proteínas do soro e 20% das proteínas totais do leite e possuem elevado valor nutricional e propriedades funcionais que permitem o seu uso como ingredientes alimentícios com capacidade para substituir outros mais caros. Neste trabalho foram analisadas, por meio de dados experimentais e de modelagem matemática, as características de transferência de massa no

processo de separação de proteínas de soro de queijo em colunas de leito fixo. Inicialmente, foram determinadas as condições ótimas de adsorção, em relação aos parâmetros de pH e força iônica, utilizando a resina Accel Plus QMA[®], em que se verificou que o processo de adsorção é mais sensível aos valores de força iônica mais elevados para as duas proteínas. Em seguida, a partir dos dados de cinética de adsorção em tanques agitados, foi calculada a difusividade intrapartícula das duas proteínas. Foram determinadas as isotermas de adsorção no sistema estudado. Os valores dos parâmetros q_m e k_d foram calculados por meio de regressão não-linear, utilizando o modelo de isoterma não-competitiva de Langmuir. Com base nos dados experimentais de adsorção em colunas, foram determinados os valores de Pe e Nu , por meio de regressão não-linear. O modelo de transferência de massa com dispersão axial (pseudo-homogêneo) descreveu, adequadamente, o processo de adsorção.

ABSTRACT

FERREIRA, Renata Cristina, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2001. **Separation of α -lactoalbumin e β -lactoglobulin of whey proteins for adsorption in fixed bed columns.** Advisor: Luis Antonio Minim. Committee members: Jane Sélia dos Reis Coimbra e José Antonio Marques Pereira.

Preparative and process-scale high-performance liquid chromatography (HPLC) has had an important role in the production of highly purified substances. Since HPLC is a relatively expensive process, and at the same time it's a very high resolution and selective step, an adequate understanding of its dynamics is essential to the project and the equipments operation. There are a lot of published studies of pure proteins adsorption to several adsorbents. However, a few studies has been reported using more realistic multicomponent systems, as α -lactoalbumin and β -lactoglobulin proteins present in the cheese whey. These proteins represent over 50% of the proteins of the serum and 20% of the total protein of the milk, and they have a high nutritional value and functional properties that allows its use on food to substitute some other high cost ingredients. In this work the characteristics of mass transfer in the separation process of whey proteins in fixed bed columns were analysed by experimental data and mathematical modelling. Initially, the optimum conditions of adsorption in terms of the pH and ionic force parameters were determined using the Accel Plus QMA[®] resin where the adsorptive process is more sensitive to higher values

of ionic strength for both proteins. Then, the intraparticle diffusivity of the two proteins was calculated by the data of adsorption kinetics in agitated tanks. The adsorption isotherms were determined in the studied system. The values of the parameters q_m and k_d were calculated by non-linear regression, using the non-competitive model of Langmuir isotherm. Based in the experimental data of adsorption in columns, the values of Pe and Nu were adjusted by non-linear regression. The mass transfer model with axial dispersion (pseudo-homogeneous) described, appropriately, the adsorption process.

1.INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em escala preparativa ou de processo, tem importante papel na produção de substâncias com elevado grau de pureza. A adsorção de proteínas em interfaces sólido-líquidas tem sido relatada desde o início do século passado, quando foi demonstrada a capacidade de vários suportes inorgânicos em adsorver proteínas do soro de cavalo (HUANG e HORVÁTH, 1987). A indústria de biotecnologia vem usando a cromatografia de troca iônica, como uma das principais técnicas para concentração e purificação de proteínas, em cerca de 75% dos esquemas preparativos (CHANG e CASE, 1996; PEREIRA, 1999).

Tendo em vista que a CLAE é um processo de custo relativamente elevado e, ao mesmo tempo, uma etapa de alta resolução e seletividade, um entendimento abrangente de sua dinâmica é essencial aos propósitos de projeto e operação de equipamentos. A modelagem é, portanto, uma ferramenta muito útil para o desenvolvimento amplo do conhecimento das etapas cromatográficas, assim como a sua otimização.

Um elemento-chave na modelagem precisa desse processo é o conhecimento dos dados que descrevem o equilíbrio de adsorção de cada componente no sistema, constituído do material a ser analisado e dos componentes da fase móvel. Nenhuma predição do comportamento da coluna

pode ser feito sem que sejam conhecidas as isotermas de adsorção para cada um dos compostos a serem analisados. Há muitos estudos publicados sobre o processo de adsorção de proteínas puras em vários adsorventes; no entanto, em poucas pesquisas têm sido usados sistemas multicomponentes mais realísticos (SKIDMORE e CHASE, 1990), como é o caso das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina presentes no soro de queijo.

O soro de queijo é um importante subproduto da indústria de laticínios. Consiste de 80% a 90% do volume de leite usado no processo de produção de queijos e contém, em média, 50%, dos nutrientes do leite original (WIT, 1998). A demanda bioquímica de oxigênio do soro é considerada cerca de cem vezes mais poluente do que o esgoto doméstico, sendo a lactose, principal componente, responsável por 80% da poluição causada pelo soro, contra 20% da fração protéica (FERRAT, 1980).

O conteúdo de proteínas no soro de queijo é de, aproximadamente, 6 g/L a 9 g/L, o que representa um grande potencial disponível. Dentre essas proteínas destacam-se a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina, que representam mais de 50% das proteínas do soro e 20% da proteína total do leite. A α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina são bons agentes espumantes e emulsificantes, consideradas como potenciais ingredientes alimentícios com capacidade para substituir outros mais caros, como, por exemplo, proteínas de ovo, em produtos à base de carnes, em panificação e na fortificação de cereais (MORR e HA, 1993).

Esta pesquisa objetivou avaliar o processo de adsorção das proteínas de soro de queijo (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina), em colunas de leito fixo. Especificamente, dividiu-se o estudo em seis etapas, que consistiram em:

- Determinação das condições ótimas de adsorção, em relação aos parâmetros pH e força iônica, utilizando a resina Accel Plus QMA[®];
- Desenvolvimento de uma metodologia para quantificação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinação do coeficiente de difusividade na partícula a partir das curvas cinéticas de adsorção das proteínas para a resina Accel Plus QMA[®];

- Determinação das isotermas de adsorção das proteínas de soro de queijo para a resina Accel Plus QMA[®];
- Determinação das curvas de ruptura; e
- Modelagem e análise matemática do processo de adsorção em coluna de leito fixo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Soro de queijo

O soro de queijo é um subproduto derivado da elaboração do queijo (MADRID et al., 1995). Possui cor amarelo-esverdeada e sabor ligeiramente ácido ou doce, dependendo do tipo de queijo do qual foi originado.

A composição desse subproduto varia com a qualidade do leite utilizado e com o tipo de queijo produzido. A concentração de vitaminas lipossolúveis no soro é muito baixa em relação aos outros componentes, sendo praticamente insignificante. Os Quadros 2.1 e 2.2 mostram a composição média dos dois tipos de soro e a concentração de proteínas presentes no soro, respectivamente.

A produção mundial de soro de queijo está estimada em torno de 120 milhões de toneladas/ano (ANUALPEC, 1999). Em virtude de sua composição, tem elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), que pode variar de 40.000 ppm a 60.000 ppm (BEM-HASSAN e GHALY, 1994). Dado o modo como é descartado pelos laticínios em leitos de rios e solo, o soro de queijo tornou-se um potencial agente de poluição ambiental.

Diante desse fato, uma série de produtos tem sido desenvolvida para o aproveitamento do soro, tais como soro em pó, concentrados protéicos para alimentação humana, soro desmineralizado, bebidas lácteas especiais e outros.

Quadro 2.1 - Composição média de soros doce e ácido

	Soro Doce (%)	Soro Ácido (%)
Umidade	93 - 94	94 - 95
Gorduras	0,3 - 0,5	0,3 - 0,6
Proteínas	0,8 - 1,0	0,8 - 1,0
Lactose	4,5 - 5,0	3,8 - 4,2
Minerais	0,5 - 0,7	0,7 - 0,8
Ácido láctico e outros	0,1	0,1 - 0,8

Fonte: MADRID et al., 1995.

Quadro 2.2 - Concentração das proteínas no soro de queijo

Proteína	Concentração (g/L)	% da proteína total do leite
β -lactoglobulina	2 - 4	9
α -lactoalbumina	1 - 1,5	4
Protease - peptonas	0,6 - 1,8	4
Albumina do soro	0,1 - 0,4	1
Imunoglobulinas	0,6 - 1,0	2

Fonte: FENNEMA, 1993.

O conteúdo de proteínas no soro de queijo é de, aproximadamente, 6 g/L a 9 g/L, o que representa um grande potencial disponível. Essas proteínas são muito conhecidas pelo seu elevado valor nutricional e por suas propriedades funcionais nos produtos alimentares. Nas últimas décadas, tem havido crescente interesse pela utilização das proteínas do soro em formulações de produtos da indústria de alimentos destinados a crianças, diabéticos e consumidores de produtos enriquecidos (WIT, 1998).

Segundo a avaliação da “Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scoring”, as proteínas do soro alcançam o valor biológico de 1,0 (em uma escala

de 0 a 1), dada sua excelente digestibilidade e pelo fato de fornecer ou superar a quantidade recomendada de cada aminoácido essencial (USDEC NEWS, 1999).

2.1.1. Alfa-lactoalbumina

A α -lactoalbumina (α -la) é uma proteína globular que contém 123 resíduos de aminoácidos e possui uma massa molar de 14200 Da. O aminoácido triptofano é o mais abundante nessa proteína, representando, aproximadamente, 6%. É apropriada para a preparação de alimentos infantis e possui um custo relativamente baixo (BRAMAUD et al., 1997). O ponto isoelétrico é de 5,1, sendo facilmente desnaturada em pH 6,7, à temperatura de 65,2 °C (MORR e HA, 1993). A partir da α -la são obtidos peptídios que contêm triptofano, precursores da serotonina, uma substância que regula a vigília e o sonho (GRASSELLI et al., 1997).

2.1.2. Beta-lactoglobulina

A β -lactoglobulina (β -lg) representa cerca do 50% do total das proteínas do soro, é constituída de 162 resíduos de aminoácidos e possui uma massa molar de, aproximadamente, 32000 Da. Tem ponto isoelétrico 5,3, é termolábil e apresenta mudanças conformacionais reversíveis a temperaturas inferiores a 70 °C. Temperaturas elevadas podem provocar a desnaturação e a polimerização irreversível desta proteína, que é considerada um ótimo agente de gelatinização (MORR e HA, 1993).

A β -lg pode ser usada para fortificação de bebidas e sucos de frutas, em razão de sua grande solubilidade, de sua estabilidade e de seu valor nutritivo. Preparados enzimáticos hidrolizados são empregados como suplemento na alimentação de convalescentes, já que muitos peptídios da β -lg podem ser absorvidos diretamente pelo intestino. A partir de hidrolizados de β -lg são também preparados leites com baixo conteúdo de fenilalanina, usados na alimentação de lactantes com fenilcetonúria (GRASSELLI et al., 1997).

A aplicação direta do soro em leites infantis não deve ser feita, pois eleva o conteúdo de β -lg, quando comparado com o leite materno, que apresenta apenas resíduos desta proteína. A β -lg é conhecida como o principal componente alergênico do leite bovino, razão por que um dos objetivos do processamento das proteínas do soro é a redução do seu conteúdo, ao mesmo tempo que são retidas as outras proteínas (COIMBRA, 1995; MÄKINEN-KILJUNEN e SORVA, 1993).

2.2. Processos cromatográficos

A cromatografia líquida pode ser definida como um processo de migração, visto que os componentes de uma amostra são seletivamente retidos pela fase estacionária, que pode ser de material sólido ativo, líquido imobilizado ou gás (COLLINS et al., 1990).

Os processos cromatográficos são, freqüentemente, utilizados na purificação de macromoléculas, mas exibem baixa produtividade quando comparados com técnicas tradicionais usadas na indústria química e farmacêutica. O grande sucesso das separações cromatográficas de proteínas é, contudo, devido a sua capacidade em atingir elevado grau de pureza a partir de misturas complexas com reduzidas concentrações de tais compostos (BOSCHETTI e COFFMAN, 1998).

Este é um poderoso método de separação, pois pode promover, facilmente, a retirada individual de vários componentes de uma mistura, sob condições experimentais, em que as duas fases de um sistema estão sempre próximas do equilíbrio, dada a rápida transferência de massa entre as duas fases. O poder de separação de uma coluna é função direta da taxa de transferência de massa e do coeficiente de dispersão axial. O fenômeno de transferência de massa em uma coluna cromatográfica engloba os efeitos da difusão, da resistência à transferência de massa, da viscosidade e das cinéticas de adsorção e dessorção (GUIOCHON et al., 1994).

A cromatografia frontal é o primeiro passo em muitos processos de purificação de biocompostos que envolvem eluição diferencial. O método pode ser aplicado quando o produto a ser purificado tem pequena afinidade com a fase estacionária, em relação à dos outros componentes presentes, e, portanto, tem o ponto de ruptura antecipado em relação aos demais (JACOBSON et al., 1984).

A cromatografia sólido-líquida ou adsorção está relacionada com a interação polar-polar dos grupos funcionais das partículas da fase estacionária e do soluto. O soluto é adsorvido pela superfície das partículas sólidas, e a sua separação ocorre pelo equilíbrio entre a quantidade de composto adsorvido e a fase líquida (GUIOCHON et al., 1994).

A escolha da fase estacionária (adsorvente) é realizada para permitir a interação diferencial dos componentes da amostra a serem separados. O mecanismo proposto para explicar a adsorção baseia-se na competição entre as moléculas do soluto e do solvente pelos sítios ativos presentes na superfície do adsorvente. Assim, com o aumento relativo da adsorção da fase móvel, a adsorção do soluto diminui. Os solventes podem ser, então, classificados de acordo com a sua força de atração pelo adsorvente (GUIOCHON et al., 1994).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) mostra-se eficiente na quantificação de proteínas, por apresentar alta resolução em seus cromatogramas. Essa eficiência é dada pelo uso de resinas com diminutos tamanhos de partícula (5 nm a 10 µm), o que torna necessário o emprego de altas pressões, 5 MPa a 30 MPa, para deslocar a fase móvel através da fase estacionária (ARAÚJO, 1999).

Mais de 70% de todas as separações por CLAE usam fase reversa, em que a fase estacionária é apolar, e a fase móvel, polar. Em geral, a superfície das partículas sólidas é polar, razão por que não são úteis na separação de compostos apolares. Na solução desse problema é utilizada a fase reversa. A superfície reativa das partículas é alterada pela reação com compostos apolares, que são quimicamente ligados aos seus grupos polares.

A cromatografia de fase reversa é empregada para separar amostras com baixa solubilidade em água. A ordem de eluição dos solutos é o inverso da

observada na fase normal, ou seja, compostos polares são os primeiros a serem eluídos e os solutos apolares, os últimos (ARAÚJO, 1999).

A cada dia, o uso de técnicas cromatográficas analíticas, como CLAE, vem tornando-se mais intenso, em razão do desenvolvimento de novos equipamentos que permitem a realização de análises cada vez mais rápidas e precisas.

PEARCE (1983), ao aplicar CLAE na análise de proteínas de soro de queijo, utilizou uma pequena coluna de fase reversa, Spherisorb S5 C6, com um gradiente que envolvia uma solução salina acidificada (NaCl 0,15 M pH 2,1) e acetonitrila (100%), em um fluxo de 1 mL/min e temperatura de 30 °C. O resultado mostrou completa resolução das proteínas BSA (albumina de soro bovino), β -lg e α -la, em 30 min de análise. Por meio dessa metodologia também foi possível obter uma boa resolução entre as variações genéticas A e B, da β -lg.

HOLLAR et al. (1991), na separação de variantes genéticas da β -caseína, utilizaram um gradiente não-linear, com tampão de acetato de uréia, pH 2, contendo 1 M de NaCl, e um cromatógrafo líquido FPLC (Pharmacia), com uma coluna cromatográfica de troca catiônica Mono S HR5/5.

2.3. Adsorção

O conhecimento de que um sólido poroso pode acumular grandes volumes de um gás condensável data de 1777, quando Fontana observou que carvão recém-calcinado era capaz de reter quantidades expressivas de diferentes gases. A literatura da época relatou que o volume retido depende do carvão e do tipo de gás testado e que a eficiência do processo é uma função da área exposta e da porosidade do material. O termo adsorção foi introduzido por Kayser, em 1881, para denominar o fenômeno de condensação de gases em superfícies e salientar sua diferença com a absorção, em que as moléculas do gás penetram no interior do sólido. A adsorção é, atualmente, definida como o enriquecimento de um ou de mais componentes em uma região interfacial. Usualmente, embora a adsorção seja empregada para denominar o fenômeno conjunto de adsorção e condensação

capilar nos poros de um sólido, o correto, nesses casos, deveria ser o emprego do termo sorção (ADAMSON, 1990).

A importância do uso das técnicas de adsorção, em escala comercial, reside na disponibilidade de equipamentos já desenvolvidos, cujo desempenho é, ao menos em parte, conhecido. No entanto, o projeto desses equipamentos baseia-se em estudos realizados com sistemas petroquímicos em colunas de adsorção ou, mais recentemente, em equipamentos que envolvem a integração adsorção e cromatografia (COIMBRA, 1995; WANKAT, 1986). Portanto, há necessidade de estudos que possam aprimorar o emprego dessas técnicas e equipamentos na separação e na purificação de substâncias de uso corrente, em indústrias farmacêuticas e de alimentos.

2.3.1. Aspectos gerais dos processos de adsorção

A maior parte dos processos de recuperação de biocompostos emprega etapas cromatográficas, entre outros métodos convencionais de separação, com vistas em atingir níveis de pureza de acordo com regulamentações, especialmente proteínas terapêuticas. A cromatografia é, geralmente, sofisticada e de alto custo, o que faz com que seja necessário o desenvolvimento de estudos mais efetivos para melhorar a produtividade dessa técnica para dado sistema adsorvente-adsorvato (GUIOCHON et al., 1994).

O processo de separação por cromatografia pode ser brevemente descrito, considerando o escoamento de um fluido que contém o soluto entre os espaços vazios externos das partículas adsorventes. O soluto é transportado, por meio de difusão, através de um filme externo, sendo adsorvido na superfície exterior da partícula ou dentro de seus poros. A adsorção ocorre em um sítio desocupado, em razão das forças elétricas, físicas ou reações químicas. Determinada molécula pode ser adsorvida e dessorvida várias vezes, enquanto permanecer dentro de uma única partícula. Após a dessorção, atravessa o filme externo, atingindo a camada de fluido em movimento, até que, novamente, seja transportada, por

difusão, para o interior de outra partícula, repetindo todo o processo (WOLF, 1971).

Os estudos sobre adsorção vêm abrangendo uma área de pesquisa muito extensa, pois o que era quase que exclusivamente voltado para a indústria petroquímica tem-se, atualmente, tornado de grande interesse nas etapas de separação e purificação dos processos biotecnológicos. WANG e SWAISGOOD (1993) imobilizaram trans-retinal em Celite, que foi aplicado, como uma matriz seletiva de adsorção, na remoção de β -lg de soro de queijo. No fracionamento foram usados soros ácido e doce e um isolado de proteína de soro de queijo. A seletividade da coluna de adsorção foi escalonada para tratar 1,0 L de soro, ou similar quantidade de isolado de proteína de soro de queijo. A β -lg foi adsorvida na matriz com 0,05 M de solução tampão fosfato, pH 5,14. A cromatografia de exclusão por tamanho, com Superose 12, foi utilizada na determinação da quantidade de β -lg e α -la, em várias frações. Durante o estágio de adsorção, uma fração enriquecida com α -la foi obtida. Em seguida, β -lg foi dessorvida em solução tampão fosfato 0,4 M, pH 7,0. Aproximadamente 2,0 g de β -lg foram obtidos nos estágios de adsorção e dessorção para a coluna de 500 mL. A imobilização e a protonação química do trans-retinal, para avaliar a afinidade de ligação, foi examinada por Ressonância Nuclear Magnética.

O soro de queijo bovino também foi investigado como uma fonte de fatores estimulantes de crescimento. A cromatografia de troca catiônica foi considerada como um processo de enriquecimento desses fatores de crescimento, visto que, em contraste com a maioria das proteínas do soro, tem pontos isoelétricos básicos. A adsorção e a eluição, em resina Sepharose Fast Flow-S, produziram um extrato que continha 1% a 2% de proteínas do soro, mas rico em fatores que possuem atividade promotora de crescimento em células BALB/C 3T3, L6 mioblastos e fibroblastos da pele humana. Esses resultados sugerem que o enriquecimento dos fatores de crescimento, por cromatografia de troca catiônica, oferece um método prático para isolamento, em larga escala, de um extrato de compostos provenientes do soro de queijo, os quais estimulam o crescimento celular (FRANCIS et al., 1995).

As proteínas de soro de queijo foram separadas por cromatografia de deslocamento por troca iônica, mediante o uso de ácido poliacrílico (PAA) como agente deslocador. O soro continha, inicialmente, 3,45 g/L de α -la e 12,65 g/L de β -lg, juntamente com outros compostos UV-ativos. O soro pôde ser aplicado, diretamente, em uma coluna de troca aniônica (BIO-SCALE, 7/52 mm), sem nenhum processamento prévio. A concentração final das proteínas, quando comparada com a da alimentação, foi três vezes superior. As purezas de α -la e β -lg foram de 78% e 92%, respectivamente (VOGT e FREIGAT, 1997).

HEDDLESON et. al. (1997) utilizaram uma coluna de bioafinidade imobilizada com trans-retinal em Celite, capaz de isolar β -lg de soro de queijo bovino ácido com elevado grau de pureza (94,5%). Foram investigadas condições de pH e força iônica que poderiam produzir redução do fator hipoalergênico (β -lg) do soro de queijo. A aplicação de um eluente com pH 5,1 na eluição das proteínas da coluna resultou em um grau de purificação de 87% para α -la. Verificou-se que a pureza da β -lg era ligeiramente menor em tampão de eluição com força iônica menor que 0,4 M de fosfato de sódio. A dessorção com baixa concentração de fosfato foi melhorada quando o pH se tornou elevado. Esses resultados sugerem que a matriz de retinal tem grande aplicação no processamento de produtos para pacientes hipoalergênicos e, conseqüentemente, no isolamento de β -lg com alto grau de pureza.

Diante desses fatos, observa-se que o uso de técnicas cromatográficas vem adquirindo, cada vez mais, espaço entre os processos de separação, em que o produto desejado possui propriedades químicas, físicas e biológicas sensíveis (ex: temperatura, pH), razão da necessidade de um método de separação que mantenha essas propriedades intactas.

2.3.2. Características dos adsorventes

É usual o emprego de adsorventes altamente porosos e com grande área superficial nas operações de sorção, como adsorção, cromatografia, troca iônica e exclusão de íons, entre outros. As partículas dos adsorventes, normalmente, têm

formas e tamanhos diferentes e apresentam porosidade média entre partículas, a qual, em decorrência de um empacotamento adequado, será constante ao longo do leito. Cada partícula apresenta uma porosidade, definida como a fração da partícula correspondente aos espaços vazios. Considera-se que, em um empacotamento uniforme, a porosidade seja a mesma para todas as partículas. Somente 2% da área superficial adequada à separação corresponde à superfície externa do empacotamento, o que indica que o processo de separação ocorre, efetivamente, no interior das partículas (SOMORJAI, 1994).

Tendo em vista que os poros não possuem tamanho uniforme, moléculas grandes, como proteínas ou polímeros sintéticos, podem ser estericamente separadas em algum deles. A fração de volumes de poros que uma molécula pode atingir é denominada K_d . Moléculas muito pequenas podem adentrar todos os poros; então, K_d será igual a 1, enquanto moléculas muito grandes não podem adentrá-los, razão por que K_d será igual a zero. As separações que utilizam a exclusão por tamanho, como permeação e filtração por gel, são fundamentadas em diferenças de K_d (ADAMSON, 1990).

Segundo SOMORJAI (1994), os adsorventes podem ser divididos em três classes, de acordo com a sua natureza:

I- Sem íons ou grupos com capacidade de polarização, por exemplo, o carbono grafitizado empregado na adsorção de gases nobres, hidrocarbonetos saturados.

II- Com cargas concentradas positivas, por exemplo, os íons H^+ em grupos OH de óxidos hidroxilados, utilizados na adsorção de esteres, aminas, compostos com cargas negativas e positivas concentradas.

III- Com cargas concentradas negativas, como, por exemplo, $=O$, $=CO$ usadas na adsorção de compostos de cargas positivas e negativas concentradas e de compostos com grupos funcionais com pares de elétrons não-compartilhados.

Algumas variedades de adsorventes, como carvão ativado e resinas de troca iônica, exibem diferentes tipos de poros, macroporos e microporos, com duas porosidades internas. Moléculas pequenas permeariam todos os poros; as grandes permeariam somente os macroporos; e as muito grandes permaneceriam no volume vazio externo.

2.3.3. Adsorção em colunas

No método de separação sólido-líquido, freqüentemente utilizado nas operações de separação e purificação, o líquido que contém o soluto a ser adsorvido pode entrar em contato com o sólido em tanques agitados ou em colunas que são usados para acomodar as partículas do adsorvente. A adsorção em colunas pode ser realizada com leitos fixos, expandidos e fluidizados (HJORTH et al., 1998).

A adsorção é analisada com base no equilíbrio entre as fases envolvidas e nos balanços de massa por meio de isotermas de adsorção (ARAÚJO, 1996). No estudo de equilíbrio, a isoterma de adsorção representa o equilíbrio sólido-líquido de um soluto adsorvido, em dada massa de fase estacionária, em contato com uma solução que contém o soluto. Atualmente, os modelos de isotermas mais empregados para representar o equilíbrio sólido-líquido são o de Langmuir e o de Freundlich. Essas isotermas têm permitido correta descrição dos dados experimentais em vários estudos sobre soluções diluídas de um componente (GUIOCHON et al., 1994).

Este estudo é de fundamental importância para a modelagem precisa de um processo cromatográfico, pois um dos principais termos dos modelos matemáticos são os dados que descrevem o equilíbrio na adsorção de cada componente (presentes na alimentação e na fase móvel) do sistema. No entanto, pesquisas para determinação de isotermas de adsorção, em sistemas multicomponentes, não têm sido feitas com freqüência (JACOBSON e FRENZ, 1990).

2.3.3.1. Isoterma de Langmuir

O modelo de isoterma de LANGMUIR (1916), Equação 1, aparece para explicar, de forma favorável, os dados de adsorção obtidos em baixas ou em moderadas concentrações.

$$q = \frac{q_m c}{k_d + c}, \quad (1)$$

em que q é a quantidade de soluto adsorvido por unidade de massa ou por volume do adsorvente (mg/g ou mg/mL); q_m é a quantidade máxima de soluto adsorvida na fase sólida (mg/g); c é a concentração do soluto na fase líquida, no equilíbrio (mg/mL); k_d é a constante de dissociação que descreve o equilíbrio da adsorção (mg/mL).

O modelo de isoterma de Langmuir pode ser considerado como a base da maioria dos tratamentos teóricos do fenômeno de adsorção. Essa isoterma corresponde a um modelo de adsorção altamente idealizado, baseado nas seguintes hipóteses:

- 1- Moléculas da fase fluida são adsorvidas em sítios discretos da superfície, denominados sítios de adsorção, em que cada sítio pode acomodar apenas uma única espécie;
- 2- A energia de cada sítio de adsorção da superfície é igual e independente da população de espécies adsorvidas. Portanto, todos os sítios têm a mesma entalpia de adsorção e independem do grau de cobertura da superfície;
- 3- A quantidade máxima da espécie adsorvida corresponde à formação da monocamada;
- 4- A adsorção é localizada e ocorre pela colisão das moléculas da fase fluida com sítios vagos da superfície;
- 5- A velocidade de dessorção depende apenas da quantidade de material adsorvido na superfície.

Essas condições podem não ser válidas na adsorção em sistemas sólido-líquidos, especialmente em altas concentrações.

Na prática, os dados experimentais de adsorção concordam com a isoterma de Langmuir, em uma faixa relativamente extensa de concentrações. Assim, o modelo de Langmuir aparece como a primeira escolha de equação teórica para ajustes de resultados experimentais em que se considera a adsorção de um componente (GUIOCHON et al., 1994).

Em experimentos que envolvem a adsorção de BSA e lisozima puras utilizou-se a resina S Sepharose FF. Os resultados de equilíbrio ajustaram-se ao modelo de Langmuir, comportamento que pode ser explicado por uma adsorção da proteína por troca iônica, em que a proteína desloca o contra-íon associado ao grupo carregado do trocador (SKIDMORE e CHASE, 1990).

JAMES (1994) comparou a adsorção de lactoferrina e lactoperoxidase puras em três resinas fortemente aniônicas, na presença de 50 mM de tampão fosfato, em diferentes pH. Nas análises dos dados de equilíbrio usou-se regressão não-linear, e os parâmetros ajustados foram determinados pelo modelo de Langmuir. As curvas ajustadas demonstraram que todos os dados da isoterma podiam ser aproximados, com boa concordância, ao modelo de Langmuir. A inclinação inicial das curvas indicou forte adsorção e rápida saturação, um comportamento típico de biocompostos em troca iônica. Observou-se que a capacidade máxima de adsorção das resinas, para as duas proteínas, diminuía com o aumento do pH e que a capacidade máxima das resinas, para a lactoferrina, era sempre maior. A elevação do pH acarretou, também, redução da inclinação inicial das curvas.

2.3.3.2. Isoterma de Freundlich

O modelo de isoterma empírica, proposta por Boedeker em 1885, que é a base da isoterma de Freundlich (Equação 2), descreve a adsorção de componentes polares em adsorventes polares ou de compostos fortemente polares em solventes cuja polaridade é baixa ou média:

$$q = aC^{1/n} \quad , \quad (2)$$

em que o expoente $1/n$ é menor que a unidade (nos resultados de Boedeker era 0,5). O modelo de Freundlich parece próprio para avaliar a adsorção de certas proteínas em cromatografia de troca iônica (GUIOCHON et al., 1994) e tem a principal desvantagem de violar o modelo da isoterma de Gibbs, já que não é

termodinamicamente consistente. Do ponto de vista prático, o limite, em baixa concentração, da razão q/C não é finito, o que significa que o tempo de retenção, sob condições analíticas, é infinito (GUIOCHON et al., 1994).

2.3.3.3. Isotermas competitivas

Na maioria dos casos de importância prática, a cromatografia líquida é empregada em misturas. Nesse caso, há grande dificuldade na obtenção de resultados, dada a possível competição entre os diferentes compostos pela fase estacionária. Observa-se, nesses casos, que as isotermas de adsorção dos vários componentes da solução são não-lineares. As isotermas não são totalmente independentes quando a alimentação não é muito diluída. Em uma solução de concentração conhecida, a quantidade de um composto adsorvido no equilíbrio é uma função da sua própria concentração e também da de todos os outros componentes presentes na solução, os quais são adsorvidos pela fase estacionária. Adicionalmente, a quantidade de uma substância adsorvida em equilíbrio com a solução quase sempre diminui, quando a concentração de outro composto adsorvido é elevada. Isto ilustra a característica competitiva da adsorção. Por essa razão, isotermas de multicomponentes são consideradas, na maioria dos casos, isotermas competitivas (GUIOCHON et al., 1994).

O estudo das isotermas competitivas é recente, quando comparado ao estudo dos processos de adsorção. Os mecanismos de competição por acesso à superfície de adsorção, o envolvimento no processo de retenção entre vários componentes e a modelagem desse fenômeno ainda necessitam de muitos estudos para serem compreendidos, em decorrência das dificuldades experimentais encontradas na medida de isotermas competitivas, nos métodos tradicionais. Dado o desenvolvimento da cromatografia e de técnicas convenientes que permitem rápida aquisição de dados, essa área de pesquisa tem tido expressivo desenvolvimento, permitindo maior entendimento do fenômeno de competição existente em muitos processos de adsorção multicomponente (GUIOCHON et al., 1994).

BELLOT e CONDORET (1993) avaliaram a influência de modelos utilizados na descrição das interações competitivas entre a fase estacionária e os solutos e na simulação da cromatografia de deslocamento em fase reversa. Dados experimentais de separação de misturas de catecol e resorcinol, usando fenol como deslocador, foram comparados com simulações numéricas. O modelo competitivo de Langmuir, o de LeVan-Vermeulen e o quadrático foram usados para descrever o equilíbrio de adsorção competitiva. Verifica-se que as equações de isotermas competitivas, com parâmetros ajustados numericamente, não fornecem uma descrição do processo de separação por deslocamento. Por outro lado, a isoterma de LeVan-Vermeulen, com parâmetros de Langmuir não-competitivos, ajustou-se aos dados experimentais obtidos.

LISEC et al. (2001) empregaram análise frontal para determinar isotermas de adsorção de três componentes, como solutos simples e em misturas binárias e ternárias, em um sistema de fase reversa. Os dados de equilíbrio foram correlacionados com o modelo de isoterma competitiva de Langmuir, com o modelo Bi-Langmuir, com a teoria de solução ideal adsorvida e com a teoria de solução real adsorvida. Não ocorreu mudança apreciável nos resultados, quando os valores preditos foram obtidos por meio de modelos mais complexos e não pelo de Langmuir.

O modelo de isoterma de equilíbrio de Langmuir pode ser estendido para sistemas multicomponentes. Quando muitos compostos estiverem presentes em uma solução, a quantidade adsorvida de cada um deles, no equilíbrio, poderá ser menor que se aquele componente estivesse sozinho, pois os outros elementos interferem na sua adsorção.

Para o *i*-ésimo composto de um sistema multicomponente, a isoterma competitiva é dada pela Equação 3, a seguir.

$$q_i = \frac{q_{mi}C_i}{1 + \sum_{j=1}^n k_{dj}C_j}, \quad (3)$$

em que *n* é o número de componentes do sistema; *q_i* é a quantidade de soluto adsorvido; *C_i* é a quantidade de soluto no equilíbrio e *q_{mi}* e *k_{di}* são os coeficientes

da isoterma de equilíbrio de Langmuir de um componente para o elemento i . A isoterma competitiva de Langmuir apresenta uma propriedade importante, qual seja, o fator de separação é constante, independente da composição relativa da mistura. Como consequência, este modelo não oferece nenhuma possibilidade de explicar uma inversão na ordem de eluição de dois componentes com o aumento da concentração. Ao contrário, resultados experimentais mostram que, dessa maneira, uma inversão é possível, e isto não é raro quando a capacidade de saturação de dois compostos, calculada a partir de isotermas de um componente, é muito diferente. Por ser um modelo simples, deve-se considerar a isoterma competitiva de Langmuir como uma aproximação aceitável de um modelo de primeira ordem, em grande variedade de casos. Além disso, a facilidade com que os seus parâmetros podem ser determinados é muito atrativa. Entretanto, a predição quantitativa do comportamento da isoterma competitiva para componentes de misturas binárias não será possível, quando a diferença entre as capacidades de saturação da coluna para os dois componentes exceder 10%. Melhores resultados, nesse caso, são obtidos de modelos mais complexos, como, por exemplo, a isoterma de LeVan-Vermeulen. Finalmente, a isoterma multicomponente competitiva de Langmuir não satisfará a equação de Gibbs-Duhem, quando as capacidades de saturação da coluna forem diferentes para os compostos envolvidos (GUIOCHON et al., 1994).

Em decorrência dos resultados insatisfatórios obtidos por meio do modelo de isoterma competitiva de Langmuir, muitas equações empíricas têm sido sugeridas, baseadas em híbridos de modelos comuns. Uma equação que combina aspectos convencionais das isotermas, de Langmuir e de Freundlich, é dada por

$$q_i = \frac{a_{i,0} C_i^{p_i,0}}{C_i + \sum_{j=1}^n a_{i,j} C_i^{p_i,j}}, \quad (4)$$

em que q_i é a quantidade de soluto adsorvido; C_i é a quantidade de soluto no equilíbrio e $a_{i,0}$ e $a_{i,j}$ são os coeficientes da isoterma de equilíbrio para o elemento i .

Esta equação não descreve bem os dados de adsorção experimentais, em que são empregados adsorventes que promovem a eluição de bandas finais infinitas. Conseqüentemente, dificultam as separações e tornam as purificações praticamente impossíveis de serem concluídas, devido ao fato de o limite do tempo de retenção de cada banda ser infinito (GUIOCHON et al., 1994).

2.3.3.4. Adsorção em leito fixo

A adsorção em leito fixo caracteriza-se pela passagem de um fluido, que contém o soluto a ser adsorvido, por um tubo cilíndrico no qual o adsorvente se encontra empacotado. Inicialmente, a concentração do soluto na saída da coluna é muito baixa, dada a alta taxa de adsorção ocorrida. Com o tempo, as partículas do adsorvente tendem a ficar saturadas, ocorrendo, conseqüentemente, aumento da concentração do soluto no efluente (início da ruptura). Quando a capacidade máxima do adsorvente for atingida, a concentração de equilíbrio do soluto no afluente e no efluente será igual (CHASE, 1984).

Diversos modelos que descrevem o equilíbrio em colunas cromatográficas têm sido desenvolvidos e utilizados nos estudos do fenômeno de adsorção. NEVES (1995) citou que o modelo de equilíbrio, descrito por Devault, em 1934, previa mudanças, do tipo degrau, na concentração de alimentação da coluna. Adicionalmente, este modelo foi usado por Balzli et al. e por Aroa, em 1978 e 1990, respectivamente, que admitiram que o equilíbrio entre as fases sólida e líquida era atingido em todos os pontos do leito. Nessa formulação, o leito era dividido em zonas de composição constante que se expandiam para baixo no leito, à medida que o adsorvato era acumulado no adsorvente. Como era um método aproximado, era empregado, em geral, apenas para cálculos preliminares de colunas de adsorção, dando uma idéia do limite superior do desempenho de um sistema conhecido ou, no caso de projeto de um sistema novo, da quantidade mínima de adsorvente requerida.

O fenômeno de adsorção torna-se mais difícil de ser entendido e descrito quando envolve misturas, nas quais, em geral, ocorre competição entre os

componentes e, ou, deslocamento físico ou químico destes. CRITTENDEN et al. (1987) desenvolveram um modelo de equilíbrio para avaliar a separação de substâncias em sistemas multicomponentes. Os resultados mostraram desempenho satisfatório do modelo na predição da ordem de eluição dos componentes, o que indicou ser este uma boa ferramenta para os cálculos preliminares de colunas de adsorção.

Segundo NEVES (1995), Liapis e Rippin, em 1978, ao desenvolverem um modelo geral para adsorção de dois componentes em uma coluna de leito fixo, consideraram os efeitos de resistência à transferência de massa externa e internamente na partícula e ainda à difusão axial no fluido. O modelo não continha nenhuma simplificação quanto ao perfil de concentrações no interior da partícula de adsorvente e sua solução envolvia um sistema de equações parabólicas conjugadas, em que a concentração de cada componente era função do tempo, da posição axial no leito e da posição radial no interior da partícula.

ARVES e LIAPIS (1987) apresentaram um modelo matemático que descrevia a dinâmica do estágio de eluição da adsorção bioespecífica em leitos fixos. O modelo considerava a eluição específica e não-específica do adsorvato e também a resistência à transferência de massa, por difusão, no filme de líquido na superfície do adsorvente, assim como a taxa de reação entre o adsorvato e o adsorvente. A curva de equilíbrio, obtida entre o adsorvente e o adsorvato, era representada pelo modelo de Langmuir.

A adsorção e a eluição de tripsina, em leito fixo, foram estudadas por meio de um modelo que possuía um coeficiente de transferência de massa global para avaliar os efeitos de não-equilíbrio. A transferência de massa e a dessorção foram consideradas em uma única constante, enquanto o coeficiente de transferência, que pode ser dependente da taxa de escoamento do líquido no leito e, portanto, deve ser determinado para cada sistema de adsorção bioespecífica, separadamente (KATOH et al., 1978).

ARNOLD et al. (1985a) apresentaram um modelo para a eluição (dessorção) em colunas e em sistemas em batelada, em que a taxa de dessorção foi considerada um parâmetro agrupado em todos os sistemas, exceto naqueles

em que a taxa de dessorção foi muito menor que as taxas de difusão no fluido, no interior da partícula, e no filme de líquido, ao redor das partículas adsorventes.

SKUDDER (1985) estudou a influência dos parâmetros pH e da força iônica na adsorção, em leito fixo, de proteínas do soro. Nas condições ótimas determinadas, foi obtida uma solução protéica constituída de 91,7% de β -lg, 1,3% de α -la e 7% das demais proteínas do soro. A capacidade de adsorção da resina foi de 79 mg de proteínas totais fixas, por grama de resina.

2.3.3.5. Adsorção em leitos expandidos e fluidizados

Adsorção em leitos fluidizados tem sido empregada como uma tecnologia para redução das etapas iniciais dos processos de separação e purificação de compostos. Em um leito fluidizado, as partículas do adsorvente, no interior da coluna, são movimentadas por meio de um fluxo ascendente na coluna, formando, dessa maneira, uma suspensão de uma mistura de partículas. O estado fluidizado promove aumento da porosidade do leito, evitando que o material particulado contaminante provoque a colmatagem (obstrução do meio poroso) (HJORTH et al., 1998). Dessa forma, tem-se redução de uma operação unitária preliminar para separação dos contaminantes particulados, tais como a filtração ou a centrifugação.

Por meio da escolha adequada das partículas adsorventes é possível, simultaneamente, recuperar os compostos desejados e remover as células e seus fragmentos de um meio fermentado. Isto torna o uso de leitos fluidizados muito atrativo na separação de vários biocompostos. No entanto, até hoje, poucas aplicações, em nível industrial, foram apresentadas, na maioria das vezes devido à falta de adsorventes adequados. BARTLES et al. (1958) apresentaram um dos primeiros processos, em larga escala, que consistia na recuperação de estreptomicina de uma suspensão de células, sem filtração prévia, utilizando uma resina trocadora de cátions.

Apesar do sucesso do uso de leitos fluidizados na recuperação direta de compostos de baixa massa molar, até recentemente esta técnica não tinha sido

empregada na recuperação de proteínas produzidas por organismos recombinantes, dada a falta de adsorventes com afinidade operacional (faixa de pH de trabalho semelhante) com as proteínas, os quais poderiam ser utilizados eficientemente em leitos fluidizados. Os adsorventes cromatográficos tradicionais, projetados para o uso em leitos empacotados, são compatíveis com as proteínas, mas a grande parte destes não possui as propriedades físicas necessárias, tais como densidade e uniformidade de tamanho, para trabalhar eficientemente em leitos fluidizados. Um fator adicional que limita o uso de leitos fluidizados para recuperação de proteínas é o elevado grau de mistura das partículas de adsorvente, que reduz a eficiência do processo de adsorção (BUIJS e WESSELINGH, 1980).

A técnica de adsorção em leito fluidizado foi empregada, por CARRÈRE (1993), DRAEGER e CHASE (1990) e HORSTMANN e CHASE (1989), para concentração e purificação de proteínas presentes em soluções que continham impurezas particuladas. Nos estudos foram utilizadas resinas aniônicas, sendo, no primeiro trabalho, usada uma solução multicomponente (proteínas de soro de queijo), e, no segundo e no terceiro, proteínas puras, BSA e imunoglobulina G, respectivamente.

Em muitas aplicações, sistemas de leitos fluidizados são operados apenas em escala laboratorial e não há conhecimento de uso em escala piloto ou de produção, em razão, principalmente, da necessidade de equipamentos relativamente complexos (HJORTH et al., 1998).

Muitas estratégias visaram diminuir o grau de mistura das partículas de adsorvente. Uma delas, denominada de leito expandido, que é baseada na manutenção das partículas de adsorvente em uma posição fixa no leito, de forma semelhante a um leito empacotado mas com a vantagem de possuir uma porosidade mais elevada, despertou grande interesse. Em termos gerais, um leito expandido é um sistema cuja porosidade é maior que a do leito empacotado ou sedimentado. Leitos expandidos são, algumas vezes, considerados parte integrante do campo de trabalho da tecnologia de leitos fluidizados, razão por

que alguns autores não diferem essas duas expressões (CHASE e DRAEGER, 1992).

Grande número de diferentes tipos de adsorventes tem sido testado, quanto a sua estabilidade química, sedimentação e compatibilidade biológica, entre outros, para uso em adsorção com leitos expandidos. As partículas de adsorvente devem possuir densidade maior que as utilizadas em leitos fixos, para que sejam mantidas em suspensão durante todo o processo. A homogeneidade do tamanho das partículas, além de promover boa distribuição destas no leito, também reduz o risco de sedimentação. Adsorventes convencionais de agarose não possuem propriedades de sedimentação em um processo eficiente, em termos de produtividade, embora sejam apropriados para recuperação de proteínas. Material com sílica amorfa não pode ser utilizado, dada a sua limitada estabilidade sob severas condições de limpeza e sanitização, nos processos de purificação (UGER, 1979).

O desenvolvimento de adsorventes tem, no entanto, sido fator crucial no sucesso da implementação da adsorção em leito expandido em processos de purificação. A partir de uma combinação entre agarose e quartzo cristalino foi possível obter um adsorvente com propriedades de sedimentação e estabilidade química, e a biocompatibilidade adequou-se, eficientemente, ao processo de adsorção em leito expandido (FREJ et al., 1997).

Segundo CHASE (1994), a adsorção em leitos expandidos mostrou-se adequada para purificação de proteínas provenientes de uma solução que continha impurezas na forma particulada, resultante de processos de fermentação e produção de biocompostos a partir de organismos recombinantes. Com o aumento da porosidade do leito, uma etapa de filtração prévia tornou-se desnecessária para evitar a colmatagem.

2.4. Modelagem matemática aplicada ao processo de adsorção

O uso de modelos matemáticos para descrever fenômenos existentes em engenharia objetiva redução de custos e aumento da rapidez de obtenção dos

resultados. Os modelos matemáticos podem ser classificados em teóricos ou empíricos. Em geral, modelos empíricos possuem as mesmas características dos teóricos, embora estes últimos possam ser utilizados, de forma mais racional, principalmente no caso de extrapolações. Os modelos ainda podem ser classificados em dinâmicos ou estacionários e em parâmetros concentrados (agrupados) ou distribuídos.

O emprego de métodos matemáticos para simulação e análise de processos é uma técnica de potencial reconhecido, mas só recentemente despertou maior interesse, devido ao aparecimento de métodos matemáticos mais sofisticados e, principalmente, ao desenvolvimento de computadores que permitem a solução de problemas em tempo relativamente curto.

2.4.1. Modelagem em tanques agitados

ARAÚJO (1996) e CARRÈRE (1993) utilizaram um modelo, similar ao proposto por HORSTMANN e CHASE (1989), no estudo da adsorção de proteínas em resinas trocadoras de íons. Este modelo, que inclui a transferência de massa na partícula, a difusão nos poros e a taxa de reação na superfície da partícula, foi empregado neste trabalho.

2.4.1.1. Balanço de massa na partícula

No desenvolvimento do modelo utilizado considerou-se que as partículas eram esféricas e de diâmetro uniforme, que a difusão ocorria apenas no sentido radial da partícula e que o processo era isotérmico. Diante dessas considerações, aplicaram-se balanços diferenciais de massa na partícula e no tanque, dada a Equação 5:

$$\varepsilon_p \frac{\partial C_p}{\partial t} = D_{ef} \left(\frac{\partial^2 C_p}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_p}{\partial r} \right) - \rho_p (1 - \varepsilon_p) \frac{\partial q_i}{\partial t}, \quad (5)$$

em que ε_p é a porosidade da partícula; C_p , a concentração de proteína no interior da partícula (mg/mL); q_i , a concentração de proteína na fase sólida (mg/g); ρ_p , a densidade da partícula (g/mL); t , a variável temporal (s); e r , a variável espacial (m).

As condições inicial e de contorno (no centro e na superfície da partícula) são, respectivamente,

$$t = 0 \quad C_p = 0, \quad \forall r \quad (6)$$

$$t > 0 \quad \begin{cases} r=0 & \frac{\partial C_p}{\partial r} = 0 \\ r=R & \frac{\partial C_p}{\partial r} = \frac{k_f}{D_{ef}} (C_b - C_p) \end{cases} \quad (7)$$

em que C_p , é a concentração de proteína no interior da partícula (mg/mL); C_b , concentração de proteína na fase líquida (mg/mL); k_f , coeficiente de transferência de massa (m/s); D_{ef} , coeficiente de difusão intrapartícula (m²/s); R (m), raio da partícula; t , variável temporal (s); e r , variável espacial (m).

A cinética de adsorção sobre a superfície dos poros pode ser escrita como (CARRÈRE, 1993):

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_1 C_p (q_m - q_i) - k_2 q_i, \quad (8)$$

em que k_1 e k_2 representam as constantes cinéticas de adsorção e dessorção. No equilíbrio, a derivada na Equação 8 é zero, levando ao modelo da isoterma de LANGMUIR (1916).

$$q_i = \frac{q_m C_p}{k_d + C_p}, \quad (9)$$

em que a constante k_d é dada por

$$k_d = \frac{k_2}{k_1}. \quad (10)$$

Segundo HORSTMANN e CHASE (1989), o balanço de massa para adsorção e dessorção, em um tanque que fornece a taxa de variação da concentração global de proteína (C_b), é dado por

$$\frac{dC_b}{dt} = -\frac{3vk_f}{RV}(C_b - C_p), \quad (11)$$

em que v (mL) é o volume de adsorvente; V (mL), volume de líquido da fase externa; R (m), raio da partícula; e k_f , coeficiente de transferência de massa (m/s). A condição inicial é dada por

$$t = 0 \quad C_b = C_0 \quad \text{em} \quad r = R. \quad (12)$$

Os modelos adimensionais para a fase líquida e para a partícula são, respectivamente,

$$\frac{dC_b^*}{d\tau} = -\frac{3v}{V}B(C_b^* - C_p^*) \quad (13)$$

$$\tau = 0 \quad C_b^* = 1 \quad (14)$$

$$\frac{\partial C_p^*}{\partial \tau} \left[1 + \frac{q_m k_d F \rho_p}{(k_d + C_0 C_p^*)^2} \right] = \left[\frac{\partial^2 C_p^*}{\partial r^{*2}} + \frac{2}{r^*} \frac{\partial C_p^*}{\partial r^*} \right] \quad (15)$$

$$\tau = 0 \quad C_p^* = 0 \quad \forall r^* \quad (16)$$

$$\tau > 0 \quad \begin{cases} r^* = 0 & \frac{\partial C_P^*}{\partial r^*} = 0 \\ r^* = 1 & \frac{\partial C_P^*}{\partial r^*} = B(C_b^* - C_P^*) \end{cases} \quad (17)$$

em que $C_b^* = \frac{C_b}{C_0}$; $C_P^* = \frac{C_P}{C_0}$; $r^* = \frac{r}{R}$; $\tau = \frac{tD_{ef}}{R^2}$; $B = \frac{k_f R}{\varepsilon_p D_f}$; $F = \frac{1 - \varepsilon_p}{\varepsilon_p}$.

2.4.2. Modelagem da coluna cromatográfica

Dada a complexidade de alguns modelos usados para retratar determinados fenômenos físicos, algumas considerações com vistas em reduzir esta complexidade e focalizar os efeitos físicos e fenomenológicos mais importantes, serão feitas abaixo. Naturalmente, as suposições de um caso não são justificáveis em outros, razão por que devem ser tratadas com prudência. No caso de modelagem em coluna cromatográfica, admite-se, geralmente, que todos os componentes tenham coeficiente de atividade unitário, sendo não-idealidades negligenciadas (SPIEKER et al., 1998).

- a- Leito empacotado.** A coluna é modelada como um sistema unidimensional, espacialmente distribuído, consistindo de um leito homogêneo de partículas esféricas porosas, em que a porosidade do leito é constante em toda a coluna. Todos os parâmetros do modelo e as condições de contorno são considerados constantes em uma interseção da coluna. As concentrações no seio do líquido são funções do tempo e da coordenada z (comprimento da coluna). A dispersão axial descreve desvios provenientes de escoamentos puramente convectivos (HEJTMÁNEK e SCHNEIDER, 1993), de maior influência que os efeitos difusivos no líquido, os quais, por esta razão, são desprezados;
- b- Fase líquida.** A compressibilidade do fluido é negligenciada; uma vez que o solvente está em excesso, o volume molar e a densidade da mistura podem ser considerados como constantes pela coluna. A operação é considerada isotérmica;

- c- Partículas de adsorvente.** As partículas são consideradas de tamanho uniforme e pequeno, quando comparadas com o diâmetro e com o comprimento da coluna, existindo, assim, simetria esférica das partículas, cujos poros são de tamanho uniforme. Quando as partículas são modeladas como sistemas distribuídos, considera-se que o transporte de massa dentro delas ocorra somente por meio da difusão no líquido, e não por meio da convecção ou da difusão na superfície;
- d- Processo de adsorção.** O solvente não é adsorvido, razão por que o balanço de massa do solvente não é considerado. As cinéticas de adsorção são muito rápidas e podem ser representadas por uma isoterma de equilíbrio.

2.4.2.1. Estrutura dos modelos

O modelo mais complexo, freqüentemente usado, considera um volume de fase líquida, uma fase líquida no interior do poro e uma massa adsorvida. A transferência de massa no filme, entre o seio da fase líquida e a superfície da partícula, e a difusão dentro das partículas também fazem parte do modelo, que pode ser denominado modelo 1+1d de transferência de massa. Nesse caso, 1+1d significa distribuição axial, em uma dimensão da coluna, e distribuição radial, em cada partícula.

Se as moléculas forem pequenas, a difusão dentro da partícula será rápida, podendo ser considerada como um sistema concentrado, o que leva ao modelo de transferência de massa 1d. No entanto, se a transferência de massa entre o seio do fluido e fluido do poro for rápida, o filme poderá ser eliminado, e as duas concentrações tornar-se-ão iguais.

a. Balanço de massa no líquido extrapartícula

Considerando rápida difusão no interior da partícula, rápida transferência de massa no fluido no exterior e no interior da partícula, e, ainda, cada partícula

como um sistema concentrado, tem-se o modelo de transferência de massa 1d, que é dado pela Equação 18:

$$\varepsilon_b A dz \frac{\partial C_{b,i}}{\partial t} = \varepsilon_b A (j_{c,i}|_z - j_{c,i}|_{z+dz}) + \varepsilon_b A (j_{e,i}|_z - j_{e,i}|_{z+dz}) - \omega A dz j_{f,i}, \quad (18)$$

em que o termo da esquerda é de acúmulo de massa; o primeiro termo do lado direito, convectivo; o segundo, dispersivo; e o terceiro, de transferência de massa no filme.

Na Equação 18, ε_b é a porosidade do leito, A , a área transversal na coluna (m^2), e ω , a área superficial da partícula por unidade de volume (m^{-1}). Como as partículas são consideradas esferas de raio R (m), ω é dado por

$$\omega = \frac{3(1 - \varepsilon_b)}{R}. \quad (19)$$

Dividindo a Equação 18 por (Adz) e expandindo $j_{c,i}|_{z+dz}$ e $j_{e,i}|_{z+dz}$ por séries de Taylor, tem-se o limite de $dz \rightarrow 0$, qual seja,

$$\varepsilon_b \frac{\partial C_{b,i}}{\partial t} = -\varepsilon_b \frac{\partial j_{c,i}}{\partial z} - \varepsilon_b \frac{\partial j_{e,i}}{\partial z} - \omega j_{f,i}. \quad (20)$$

Os termos de fluxo da Equação 20 podem ser descritos como:

Termo convectivo: a fase fluida entra na coluna com uma velocidade efetiva no interior da partícula v_m (m/s), dada por $v_m = Q/(A\varepsilon_b)$, em que A (m^2) é a área da seção transversal da coluna. O fluxo convectivo do componente i é, então, descrito por

$$j_{c,i} = v_m C_{b,i}. \quad (21)$$

Termo dispersivo: Os vários efeitos complexos originam-se no escoamento do fluido pelo leito empacotado, de modo que o “back-mixing” (a influência da mistura retroativa) e os volumes mortos são incorporados na dispersão (BIRD et al., 1960). Em contraste com os efeitos difusivos, os dispersivos agem, igualmente, em todas as espécies. O coeficiente de dispersão aparente D_{ap} é, portanto, o mesmo para todos os componentes, o qual, analogamente à lei de Fick para difusão, é obtido de

$$j_{c,i} = -D_{ap} \frac{\partial C_{b,i}}{\partial z}. \quad (22)$$

Transferência de massa no filme: Os modelos mais utilizados consideram que o fluxo difusivo no filme estagnado é quase estacionário, o que significa que o acúmulo de massa na película é negligenciado. O fluxo de massa no filme, para cada componente, é determinado pelo coeficiente de transferência de massa $k_{f,i}$, e a diferença de concentração entre o seio da fase líquida e a fase líquida nos poros na superfície da partícula é

$$j_{f,i}(z, t) = k_{f,i} (C_{b,i} - C_{P,i}). \quad (23)$$

b. Balanço de massa na partícula

O balanço de massa na partícula, na posição axial z , é

$$\frac{4}{3} \pi R^3 \left(\varepsilon_P \frac{\partial C_{P,i}}{\partial t} + (1 - \varepsilon_P) \frac{\partial C_{A,i}}{\partial t} \right) = 4\pi R^2 j_{f,i}. \quad (24)$$

em que R é o raio da partícula, C_P concentração na partícula, t variável temporal e, ε_p porosidade da partícula.

Como ω é definido na Equação 19, a Equação 24 pode ser escrita como

$$\left(\varepsilon_p \frac{\partial C_{P,i}}{\partial t} + (1 - \varepsilon_p) \frac{\partial C_{A,i}}{\partial t} \right) = \frac{3}{R} j_{f,i}, \quad (25)$$

em que

$$\frac{\partial C_{A,i}}{\partial t} = \rho_p \frac{\partial q}{\partial t}, \quad (26)$$

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{q_m k_d}{(k_d + C_p)^2} \frac{\partial C_{P,i}}{\partial t}. \quad (27)$$

Substituindo as Equações 26 e 27 na Equação 25, tem-se

$$\varepsilon_p \frac{\partial C_{P,i}}{\partial t} = \frac{3k_{f,i}}{R} (C_{b,i} - C_{P,i}) - (1 - \varepsilon_p) \rho_p \frac{q_m k_d}{(k_d + C_{p,i})^2} \frac{\partial C_{P,i}}{\partial t}. \quad (28)$$

O modelo de transferência de massa 1d na coluna é, portanto, dado pelas Equações 28 e 29:

$$\frac{\partial C_{b,i}}{\partial t} = -v_m \frac{\partial C_{b,i}}{\partial z} + D_{ap} \frac{\partial^2 C_{b,i}}{\partial z^2} - \frac{k_{f,i}}{\varepsilon_b} (C_{b,i} - C_{P,i}) \frac{3(1 - \varepsilon_b)}{R}. \quad (29)$$

Na modelagem do fenômeno físico de adsorção, em colunas, aplicam-se as condições de contorno, de Danckwerts (1953), e a condição inicial:

1. Condição inicial: concentração uniforme e constante igual a zero:

$$t = 0, \quad \forall z \Rightarrow C_{b,i} = 0. \quad (30)$$

2. Condições de contorno:

$$a) \ t > 0 \quad \begin{cases} z=0 \Rightarrow & v_m C_0 = v_m C_{b,i} - D_{ap} \left. \frac{\partial C_{b,i}}{\partial z} \right|_{z \rightarrow 0^+} \\ z=L \Rightarrow & \left. \frac{\partial C_{b,i}}{\partial z} \right|_{z \rightarrow L^+} = 0 \end{cases} \quad (31)$$

O modelo com equações adimensionais, no qual Pe é o número de Peclet, e Nu , o de Nussel, para a fase líquida e para a partícula, respectivamente, é:

$$\frac{\partial C_b^*}{\partial \tau} = -Pe \frac{\partial C_b^*}{\partial z^*} + \frac{\partial^2 C_b^*}{\partial z^{*2}} - 3NuF_b (C_b^* - C_P^*) \quad (32)$$

$$\frac{\partial C_P^*}{\partial \tau} = \frac{3Nu}{\varepsilon_p} (C_b^* - C_P^*) - F_p \rho_P \left[\frac{q_m k_d}{(k_d + C_P^* C_0)^2} \right] \frac{\partial C_P^*}{\partial \tau} \quad (33)$$

em que $C_b^* = \frac{C_b}{C_0}$; $C_P^* = \frac{C_P}{C_0}$; $F_b = \frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b}$; $F_p = \frac{1 - \varepsilon_p}{\varepsilon_p}$,

$$z^* = \frac{z}{L}; \quad \tau = \frac{D_{ap} t}{L^2}; \quad Pe = \frac{Lv_m}{D_{ap}}; \quad Nu = \frac{k_f L^2}{RD_{ap}},$$

e as condições de contorno e inicial, para a fase líquida externa, são

$$a) \ \tau > 0 \quad \begin{cases} z^*=0 \Rightarrow & \frac{\partial C_b^*}{\partial z^*} = Pe(C_b^* - 1) \\ z^*=1 \Rightarrow & \frac{\partial C_b^*}{\partial z^*} = 0 \end{cases} \quad (34)$$

$$b) \ \tau = 0 \quad \forall z^* \Rightarrow C_b^* = 0 \quad (35)$$

A condição inicial para a partícula é

$$\tau = 0 \quad C_p^* = 0. \quad (36)$$

Em alguns casos, correlações empíricas são utilizadas na estimação de parâmetros que calculem a dispersão, a difusão e a resistência à transferência de massa. Essas correlações são, geralmente, expressas pelos números adimensionais. O coeficiente de dispersão axial pode ser determinado por experimentos ou por correlações empíricas, como as apresentadas por Chung e Wen, em 1968, citados por SPIEKER (1998). A equação é amplamente aplicada a leito fixo e fluidizado. O número de Peclet (Pe) é calculado por

$$Pe = \frac{vL}{D_{ap}} = \frac{L}{2R\epsilon_b} (0,2 + 0,011Re^{0,48}), \quad (37)$$

em que o número de Reynolds (Re) é igual a

$$Re = \frac{2R\epsilon_b v \rho}{\eta}. \quad (38)$$

em que v é a velocidade do fluido (m/s), R o raio da coluna (m), L o comprimento da coluna (m), ϵ_b a porosidade do leito, ρ a densidade do fluido (g/cm^3) e, η a viscosidade do fluido ($\text{Pa}\cdot\text{s}$).

A resistência à transferência de massa, decorrente da consideração de um filme hipotético em torno da partícula, é apresentada por um coeficiente ($k_{f,i}$), para cada componente. Frequentemente, as correlações fornecem uma expressão para $k_{f,i}$ (m/s) ou para o número de Sherwood, Sh , como na equação a seguir (TRUEI et al., 1992).

$$Sh = \frac{k_{f,i} 2R}{D_{ef}} = 2 + 1,45 Re^{1/2} Sc^{1/3}, \quad (39)$$

em que o número de Schmidt (Sc) é dado por

$$Sc = \frac{\eta}{\rho D_{ef}}, \quad (40)$$

em que D_{ef} é o coeficiente de difusividade (m^2/s).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Adsorvente

Nos experimentos foi utilizado um adsorvente aniônico, cujo grupo de troca iônica é o amino quaternário.

A resina Accel Plus QMA (Waters®) é preparada por um processo de polimerização, no qual a base rígida (sílica) é encapsulada com um ligante hidrofílico e um ligante reticulado altamente estável. Esta resina fornece excelente recuperação e alta resolução de materiais de origem biológica e é adequada ao isolamento e à purificação de proteínas, entre outros biocompostos, devido a sua estrutura rígida e incompressível (ARAÚJO, 1996). De acordo com o fabricante, as características deste adsorvente são:

1. Faixa de tamanho das partículas: 37 μm a 55 μm ;
2. Tamanho dos poros: 500 Å ;
3. Massa específica das partículas secas a 22 °C: 2,32 g/cm^3 ; e
4. Massa específica das partículas após embebição no tampão: 1,16 g/cm^3 .

3.2. Adsorvato

As proteínas usadas como adsorvato foram a α -lactoalbumina (α -la) e a β -lactoglobulina (β -lg), presentes em uma solução de isolado protéico de soro de queijo em pó, fornecido pela Davisco[®].

Para os experimentos de seleção de pH e força iônica, foi preparada uma solução com fração em peso 5%, a partir do isolado protéico de soro de queijo.

3.3. Experimentos para seleção do pH e força iônica na adsorção

A capacidade de um adsorvente depende da massa molar da proteína, das condições de adsorção (pH, força iônica (μ) e temperatura) e da natureza da amostra. O pH é responsável pelo controle do grau de interação iônica entre a proteína e o adsorvente, favorecendo, assim, sua adsorção e, ou, sua dissociação. A força iônica é o fator que pode controlar o equilíbrio da distribuição da proteína entre as fases móvel e estacionária, promovendo a adsorção e a eluição.

Na determinação das condições ótimas de adsorção, para as variáveis pH e força iônica, foi utilizada a técnica de superfície de resposta, que se baseia no ajuste de um modelo por meio de uma regressão múltipla, em cuja representação geométrica figuram duas ou mais variáveis independentes (GOMES, 1990 e BOX e DRAPER, 1987). Inicialmente, foi realizado um ensaio fatorial 2x2, com um ponto central, e, a partir dos resultados obtidos, foram inseridas novas combinações de pH e força iônica. No Quadro 3.1 encontram-se os valores de pH e força iônica utilizados nos experimentos.

Quadro 3.1 – Valores analisados das variáveis pH e força iônica

pH	μ (M)				
	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
7,0			*		*
7,2		X		X	
7,4	*		⊗		*
7,6		X		X	
7,8	*		*		

- **Preparo das soluções-tampão**

Nos ensaios descritos no item 3.3 foram utilizadas soluções-tampão de Tris-HCl. Exemplificando, para preparar uma solução de Tris-HCl com μ igual a 0,02 M, foram pesados 0,2423 g de Tris (Tris-hidroximetil-aminometano; Merck®- Massa Molar = 121,14 g), em balança analítica. Essa quantia foi solubilizada em, aproximadamente, 80 mL de água destilada, com auxílio de agitadores magnéticos. Em seguida, o pH foi ajustado, com HCl 6,0 N, aos valores desejados, com posterior complementação do volume, com água deionizada, até 100 mL.

Nas soluções-tampão de Tris-HCl, com μ diferentes, foi empregado o mesmo procedimento, porém com quantidades de Tris apropriadas. Foi preparada ainda uma solução-tampão de Tris-HCl, com μ igual a 0,1 M e pH 7,5, para o condicionamento da resina usada.

- **Experimentos de adsorção**

Nos experimentos de adsorção, o adsorvente foi preparado a partir da pesagem de 50 mg da resina (Accel Plus QMA[®]) em um filtro-seringa, seguida da adição de, aproximadamente, 1 mL de solução-tampão de Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 e agitação por 30 minutos, etapa de condicionamento da resina. Na Figura 3.1

encontra-se o esquema do equipamento usado para manter os filtros-seringa sob agitação. Após essa etapa, o tampão foi retirado, pressionando-se o êmbolo da seringa. Esse procedimento foi repetido duas vezes consecutivas. A seguir, colocaram-se 500 μ L do tampão, com pH e força iônica desejados, em cada filtro-seringa, os quais ficaram sob agitação por um período de dez a doze horas. Após esse período, 500 μ L da solução de soro de queijo foram adicionados ao sistema, que permaneceu, sob agitação, por mais três horas. Decorrido o intervalo de tempo estabelecido, os êmbolos dos filtros-seringa foram pressionados, enquanto os filtrados foram recolhidos para posterior análise.

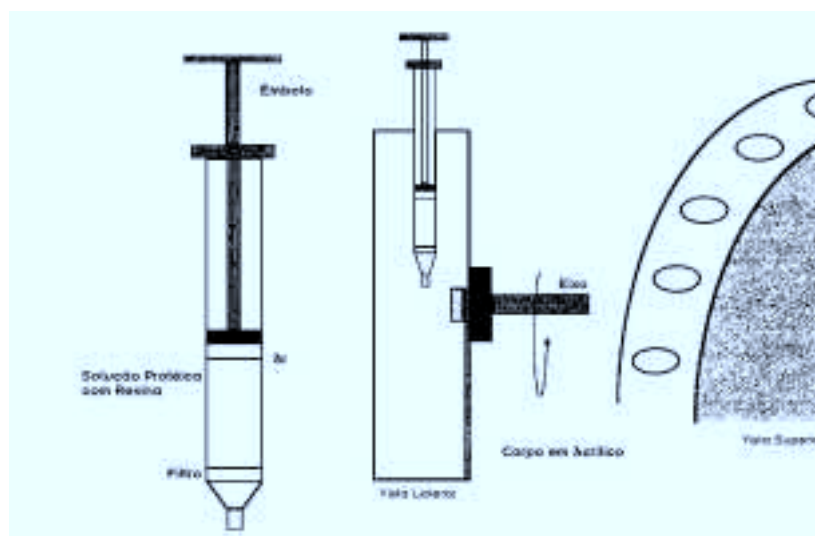


Figura 3.1 - Esquema do equipamento usado para manter os filtros-seringa sob agitação (PEREIRA, 1999).

3.4. Análise de proteínas

Nas análises por CLAE, para quantificação simultânea das proteínas α -la e β -lg, foi usada uma coluna de fase reversa (CLC-ODSM/C-18, 25 cm) em um cromatógrafo Shimadzu[®], equipado com um sistema de auto-injeção (SIL-10ADVP), duas bombas analíticas dosadoras (LC-10ADVP), forno para aquecimento (CTO-10AVP) e controlador (SCL-10AVP). Antes das análises, filtraram-se as amostras em filtro de membrana de acetato de celulose, de 0,2 μ m (DURAPOR).

A metodologia utilizada na análise das proteínas consistiu na injeção de 20 μ L da solução protéica, com uma vazão de fase móvel de 1,0 mL/min, que foi formada por um gradiente contendo uma solução A (solução de cloreto de sódio 0,15 M e pH 2,5) e uma solução B (acetonitrila 100%). O gradiente foi programado da seguinte forma:

- 100% A, 0% B \rightarrow 64% A, 36% B, em 3 minutos;
- 64% A, 36% B \rightarrow 45% A, 55% B, em 18 minutos;
- 45% A, 55% B \rightarrow 45% A, 55% B, em 2 minutos; e
- 45% A, 55% B \rightarrow 100% A, 0% B, em 10 minutos.

Durante as análises, a absorbância foi medida, a 210 nm, por um detector de feixes de diodo, mantida a coluna a 40 °C.

Para quantificar as proteínas nas amostras, construiu-se uma curva de calibração utilizando as proteínas α -la e β -lg puras (Sigma[®]), para a faixa de 0,005 mg a 3 mg de proteína por mL de solução. A relação entre as áreas dos picos e a concentração de proteínas foi expressa por uma equação de primeiro grau ajustada, aos dados experimentais.

3.5. Cinéticas de adsorção

Os testes para determinação da cinética de adsorção foram conduzidos em tanques agitados, utilizando-se os valores de pH e força iônica previamente selecionados. Foram colocados 40 mL de solução do isolado protéico (fração em peso 1%), previamente analisada por CLAE, em um béquer de 100 mL, e deixada sob agitação por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados ao sistema 30 mL de solução tampão contendo 3 g de adsorvente, previamente condicionados. Em seguida, foram coletadas alíquotas de 0,5 mL, em intervalos de tempos preestabelecidos. As alíquotas foram analisadas por CLAE, de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Os experimentos foram realizados em duplicatas, de forma que fosse possível a construção de curvas cinéticas de adsorção para as proteínas α -la e β -lg, separadamente.

3.6. Isotermas de adsorção

Para determinação da isoterma de adsorção das proteínas α -la e β -lg no soro de queijo foi empregado o método de análise frontal. Esta metodologia parte da análise de diferentes valores de q (quantidade de soluto adsorvido) e das concentrações do soluto no equilíbrio correspondente (C).

Os dados necessários ao cálculo de q foram determinados por meio de ensaios, realizados a temperatura de 25 °C, nos quais se utilizaram cinco soluções protéicas de diferentes concentrações iniciais, preparadas a partir do isolado protéico e solução tampão Tris/HCl 0,05M e pH 7,6. No Quadro 3.2 são apresentados os valores das concentrações iniciais de α -la e β -lg.

Quadro 3.2 – Concentrações iniciais das soluções protéicas para determinação das isotermas de adsorção por análise frontal

	C_0 (mg/mL)				
α -la	1,01	1,99	2,68	3,10	3,53
β -lg	2,07	3,66	6,62	7,25	7,94

As amostras utilizadas na determinação dos pontos necessários à construção das curvas de ruptura das duas proteínas, separadamente, foram obtidas da coleta de frações do eluente, em intervalos de tempo preestabelecidos, seguida da análise por CLAE. A Figura 3.2 representa a montagem experimental utilizada nos experimentos. A coluna utilizada foi a HR 5/5 (Pharmacia[®]), empacotada com, aproximadamente, 0,35 g de resina Accel Plus, embebida em solução tampão Tris/HCl 0,05 M, pH 7,6, por aproximadamente 8 h, a qual foi adicionada à coluna por meio de uma seringa, resultando em um leito de 3 cm de altura e 5 mm de diâmetro.

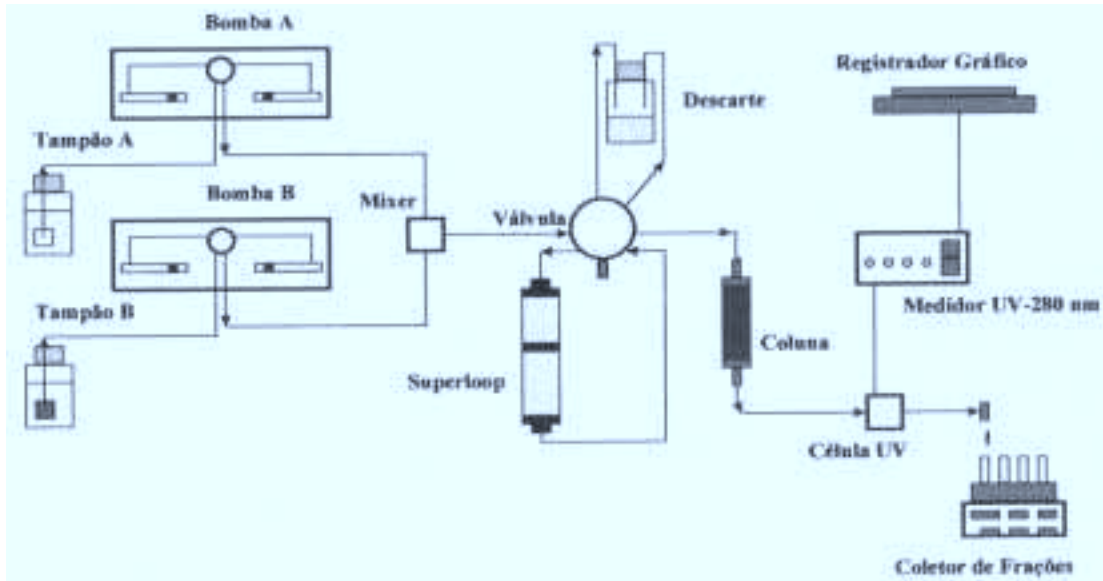


Figura 3.2 - Esquema básico do FPLC utilizado (PEREIRA, 1999).

Um modelo empírico (sigmoidal) foi ajustado às curvas de ruptura; por meio de integração numérica, utilizando um programa computacional em linguagem Fortran, calculou-se a área sob a curva de ruptura (Figura 3.3). Posteriormente, calculou-se o valor de q , por meio da seguinte equação:

$$q = \frac{C_0 * Q * t_f - \left[\int_0^{t_f} y dt \right] + y_1 + y_2}{m_{ads}}, \quad (41)$$

em que

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{t}{t_0} \right)^b}, \quad y_1 = C_0 * A_T * L * \varepsilon_b, \quad y_2 = C_0 * A_T * L * (1 - \varepsilon_b) * \varepsilon_p, \quad (42)$$

sendo a , b e t_0 parâmetros da equação calculados por meio do ajuste e da análise de regressão; C_0 (mg/mL), concentração inicial da solução; A_T (m²), área da seção transversal da coluna; L (m), comprimento da coluna; ε_b e ε_p , porosidade do leito e da partícula, respectivamente.

Os termos y_1 e y_2 representam as quantidades de soluto não-adsorvido mas presentes na coluna nos espaços externo e interno à partícula, respectivamente, no instante em que o processo foi interrompido.

A partir dos valores calculados pôde-se construir a curva de equilíbrio entre a massa de proteína adsorvida, q (mg de proteína por g de resina), e a quantidade de proteína no equilíbrio, C (mg/mL). O modelo de LANGMUIR (1916) foi ajustado aos dados de q , em função de C , por meio de um programa de regressão não-linear; dessa forma, os parâmetros k_d e q_m , do modelo, foram determinados.

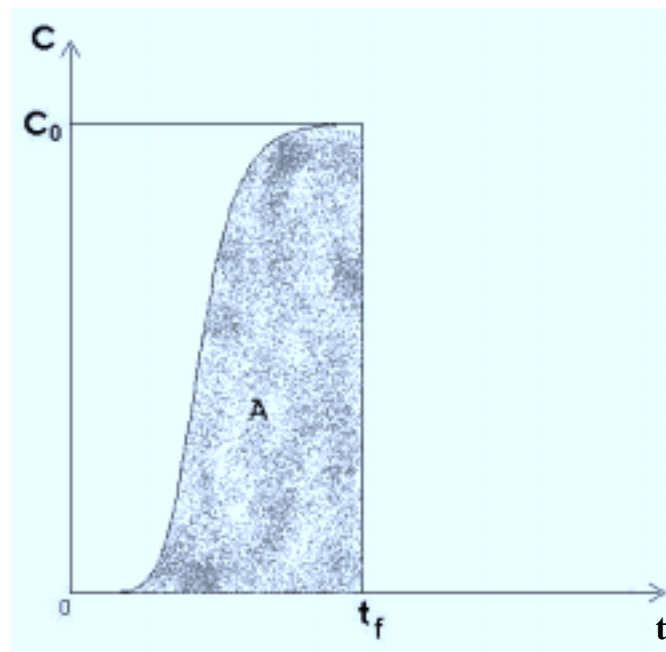


Figura 3.3 – Curva de ruptura utilizada na determinação do equilíbrio, por análise frontal. C é a concentração, e t , tempo.

3.7. Caracterização do leito

O estudo da caracterização do leito baseou-se na metodologia do escoamento de um traçador e na análise da distribuição de idade de saída (E) ou distribuição de tempo de residência (DTR) do fluido. O termo idade, nesse caso, é usado para representar o intervalo de tempo que um elemento da corrente de fluido permaneceu dentro da coluna.

A avaliação da DTR, quando se faz a caracterização do grau de não-idealidade do escoamento por meio da função de distribuição de idade de saída, é feita por meio de diversos métodos experimentais, denominados de técnicas de estímulo e resposta. Essas metodologias consistem na perturbação do sistema, por meio da aplicação de um traçador no fluido que entra na coluna cromatográfica, e na análise de sua resposta, na saída da coluna. Qualquer material que possa ser detectado e que não perturbe o escoamento no sistema pode ser usado como traçador.

A função DTR pode ser caracterizada, em termos de parâmetros, como tempo médio de distribuição e dispersão do tempo médio, dentre outros, por técnicas de ponderação de resíduos.

Dentre as diversas metodologias existentes, FURUSAWA et al. (1976) e PEREIRA (1999) empregaram a técnica dos momentos, que é o método mais antigo utilizado na estimação de parâmetros, cujas principais vantagens são (GRAYBILL, 1961):

1. Geralmente, levam a procedimentos que são fáceis de computar e são, portanto, valiosos na estimação preliminar de parâmetros;
2. Se o tamanho amostral for grande, as estimativas estarão próximas do valor a ser estimado, isto é, levarão a predições consistentes.

O movimento do adsorvato através da coluna é descrito por uma equação diferencial obtida da consideração da conservação de massa no leito, do equilíbrio entre o adsorvente e o adsorvato e dos efeitos de não-equilíbrio da dispersão axial, difusão na direção axial e transferência de massa dentro da partícula. A solução da equação é obtida do domínio da transformada de Laplace, para um pulso na entrada da coluna. É possível obter da solução da transformada expressões para os momentos estatísticos de um pico de saída. O primeiro momento é determinado pelo tempo de retenção do pico, e o segundo, momento central, pela difusão do pico, causada por perturbações no equilíbrio. Quando o pico de saída é Gaussiano, o segundo momento é igual à variância. Em geral, no entanto, o pico é não-Gaussiano, e o segundo momento deve ser determinado por

integração numérica ou por análise de Fourier dos dados experimentais (ARNOLD et al., 1985).

Portanto, para a DTR, os momentos são definidos por

$$M_{0,k} = \int_0^{\infty} t^k E(t) dt, \quad (43)$$

em que k é a ordem do momento; para $k=1$, tem-se o tempo de retenção médio, t_R ; e para $k=2$, tem-se a variância para o momento centrado em relação ao tempo de retenção médio, σ^2 . Dessa forma, o primeiro momento é representado por

$$M_{0,1} = t_R = \frac{\int_0^{\infty} tC(t) dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt}, \quad (44)$$

e o segundo, por

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} t^2 C(t) dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} - t_R^2, \quad (45)$$

em que σ^2 é a variância, que é particularmente útil quando se pretende ajustar as curvas experimentais a uma família de curvas teóricas.

As Equações 44 e 45 podem ser representadas, na forma discretizada, por

$$t_R = \frac{\sum_{i=1}^n t_i C_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n C_i \Delta t_i}, \quad (46)$$

$$\sigma^2 \cong \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 C_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n C_i \Delta t_i} - t_R^2. \quad (47)$$

Na caracterização da porosidade do leito de partículas foi utilizado o método de duas medidas. A aplicação desse método se fundamenta na determinação dos momentos de primeira ordem e de segunda ordem para curvas $C(t)$, obtidas da coluna sem leito de adsorvente e com leito, respectivamente.

Foram usados como traçadores a acetona (1%) e o azul de dextrana (1%). Tendo em vista que o azul de dextrana é uma molécula grande (massa molar ≈ 2000 KDa), esta não penetra em nenhum dos poros da resina, enquanto a acetona (molécula pequena) penetra em todos os poros da resina. A solução tampão foi selecionada nos ensaios descritos anteriormente. Os testes foram realizados em cromatógrafo AKTA Purifier (Pharmacia[®]), em uma coluna HR 5/5. Foram feitos experimentos com a coluna vazia e, posteriormente, com a coluna empacotada com a resina Accel Plus QMA[®].

Foram coletados dados de absorbância, no comprimento de onda de 265 nm e 595 nm, para acetona e azul de dextrana, respectivamente. As vazões utilizadas variaram de 0,25 mL/min a 2 mL/min, perfazendo um total de seis ensaios (em duplicata).

A partir da Equação 46, considerando-se Δt_i constante e C_i proporcional à absorbância (Abs), o primeiro momento para o sistema sem resina ($M_{0_1}^v$) foi calculado pela expressão

$$M_{0_1}^v = \frac{\sum_{i=1}^n t_i Abs}{\sum_{i=1}^n Abs}, \quad (48)$$

em que t_i é o tempo no qual se mediu a Abs do traçador na saída da coluna. O primeiro momento, para o sistema com leito empacotado ($M_{0_1}^s$), foi obtido da Equação 48. Nesse caso, a Equação 48 modificada é apresentada por

$$M_{0_1}^s = \frac{\sum_{i=1}^n t_i Abs}{\sum_{i=1}^n Abs}. \quad (49)$$

O balanço de massa do traçador na fase móvel para o modelo de escoamento com dispersão, considerando a partícula do adsorvente esférica e a não-interação específica entre o soluto e o adsorvente, resulta em (ARNOLD et al., 1985):

$$\varepsilon_b \frac{\partial C_b}{\partial t} = \varepsilon_b D_{ap} \frac{\partial^2 C_b}{\partial z^2} - v_m \frac{\partial C_b}{\partial z} - \frac{3k_f}{R} (1 - \varepsilon_b) (C_b - C_p) \Big|_{r=R}, \quad (50)$$

em que C_b é a concentração de traçador na fase líquida externa à partícula (mg/mL); C_p concentração do traçador no interior da partícula (mg/mL); k_f coeficiente de transferência de massa (m/s).

De acordo com FURUSAWA et al. (1976), o balanço de massa na partícula é expresso por

$$\rho_p \frac{\partial C_p}{\partial t} = D_{ef} \left(\frac{\partial^2 C_p}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_p}{\partial r} \right) - \rho_s \frac{\partial \Gamma_p}{\partial t}, \quad (51)$$

em que o termo $\rho_s \frac{\partial \Gamma_p}{\partial t}$ está relacionado com a taxa de adsorção, que está restrita à condição de cinética de adsorção reversível de primeira ordem, de acordo com

$$\rho_s \frac{\partial \Gamma_p}{\partial t} = \rho_p k_a \left(C_p - \frac{\Gamma_p}{K_a} \right), \quad (52)$$

em que k_a é a constante que representa a taxa de adsorção (mL/g.min); K_a , constante de equilíbrio na adsorção (mL/g); ρ_s , densidade aparente da partícula de adsorvente (g/mL); e Γ_p , concentração do soluto na resina (mg/g).

As condições iniciais e de contorno, nas equações anteriores, são:

$$t = 0 \quad \begin{cases} z \geq 0 & C_b = 0 \\ r \geq 0 & C_p = 0 \end{cases} \quad (53)$$

$$t > 0 \quad \begin{cases} r = 0 & \frac{\partial C_p}{\partial r} = 0 \\ r = R & k_f (C_b - C_p)_{|r=R} = D_{ef} \left(\frac{\partial C_p}{\partial r} \right) \\ z = 0 & \begin{cases} 0 < t < t_0 & C_b = C_0 \\ t > t_0 & C_b = 0 \end{cases} \end{cases} \quad (54)$$

Na resolução das equações acima aplica-se a transformada de Laplace (ARNOLD et al., 1985; FURUSAWA et al., 1976). As derivadas de primeira e segunda ordem da solução, de acordo o teorema de Van Der Laan, representam os momentos de primeira e segunda ordem,

$$M_{0_k} = (-1)^k \left(\frac{\partial^k G(s)}{\partial s^k} \right)_{s=0} . \quad (55)$$

De acordo com FURUSAWA et al. (1976) e ARNOLD et al. (1985), a solução, para os momentos, é representada pelas seguintes expressões:

$$M_{0_1} = \frac{h}{v} \left\{ 1 + \frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \varepsilon_p \left[1 + \frac{\rho_p}{\varepsilon_p} K_a \right] \right\} + \frac{t_0}{2} , \quad (56)$$

$$\sigma^2 = \frac{2h}{v} \left\{ \frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \varepsilon_p \left[\frac{\rho_p}{\varepsilon_p} \frac{K_a^2}{k_a} + \frac{R^2 \varepsilon_p}{15} \left(1 + \frac{\rho_p}{\varepsilon_p} K_a \right)^2 \left(\frac{1}{D_{ef}} + \frac{5}{k_f R} \right) \right] + \frac{D_{ap}}{\varepsilon_b} \left[1 + \frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \varepsilon_p \left(1 + \frac{\rho_p}{\varepsilon_p} K_a \right) \right]^2 \frac{1}{v^2} \right\} + \frac{t_0^2}{12} , \quad (57)$$

em que t_0 é o tempo de injeção do traçador (s).

A aplicação de um traçador que não seja adsorvido, ou seja, $K_a = 0$, conduz à simplificação das equações 56 e 57, resultando em

$$M_{0_i} = \frac{h}{v} [\varepsilon_b + (1 - \varepsilon_b)\varepsilon_p] + \frac{t_0}{2}, \quad (58)$$

$$\sigma^2 = \frac{2h}{v} \left\{ \frac{D_{ap}}{v^2} [\varepsilon_b + (1 - \varepsilon_b)\varepsilon_p]^2 \right\} + \frac{t_0^2}{12}. \quad (59)$$

Segundo ARNOLD et al. (1985) e FURUSAWA et al. (1976), citados por PEREIRA (1999), o primeiro momento para o leito, $M_{0_i}^L$, considerando o modelo de escoamento com dispersão e usando o método das duas medidas, pode ser obtido pela expressão:

$$M_{0_i}^L = M_{0_i}^s - M_{0_i}^v - \frac{t_0}{2} = \frac{h}{v} [\varepsilon_b + (1 - \varepsilon_b)\varepsilon_p], \quad (60)$$

em que h é a altura do leito (m); v , velocidade superficial (m/s); ε_b , porosidade do leito; ε_p , porosidade da partícula; e t_0 , tempo de injeção do traçador (s).

A porosidade do leito, ε_b , foi calculada pela inclinação da reta da Equação 60, que é representada pelo gráfico $M_{0_i}^L$ versus $\frac{h}{v}$. É possível determinar a porosidade do leito a partir dos dados coletados com o traçador azul de dextrana, uma vez que, nesse caso, ε_p é igual a zero, como mostra a Equação 61. A porosidade da partícula é obtida dos dados do traçador acetona, por meio da substituição do valor de ε_b na expressão $[\varepsilon_b + (1 - \varepsilon_b)\varepsilon_p]$, que corresponde à inclinação da reta do gráfico $M_{0_i}^L$ versus $\frac{h}{v}$.

$$M_{0_i}^L = M_{0_i}^s - M_{0_i}^v - \frac{t_0}{2} = \frac{h}{v} \varepsilon_b. \quad (61)$$

3.8. Determinação da difusividade na partícula

O modelo de adsorção em tanques agitados, em conjunto com as respectivas condições iniciais e condições de contorno (Equações 13 a 17), foi reduzido a um sistema de equações algébricas, utilizando-se o método de diferenças finitas centradas no espaço e um passo à frente no tempo. Esse sistema de equações foi resolvido pelo método de Gauss-Sidel. Os valores ótimos de k_f e D_{ef} , para as curvas cinéticas, foram obtidos por regressão não-linear, usando o método de NCM (“Nonlinearly Constrained Minimization”), da rotina DNCONF (disponível na biblioteca do programa computacional Fortran Power Station, versão 4.0). Os dois procedimentos citados foram implementados num programa em linguagem FORTRAN, e os dados usados para regressão do modelo foram obtidos conforme descrito no item 3.5.

3.9. Determinação dos parâmetros de transferência de massa e dispersão axial na coluna

Os testes de adsorção foram conduzidos em colunas de leito fixo, em um sistema de cromatografia ÄKTA Purifier (Pharmacia®). Os parâmetros de transferência de massa (k_f) e dispersão axial (D_{ap}), para adsorção das proteínas do soro de queijo α -la e β -lg, foram obtidos pelo método de análise frontal.

Os dados necessários à construção das curvas de ruptura foram determinados por meio da coleta de frações da solução protéica na saída da coluna, em intervalos de tempo preestabelecidos. Essas amostras foram analisadas por CLAE, para que fossem construídas as curvas de ruptura para as duas proteínas, separadamente.

Foram realizados duplos ensaios, variando-se a concentração do soro em cinco níveis e a vazão da fase móvel em três níveis, na análise dos efeitos dessas variáveis sobre os coeficientes estudados.

Os dados experimentais foram utilizados na regressão não-linear, pelo método NCM, implementado na rotina DNCONF, tendo como modelo do processo de adsorção as Equações 32 a 36.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão discutidos os resultados experimentais e as expressões matemáticas apresentadas no decorrer do texto, caso ainda não tenham sido introduzidas nos capítulos anteriores.

4.1. Curvas de calibração das proteínas α -la e β -lg

Para determinar a concentração de α -la e β -lg em amostras de isolado protéico (antes e depois do processo de adsorção), foram obtidos pontos experimentais da área dos picos em função da concentração de proteínas, de acordo com o item 3.4. A partir da análise de regressão linear desses dados, baseada na dispersão dos resíduos e no valor do coeficiente de determinação, foram determinadas as curvas apresentadas nas Figuras 4.1 e 4.2.

A metodologia utilizada na quantificação das proteínas foi eficiente na separação dos picos (inclusive na separação das variantes A e B da β -lg), como pode ser observado nas Figuras 4.3 a 4.5. Essa técnica apresentou um tempo de análise relativamente curto (33 min), quando comparada com a metodologia empregada por MANJI et al. (1985), cujo tempo de análise foi de, aproximadamente, 60 min. Esses autores usaram uma coluna de troca iônica (Mono Q – Pharma-

cia), com pressão em torno de 3,5 MPa a 4 MPa, vazão de 2 mL/min e absorvância medida a 280 nm.

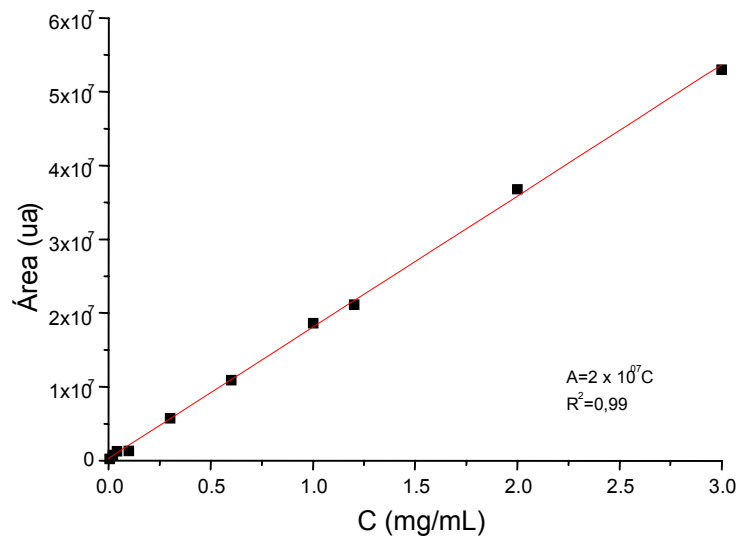


Figura 4.1 - Curva de calibração da α -lactoalbumina.

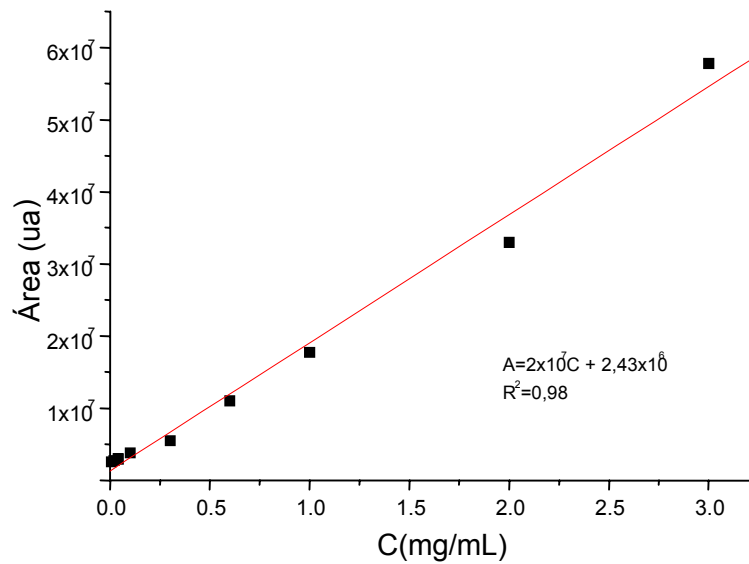


Figura 4.2 - Curva de calibração da β -lactoglobulina.

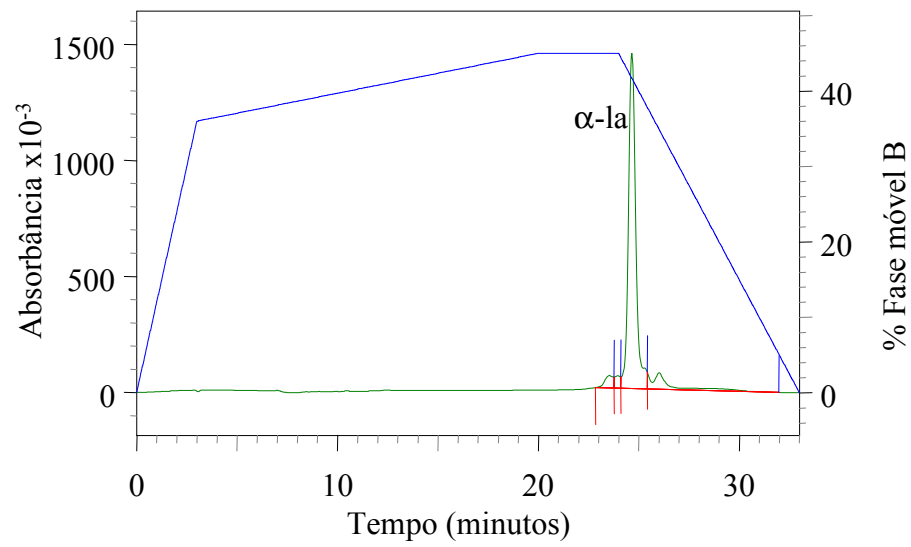


Figura 4.3 - Cromatograma típico do padrão de α -la.

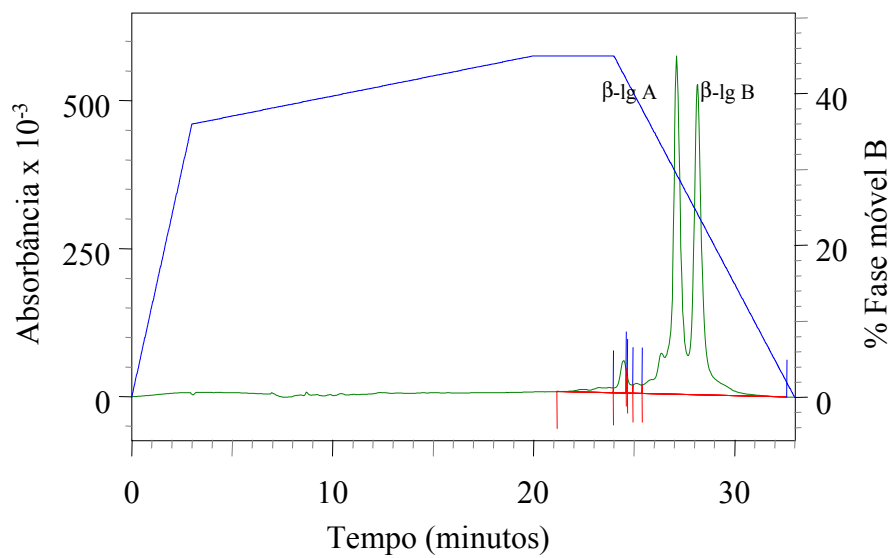


Figura 4.4 - Cromatograma típico do padrão de β -lg.

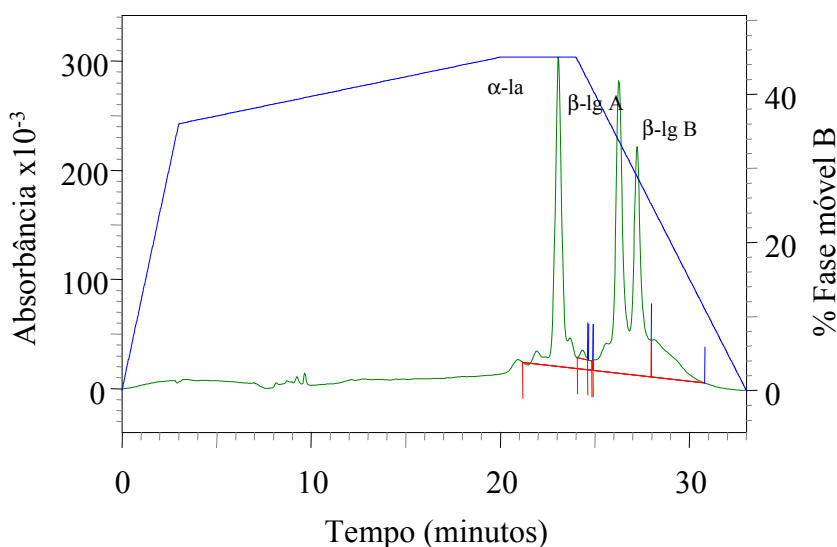


Figura 4.5 - Cromatograma de uma solução de isolado protéico de soro de queijo.

4.2. Seleção do pH e força iônica para adsorção

A avaliação do efeito do pH e da força iônica (μ) na capacidade de adsorção das proteínas do soro de queijo, pela resina Accel Plus QMA[®], visou determinar uma condição ótima para o processo.

Para modelagem do processo de adsorção foi realizada uma análise de regressão múltipla, a partir dos resultados experimentais obtidos no item 3.3. Nesta análise foi utilizado o pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., 1989), procedimentos RSREG e REG. Foram feitos os testes de falta de ajuste e significância dos parâmetros e análise de resíduos e do coeficiente de determinação para escolha do melhor modelo.

Nos Quadros 4.1 e 4.2 são apresentados a análise de variância da regressão com o teste de falta de ajuste para os modelos determinados e os valores do coeficiente de variação.

Quadro 4.1 - Análise de variância da regressão para o modelo da α -lactoalbumina

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}
Regressão	4	474,48	23,06**
Resíduo da regressão	11	20,57	
Falta de ajuste	3	38,33	2,75 ^{ns}
Resíduo puro	8	13,91	
Total	15		
CV = 2,75%			

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

ns – Não-significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Quadro 4.2 - Análise de variância da regressão para o modelo da β -lactoglobulina

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}
Regressão	4	521,63	15,01**
Resíduo da regressão	11	34,75	
Falta de ajuste	3	27,65	0,74 ^{ns}
Resíduo puro	8	37,41	
Total	15		
CV = 0,87%			

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

ns – Não-significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Inicialmente, de acordo com os resultados obtidos em testes preliminares, onde previu-se uma região de curvatura, foi testado o modelo quadrático completo, em que se observou que o coeficiente do produto cruzado, entre pH e força iônica, foi não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste t. O modelo foi reavaliado, retirando-se o parâmetro citado, e obteve-se um modelo simplificado, no qual todos os parâmetros foram significativos a 5% de probabilidade, pelo teste t. Os modelos determinados para α -la e β -lg são apresentados nas Equações 62 e 63, respectivamente.

$$C_d = -2343,52 + 653,47P + 974,14\mu - 42,82P^2 - 10350\mu^2, \quad R^2 = 89,35 \quad (62)$$

$$C_d = -2658,14 + 872,08P + 1442,13\mu - 57,46P^2 - 14670\mu^2, \quad R^2 = 84,51 \quad (63)$$

em que C_d é a capacidade de adsorção da resina (mg de proteína por g de resina); μ , força iônica da solução tampão (M); e P , pH da solução tampão.

De acordo com os resultados experimentais, determinou-se que as melhores condições de trabalho, dentro da faixa estudada, para adsorção das proteínas α -la e β -lg, pela resina Accel Plus QMA[®], foram pH e μ iguais a 7,6 e 0,05M, respectivamente. Essas condições proporcionaram maior interação das proteínas e adsorvente, elevando sua capacidade de adsorção. PEREIRA (1999), ao estudar a adsorção de β -galactosidase, e CRUZ (1997), ao estudar insulina na resina Accel Plus QMA[®], selecionaram valores ótimos de pH em torno de 7,5 e 8,0, para μ iguais a 0,03 e 0,05M, enquanto CRUZ (1997) avaliou apenas o efeito da variação do pH, para dada μ .

As Figuras 4.6 e 4.7 mostram a capacidade de adsorção da resina de troca iônica Accel Plus QMA[®], para os valores de pH e μ utilizados nas proteínas α -la e β -lg, respectivamente. Observa-se que esse processo é sensível às variações de μ , sendo mais acentuado para α -la do que para β -lg. Em ambos os casos, obteve-se redução da capacidade de adsorção da resina com aumento de μ . Segundo LEAVER et al. (1996), quanto maior a força iônica do tampão, menor será a quantidade de substância adsorvida, em virtude da competição existente entre as proteínas e os íons presentes na solução tampão pelo sítio de adsorção da resina.

ARAÚJO (1996), ao estudar a adsorção de BSA pela resina Accel Plus QMA[®], fixou o pH em 7,0 e μ iguais a 0,02 M, 0,03 M e 0,05 M. A adsorção da proteína pela resina foi maior em solução tampão com menor valor de μ , 0,02 M. Os resultados desta pesquisa e os da literatura demonstram que a resina Accel Plus possui ampla faixa de trabalho, em relação a μ e pH.

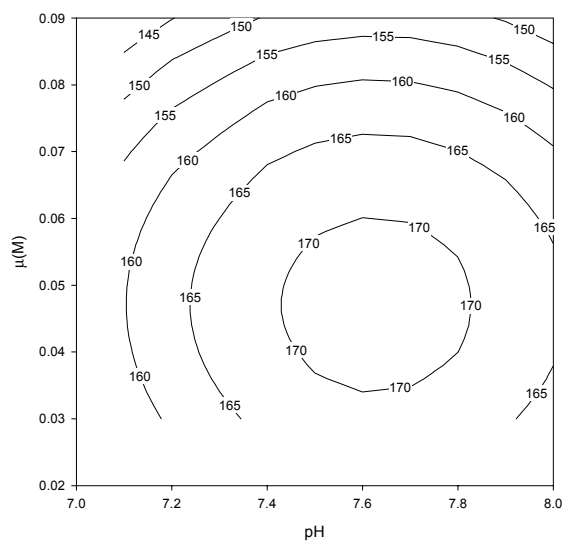


Figura 4.6 - Diagrama de curva de nível da capacidade de adsorção (mg/g) da proteína α -la, pela resina Accel Plus QMA[®], em função do pH e μ .

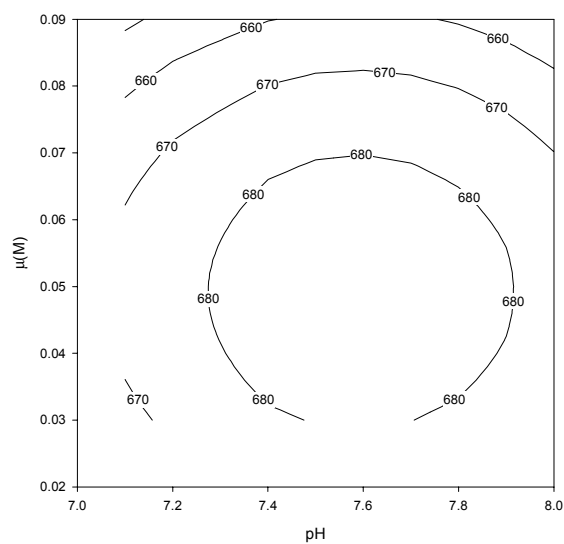


Figura 4.7 - Diagrama de curva de nível da capacidade de adsorção (mg/g) da proteína β -Ig, pela resina Accel Plus QMA[®], em função do pH e μ .

4.3. Determinação da difusividade na partícula

Estudou-se o comportamento cinético da adsorção nas concentrações iniciais de α -la e β -lg iguais a 3,05 mg/mL e 9,47 mg/mL, respectivamente. O tempo de duração de cada experimento foi de 50 min. A Figura 4.8 mostra as curvas cinéticas de adsorção obtidas para as proteínas α -la e β -lg. Nesta Figura, observa-se que, após 5 minutos do início do processo de adsorção, as concentrações das proteínas em solução praticamente não variaram, o que demonstra elevada taxa de adsorção do adsorvato pelo adsorvente. Esse mesmo comportamento foi observado em curvas de cinética de adsorção de β -galactosidase (PEREIRA, 1999), insulina (CRUZ, 1997) e BSA (ARAÚJO, 1996), quando se utilizou a resina Accel Plus QMA[®]. No primeiro caso, o adsorvato foi proveniente de fermentação, nos demais, de proteínas puras dissolvidas em solução tampão.

A solução numérica do modelo matemático, Equações 13 e 15, usando as condições iniciais e contorno, Equações 14, 16 e 17, foi obtida da discretização das equações diferenciais pelo método de diferenças finitas centradas no espaço e um passo à frente no tempo. O sistema de equações algébricas não-lineares obtido é dado pelas Equações 64 a 67.

Para o tanque,

$$C_b^{*k+1} \left(1 + \frac{3vB\Delta\tau}{V} \right) = C_b^{*k} + \left(\frac{3vB\Delta\tau}{V} \right) C_{P(j)}^{*k+1}. \quad (64)$$

Para a partícula,

- para $j = 1$,

$$C_{P(j)}^{*k+1} \left[1 + \frac{q_m k_d F \rho_P}{(k_d + C_{P(j)}^{*k} C_0)^2} + \frac{6\Delta\tau}{\Delta r^2} \right] = \left\{ \frac{6\Delta\tau}{\Delta r^2} C_{P(j+1)}^{*k+1} + C_{P(j)}^{*k} \left[1 + \frac{q_m k_d F \rho_P}{(k_d + C_{P(j)}^{*k} C_0)^2} \right] \right\} \quad (65)$$

- para $n < j < 1$,

$$C_{P(j)}^{*k+1} \left[1 + \frac{q_m k_d f \rho_p}{(k_d + C_{P(j)}^{*k} C_0)^2} + \frac{2\Delta\tau}{\Delta r^2} \right] = C_{P(j+1)}^{*k+1} \left[\frac{\Delta\tau}{\Delta r^2} + \frac{\Delta\tau}{r\Delta r} \right] + C_{P(j-1)}^{*k+1} \left[\frac{\Delta\tau}{\Delta r^2} - \frac{\Delta\tau}{r\Delta r} \right] + C_{P(j)}^{*k} \left[1 + \frac{q_m k_d F \rho_p}{(k_d + C_{P(j)}^{*k} C_0)^2} \right] \quad (66)$$

- para $j = n$,

$$C_{P(n)}^{*k+1} \left[1 + \frac{q_m k_d F \rho_p}{(k_d + C_{P(n)}^{*k} C_0)^2} + \frac{2B\Delta\tau}{\Delta r} + \frac{2\Delta\tau}{\Delta r^2} + 2B\Delta\tau \right] = C_{P(n-1)}^{*k+1} \left(\frac{2\Delta\tau}{\Delta r^2} \right) + C_B^{*k+1} \left[\frac{2B\Delta\tau}{\Delta r} + 2B\Delta\tau \right] + C_{P(n)}^{*k} \left[1 + \frac{q_m k_d F \rho_p}{(k_d + C_{P(n)}^{*k} C_0)^2} \right] \quad (67)$$

No Quadro 4.3 são apresentados os parâmetros de transferência de massa k_f e D_{ef} . A ordem de grandeza do valor estimado para D_{ef} é maior que aquele obtido por ARAÚJO (1996), para BSA ($D_{ef} = 3,72 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{seg}$), talvez devido à diferença de massa molar (BSA = 66 KDa) entre as proteínas e também à estrutura elipsóide do BSA, que pode dificultar a penetração e a difusão do composto nos poros da partícula.

Quadro 4.3 - Valores calculados para os coeficientes de transferência de massa no filme (k_f) e difusão nos poros do adsorvente (D_{ef}), referentes aos ensaios de adsorção em tanques agitados

	C_0 (mg/mL)	k_f (m/s)	D_{ef} (m^2/s)
α -lactoalbumina	3,05	$2,48 \times 10^{-6}$	$1,67 \times 10^{-10}$
β -lactoglobulina	9,47	$7,90 \times 10^{-6}$	$3,37 \times 10^{-10}$

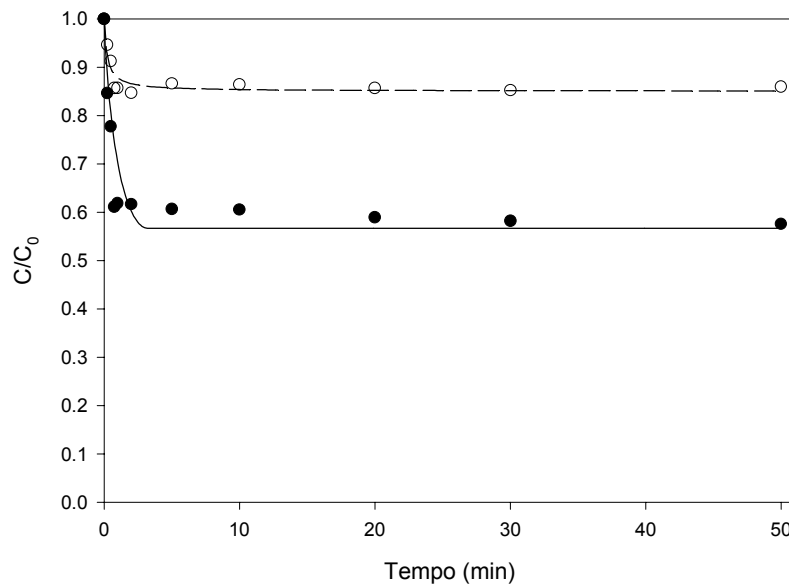


Figura 4.8 - Adsorção de α -la e β -lg na resina Accel Plus QMA[®]: comparação entre os valores experimentais e calculados pelo modelo ($\bullet \rightarrow \beta$ -lg e $\circ \rightarrow \alpha$ -la).

4.4. Isotermas de adsorção de proteínas obtidas por análise frontal

O objetivo da construção de isotermas de adsorção é a determinação dos parâmetros q_m (capacidade máxima de adsorção) e k_d (constante de dissociação), que caracterizam os sistemas estudados em termos da capacidade máxima e velocidade com a qual o equilíbrio é atingido, respectivamente (CRUZ, 1997). Segundo DRAEGER e CHASE (1990), a isoterma de Langmuir ajusta-se bem aos dados experimentais de adsorção de proteínas em resinas de troca iônica. Na Figura 4.9 encontram-se as isotermas de adsorção de α -la e β -lg, obtidas por análise frontal.

O comportamento dos dados das isotermas para α -la e β -lg, mostrado na Figura 4.9, é semelhante. No entanto, observa-se que a capacidade de adsorção da proteína α -la é menor do que a da β -lg. Pode-se supor que esse fato tenha sido, possivelmente, decorrente da diferença de carga líquida na superfície e, conseqüentemente, da solubilidade entre as proteínas. Apesar de ambas serem globulares e possuírem pontos isoelétricos próximos, a α -la é mais hidrofóbica do que β -lg, em conseqüência da presença de triptofano (principal aminoácido apolar –

aproximadamente 6%). Nesse caso, então, o resultado encontrado para o processo de adsorção da α -la pode ser decorrente da sua composição, uma vez que a maior quantidade de aminoácidos apolares na superfície reduz o número de cargas, que são necessárias para que haja interação adsorvato-adsorvente nesse processo.

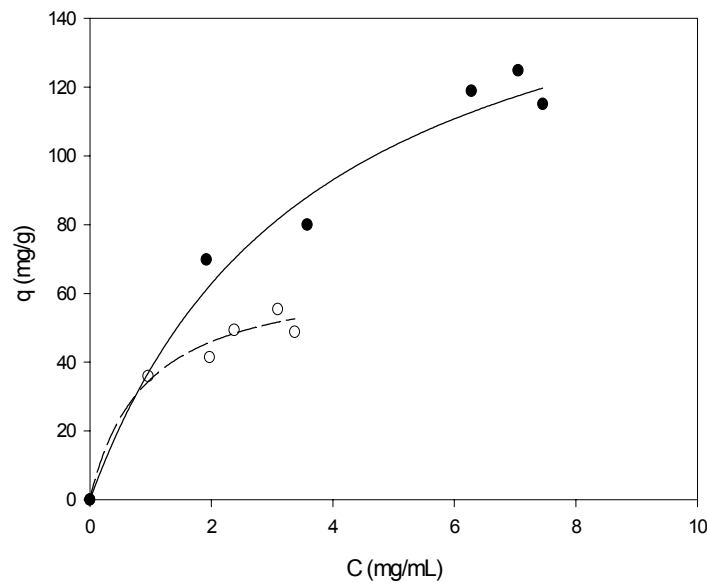


Figura 4.9- Isoterma de adsorção de proteína (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) – tampão Tris/HCl 0,05M pH 7,6 – análise frontal (● \rightarrow β -lg e ○ \rightarrow α -la). T = 25 °C.

O modelo de Langmuir foi ajustado aos dados experimentais mostrados na Figura 4.9, e os valores dos parâmetros ajustados estão no Quadro 4.4. Observa-se que o valor de q_m , para a β -lg, é maior que o obtido para α -la e que os valores das constantes de dissociação k_d , das proteínas, são maiores que 1, o que indica que o valor da constante de dissociação para o sistema é maior que o de associação. Esse fenômeno pode ser decorrente dos efeitos cinéticos existentes nos experimentos realizados em coluna e do elevado gradiente de concentração, que é mantido durante o processo de adsorção, devido ao fato de a entrada da solução de alimentação ser contínua.

Quadro 4.4 - Parâmetros do Modelo de Langmuir

Proteína		
	α -lactoalbumina	β -lactoglobulina
q_m	71,48 mg/g	179,23 mg/g
k_d	1,08 mg/mL	3,71 mg/mL
	$R^2 = 0,9411$	$R^2 = 0,9186$

Quando se realizam experimentos em colunas, a utilização de soluções mais concentradas dificulta a realização dos trabalhos, principalmente na coleta de amostras para determinação dos pontos localizados entre o ponto de ruptura e o de equilíbrio da curva. Neste, quanto maior a concentração de alimentação, menor será o intervalo de tempo entre estes dois marcos e mais difícil será a obtenção de amostras significativas para serem analisadas, razão pela qual é mais conveniente trabalhar com soluções mais diluídas.

A cromatografia frontal foi de grande utilidade na determinação de isotermas de adsorção, uma vez que é um método rápido e representa, de modo mais realístico, os fenômenos que ocorrem em unidades onde o processo é dinâmico, ou seja, consideram-se os efeitos cinéticos que podem aparecer durante a adsorção. O fenômeno do deslocamento de uma molécula por outra, quando se trabalha com misturas, pode também ser considerado na obtenção dos parâmetros, que são fundamentais para a determinação dos coeficientes de dispersão axial e do coeficiente de transferência de massa global em uma coluna cromatográfica.

4.5. Determinação da porosidade da partícula e do leito de resina

As Figuras 4.10 e 4.11 representam os cromatogramas para os traçadores azul de dextrana e acetona, respectivamente, injetados a uma vazão de 0,25 mL/min. Os tempos de retenção do azul de dextrana na coluna vazia e empacota-

da foram de 56,7 s e 184,6 s, respectivamente. Para a acetona, os tempos obtidos foram 52,2 s e 168,1 s. Nas outras vazões, o comportamento foi similar.

A Figura 4.12 apresenta os resultados dos dois traçadores para os primeiros momentos relativos à coluna empacotada e as equações das retas ajustadas. Para o traçador azul de dextrana, a equação ajustada foi

$$M_{0_1} = 0,5336 \frac{h}{v_s}, \quad (68)$$

sendo a inclinação $\varepsilon_b = 0,5336$ a porosidade do leito. Valores de ε_b mais elevados são desejáveis, desde que não haja formação de canais preferenciais, pois, em um leito com maior porosidade, reduz-se a possibilidade de ocorrer a colmatagem, além de diminuição da perda de carga.

Para o traçador acetona, a equação ajustada aos dados experimentais foi

$$M_{0_1} = 0,8257 \frac{h}{v_s}. \quad (69)$$

Da igualdade entre as Equações 60 e 69 obtém-se ε_p igual a 0,6263, que é comparável aos valores citados na literatura, como, por exemplo, em PEREIRA (1999) e QUADRI et al. (1998), em que ε_p foi igual a 0,535 e 0,60, respectivamente.

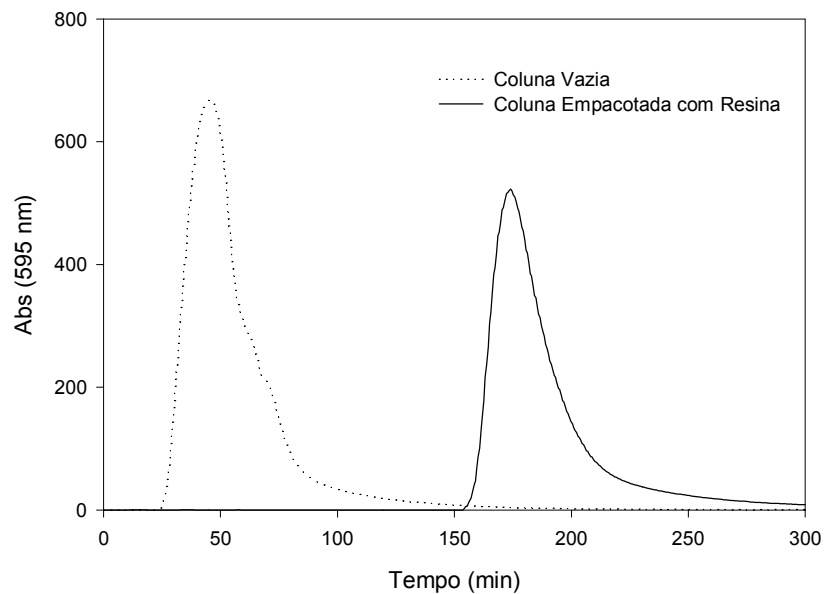


Figura 4.10 - Valor de Absorbância (595 nm) coletado em função do tempo (segundos), com coluna vazia e empacotada ($h = 3,0$ cm), usando como traçador Azul de dextrana e $Q = 0,25$ mL/min.

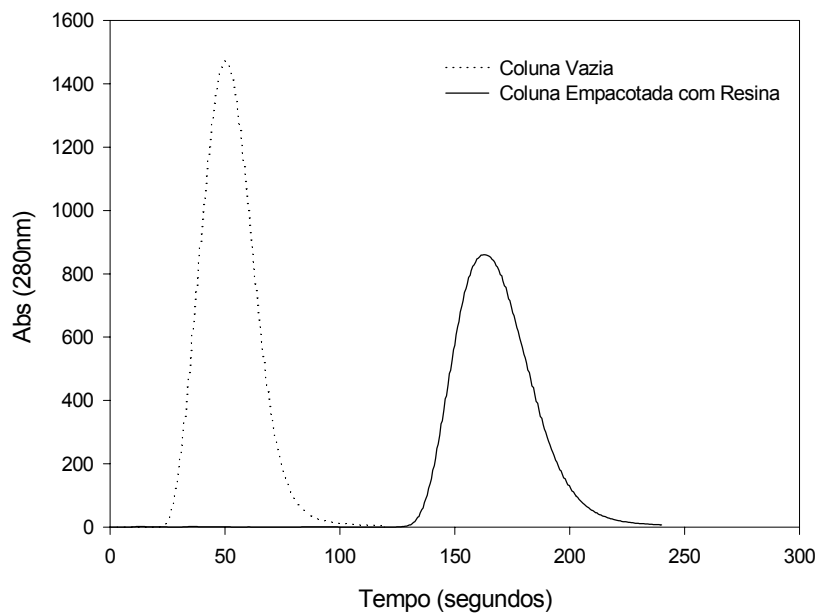


Figura 4.11 – Valor de Absorbância (280 nm) coletado em função do tempo (segundos), com coluna vazia e empacotada ($h = 3,0$ cm), usando como traçador acetona e $Q = 0,25$ mL/min.

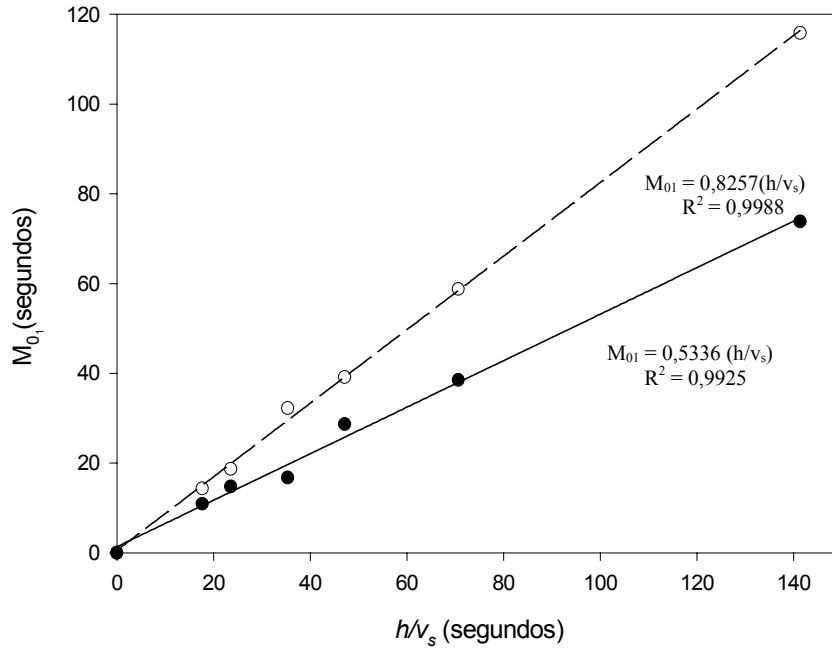


Figura 4.12 - Dados experimentais e calculados para o primeiro momento do leito (● = Azul de dextrana; ○ = Acetona).

4.6. Determinação dos parâmetros de transferência de massa e dispersão axial na coluna

A solução numérica do modelo matemático (Equações 32 e 33), juntamente com as condições iniciais e de contorno, foi obtida pela discretização das equações diferenciais, mediante método de volumes finitos. O sistema de equações algébricas não-lineares é dado pelas Equações 70 a 73:

Para a coluna:

- para $j = 1$,

$$C_{b(j)}^{*k+1} = C_{b(1)}^{*k} \left[1 - \frac{\Delta\tau}{(\Delta z^*)^2} - \frac{Pe\Delta\tau}{2\Delta z^*} - 3NuF_b\Delta\tau \right] + C_{b(j+1)}^* \left[\frac{\Delta\tau}{(\Delta z^*)^2} - \frac{Pe\Delta\tau}{2\Delta z^*} \right] + C_{P(1)}^* 3NuF_b\Delta\tau \quad (70)$$

- para $n > j > 1$,

$$C_{b(j)}^{*k+1} = C_{b(j)}^{*k} \left(1 - \frac{2\Delta\tau}{(\Delta z^*)^2} - 3NuF_b\Delta\tau \right) + C_{b(j+1)}^{*k} \left(\frac{\Delta\tau}{(\Delta z^*)^2} - \frac{Pe\Delta\tau}{2\Delta z^*} \right) + C_{b(j-1)}^{*k} \left(\frac{\Delta\tau}{(\Delta z^*)^2} + \frac{Pe\Delta\tau}{2\Delta z^*} \right) + 3NuF_b\Delta\tau C_P^{*k} \quad (71)$$

- para $j = n$,

$$C_{b(n)}^{*k+1} = C_{b(n)}^{*k} \left[1 - \frac{\Delta\tau}{(\Delta z^*)^2} - \frac{Pe\Delta\tau}{\Delta z^*} - 3NuF_b\Delta\tau \right] + C_{b(n-1)}^{*k} \left[\frac{\Delta\tau}{\Delta z^*} + \frac{Pe\Delta\tau}{\Delta z^*} \right] + 3NuF_b\Delta\tau C_{p(n)}^{*k} \quad (72)$$

Para a fase sólida,

$$C_P^{*k+1} \left[\frac{1}{\Delta\tau} + \frac{F_p \rho_p}{\Delta\tau} \left(\frac{q_m k_d}{(k_d + C_P^{*k} C_0)^2} \right) \right] = C_P^{*k} \left[\frac{1}{\Delta\tau} + \frac{F_p \rho_p}{\Delta\tau} \left(\frac{q_m k_d}{(k_d + C_P^{*k} C_0)^2} \right) - 3Nu\Delta\tau \right] + 3Nu\Delta\tau C_{b(j)}^{*k} \quad (73)$$

As curvas de ruptura para α -la, cujos resultados são experimentais e calculados pelo modelo para três vazões e quatro concentrações, são encontradas nas Figuras 4.13 e 4.14. As Figuras 4.15 e 4.16 apresentam dados similares para a proteína β -lg. Observa-se, nas Figuras 4.13 a 4.16, que os dados simulados representam bem a primeira parte da curva, em que a concentração de saída é pequena em relação à de entrada, principalmente para vazões e concentrações mais baixas. Entretanto, esse comportamento não ocorreu na segunda parte da curva.

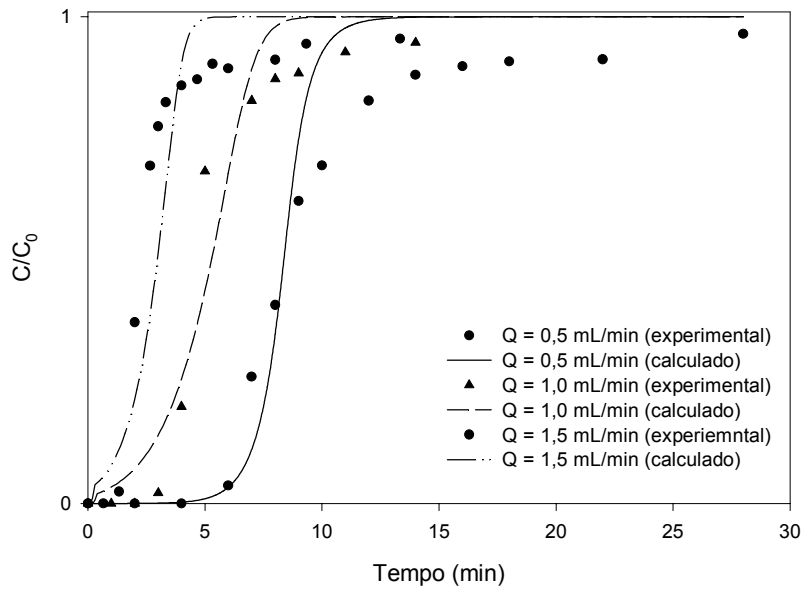


Figura 4.13 - Curvas de ruptura da α -la para três vazões de alimentação; comparação dos resultados experimentais com os calculados por meio do modelo com dispersão axial. $C_0 = 2,68$ mg/mL.

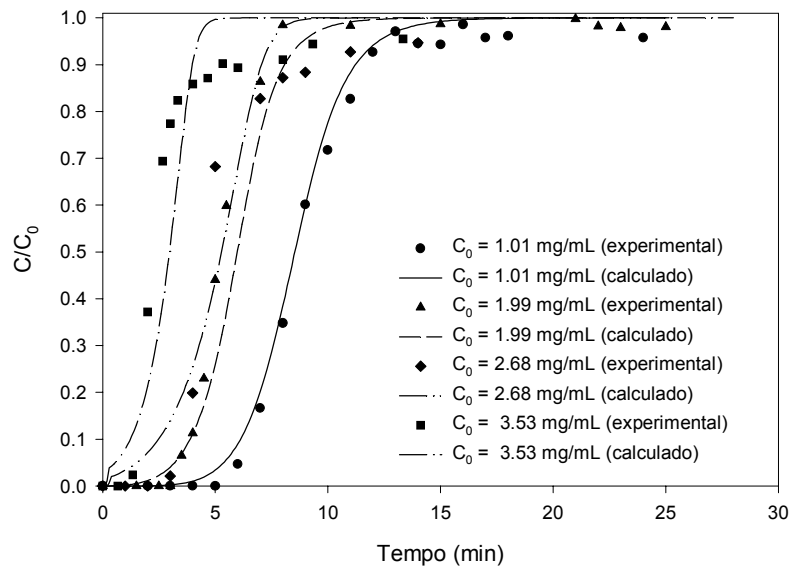


Figura 4.14 - Curvas de ruptura da α -la para quatro concentrações de alimentação; comparação dos resultados experimentais com os calculados por meio do modelo com dispersão axial. $Q = 1$ mL/min.

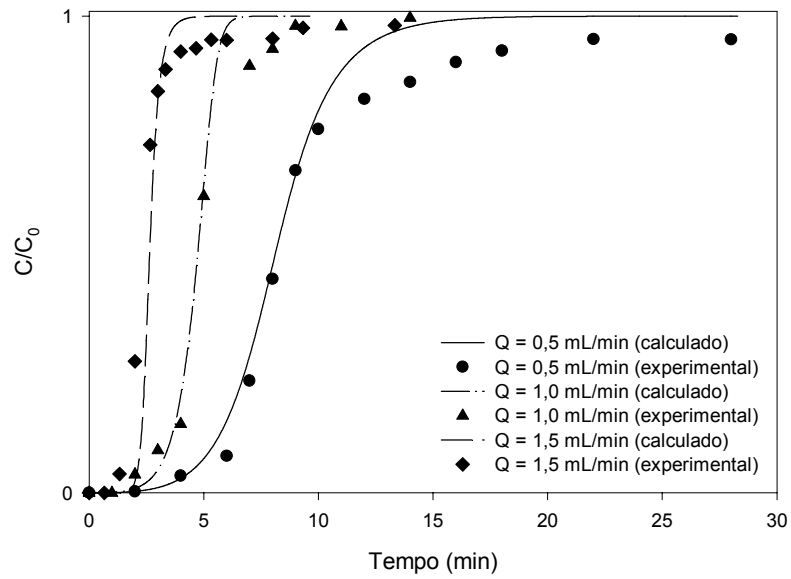


Figura 4.15 - Curvas de ruptura de β -lg para três vazões de alimentação; comparação dos resultados experimentais com os calculados por meio do modelo com dispersão axial. $C_0 = 6,62$ mL/min.

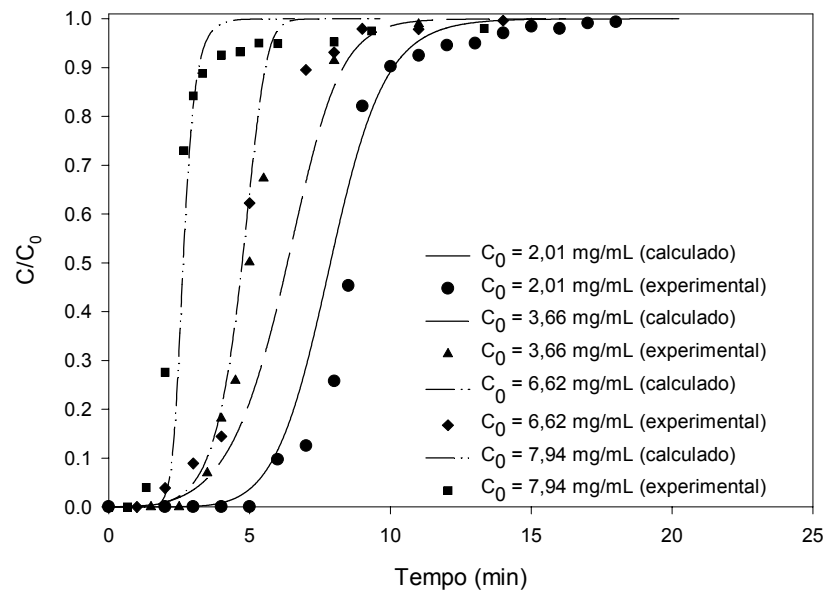


Figura 4.16 - Curvas de ruptura de β -lg para quatro concentrações de alimentação; comparação dos resultados experimentais com os calculados por meio do modelo com dispersão axial. $Q = 1$ mL/min.

A dificuldade do ajuste dos modelos para construção de uma curva de ruptura é devida às delicadas manipulações que os algoritmos fazem com as derivadas $\frac{dq}{dC}$ ao longo da isoterma, já que a solução numérica depende, diretamente, dessa derivada e, indiretamente, da função que representa a isoterma (QUADRI et al., 1998). Em se tratando de dados experimentais de uma solução multicomponente, em que pode haver competição pelo sítio de adsorção com presença do fenômeno de “roll up”, o ajuste torna-se mais complexo.

Nos experimentos não foi constatada existência de competição entre as duas proteínas estudadas, o que ocorre quando a concentração no efluente de um ou mais componentes da mistura é maior que a concentração deste na alimentação. Em ensaios preliminares, a concentração de saída dos compostos foi acompanhada por um intervalo de tempo de 180 min, para verificar se havia ocorrência de competição no sistema estudado.

A tendência representada pelas curvas das Figuras 4.13 a 4.16 condiz com a encontrada por HANSEN e MOLLERUP (1998), que utilizaram, como adsorvato, a BSA e, como adsorvente, a resina Q HyperD 35. Esses autores avaliaram a tendência de variação das curvas em decorrência da vazão e da concentração da alimentação da coluna, sendo dois modelos ajustados aos dados experimentais. Em todos os casos, o comportamento da primeira parte da curva apresentou maior concordância com os dados experimentais e simulados, do que o da segunda parte. O ajuste, na primeira parte do gráfico, é muito importante, pois, geralmente, é a partir dos dados obtidos nessa região que será determinado o ponto de interrupção do processo, com vistas em minimizar as perdas neste.

HEETER e LIAPIS (1997) estimaram o coeficiente de dispersão axial (D_{ap}) a partir de um modelo dinâmico de adsorção não-linear, para adsorção de BSA em colunas de leito fixo. Os valores preditos e experimentais apresentaram boa concordância entre ambos.

Nos casos encontrados na literatura e neste trabalho foi utilizado o modelo de isoterma de Langmuir, cujos parâmetros foram estimados por meio de análise frontal.

Os Quadros 4.5 e 4.6 apresentam os valores de D_{ap} e k_f calculados, conforme dados mostrados nas Figuras 4.13 a 4.16.

Quadro 4.5 - Valores calculados para k_f e D_{ap} , em coluna de leito fixo - $C_{\alpha-la} = 2,68$ mg/mL e $C_{\beta-lg} = 6,62$ mg/mL

α -lactoalbumina			β -lactoglobulina		
Q (mL/min)	D_{ap} (m ² /s)	k_f (m/s)	Q (mL/min)	D_{ap} (m ² /s)	k_f (m/s)
0,5	$2,64 \times 10^{-6}$	$1,98 \times 10^{-5}$	0,5	$5,37 \times 10^{-6}$	$6,15 \times 10^{-5}$
1,0	$6,45 \times 10^{-8}$	$3,75 \times 10^{-6}$	1,0	$3,93 \times 10^{-10}$	$9,15 \times 10^{-6}$
1,5	$3,70 \times 10^{-7}$	$3,02 \times 10^{-6}$	1,5	$5,42 \times 10^{-6}$	$7,50 \times 10^{-4}$

Quadro 4.6 - Valores calculados para k_f e D_{ap} , em coluna de leito fixo - vazão igual a 1 mL/min

α -lactoalbumina			β -lactoglobulina		
C_0 (mg/mL)	D_{ap} (m ² /s)	k_f (m/s)	C_0 (mg/mL)	D_{ap} (m ² /s)	k_f (m/s)
1,01	$4,46 \times 10^{-6}$	$4,81 \times 10^{-5}$	2,05	$2,47 \times 10^{-6}$	$6,15 \times 10^{-5}$
1,99	$3,93 \times 10^{-6}$	$2,22 \times 10^{-5}$	3,66	$2,46 \times 10^{-6}$	$1,34 \times 10^{-5}$
2,68	$6,45 \times 10^{-8}$	$3,75 \times 10^{-6}$	6,62	$3,93 \times 10^{-10}$	$9,15 \times 10^{-6}$
3,53	$4,53 \times 10^{-10}$	$4,68 \times 10^{-6}$	7,94	$7,42 \times 10^{-6}$	$6,72 \times 10^{-4}$

No Quadro 4.5 observa-se que os valores obtidos dos parâmetros decrescem com o aumento da vazão, para α -la. No caso da β -lg, há decréscimo dos valores para $Q = 1,0$ mL/min em relação àqueles obtidos quando $Q = 0,5$ mL/min. Para $Q = 1,5$ mL/min, os valores das estimativas voltam a elevar-se.

Observa-se, no Quadro 4.6, que tanto D_{ap} como k_f diminuem à medida que a concentração inicial aumenta, nas duas proteínas, com exceção da concentração mais elevada de β -lg. De acordo com HABBABA e ÜLGEN (1997), em baixas

concentrações iniciais de adsorvato, a adsorção não está em níveis de capacidade máxima do adsorvente, razão pela qual o mecanismo de interação é, provavelmente, menos complexo (principalmente quando se trabalha com misturas). Em concentrações elevadas, os efeitos do não-equilíbrio, como a interação proteína-proteína, e outros efeitos não-ideais, como impedimento estérico, podem ser muito significativos, visto que podem provocar a redução de k_f , dado o aumento da concentração inicial.

Um dos principais objetivos da modelagem é maximizar o número de informações sobre certo processo com custo e tempo reduzidos. A partir de dados experimentais e simulados, podem-se obter correlações que indiquem como determinada variável do processo se comporta em relação a outras, ou em relação a perturbações que possam ocorrer durante o processamento.

Neste trabalho, a partir dos dados simulados, foram calculados os valores de ponto de ruptura para quatro concentrações de α -la e β -lg distintas. De acordo com McCABE (1993), o ponto de ruptura é determinado quando o valor da concentração adimensional está entre 0,05 e 0,1. Isto é uma indicação de ordem prática, pois o tempo para que a concentração na saída seja igual ao da alimentação pode ser muito longo, e o ganho em produto adsorvido é, geralmente, muito pequeno. Neste trabalho, este termo foi fixado, para a concentração na saída da coluna, igual a 10% da concentração da alimentação. Observando-se a Figura 4.17, nota-se que, para α -la, o ponto de ruptura foi mais sensível à variação da concentração do que para β -lg. Os resultados obtidos concordam com o que se esperava teoricamente, ou seja, quanto mais concentrada a solução de alimentação, mais rápido será atingida a capacidade de adsorção da coluna. Esta análise é importante para reduzir as perdas durante o processamento, pois o instante no qual a concentração do soluto na saída da coluna é maior que zero indica que a coluna está próxima da saturação; nesse ponto, o processo deve ser interrompido para que não haja perda significativa de material.

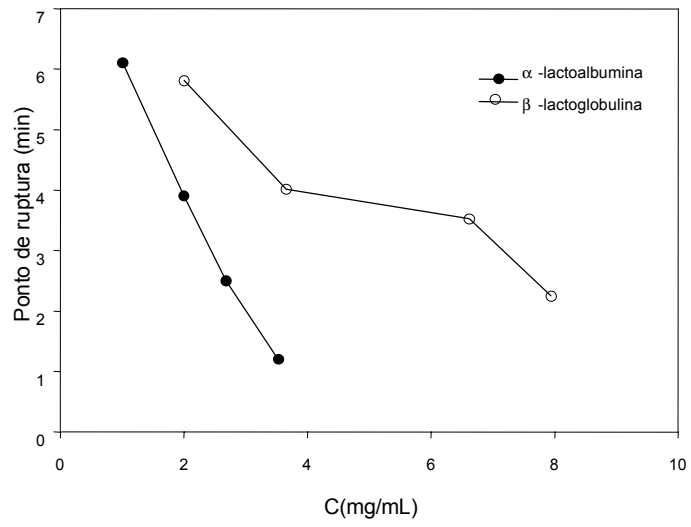


Figura 4.17 - Variação do ponto de ruptura com a concentração de alimentação.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pôde-se chegar às seguintes conclusões:

1. A resina de troca iônica Accel Plus QMA[®] foi adequada ao processo de adsorção das proteínas de soro de queijo, na faixa estudada;
2. As condições ótimas de pH e força iônica (μ), para adsorção das proteínas α -lactoalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg), foram pH 7,6 e μ 0,05 M;
3. O coeficiente de difusão nos poros (D_{ef}), ($1,67 \times 10^{-10}$ e $3,37 \times 10^{-10}$) m^2/s para α -la e β -lg, respectivamente, foi de ordem de grandeza maior que os observados para BSA, na mesma resina;
4. O modelo não-competitivo de Langmuir, para sistemas multicomponentes, explicou as isotermas de adsorção das proteínas obtidas por análise frontal;
5. Os valores de q_m e k_d foram 71,48 mg/g e 1,08 mg/mL, para α -la, e de 179,23 mg/g e 3,71 mg/mL, para β -lg.
6. O modelo de transferência de massa com dispersão axial (pseudo-homogêneo) representou, adequadamente, os resultados obtidos experimentalmente;
7. Os valores do coeficiente de dispersão axial (D_{ap}) obtidos foram maiores que os relatados na literatura, para outras proteínas do soro de queijo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON, A. W. **Physical chemistry of surfaces**, New York: John Wiley & Sons, 1990, 537 p.
- ANUALPEC, **Anuário da pecuária brasileira**, São Paulo: Argos Comunicação, 1999, 447 p.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos/ Teoria e Prática**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1999, 415 p.
- ARAÚJO, M. O. D. **Adsorção de albumina de soro bovino em resinas trocadoras de íons**, Campinas, SP: FEQ, UNICAMP, 1996. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1996, 85 p.
- ARNOLD, F. H., BLANCH, H.W., WILKE, C.R. Analysis of affinity separations: 1 Predicting the performance of affinity adsorbs. **Chemical Biochemistry Engineering Journal**, v.30, p. B9-B23, 1985a.
- ARNOLD, F. H., BLANCH, H.W., WILKE, C.R. Liquid chromatography plate height equations, **Journal of Chromatography**, v.330, p.159-166, 1985.
- ARVES, B. H. and LIAPIS, A. I. The modeling and analysis of the elution stage of biospecific adsorption in fixed beds. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.638-649, 1987.
- BARTLES, C. R., KLEIMAN, G., KORZUN, J. N., IRISH, D. B. A novel ion-exchange method for the isolation of streptomycin. **Chemical Engineering Progress**, v.54, n. 8, p.49-51, 1958.

- BELLOT, J. C., CONDORET, J. S. Selection of competitive adsorption model for modeling displacement chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.657, p.305-326, 1993.
- BEM-HASSAN, R. M., GHALY, A. E. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.47, p.89-105, 1994.
- BIRD, R. B., STEWART, W. E., LIGHFOOT, E. N. **Transport phenomena**. New York: John Wiley & Sons, 1960, 780 p.
- BOSCHETTI, E., COFFMAN, J. L. Enhanced Diffusion Chromatography and Related Sorbents for Biopurifications In: **Bioseparation and Bioprocessing, vol I**, Edited by Gabapathy Subramanian, 1998, 690 p.
- BOX, G. E. P., DRAPER, N. R. **Empirical model-building and response surfaces**, United States of America: John Wiley & Sons, Inc, 1987, 669 p.
- BRAMAUD, C., AIMAR, P., DAVEEE, G. Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of α -lactoalbumin under gentle heat treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p.391-397, 1997.
- BUIJS, A., WESSELINGH, J. A. Batch fluidized ion-exchange column for streams containing suspended particles. **Journal of Chromatography**, v.201, p.319-327, 1980.
- CARRÈRE, H. **Extraction des proteines du lactoserum par chromatographie d'échange d'ions en lit fluifisé**. Toulouse, França : INPT,1993. Thèse (Doctorat), Institut National Polytechnique de Toulouse, 1993, 210 p.
- CHANG, Y. K., CHASE, H. A. Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: the effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. **Biotechnology and Bioengineering**, v.49, p.512-526, 1996.
- CHASE, H. A. Prediction of the performance of preparative affinity-chromatography, **Journal of Chromatography**, v.297, p.179-202, 1984.
- CHASE, H. A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds, **Trends in Biotechnology**, v.12, p.296-303, 1994.
- CHASE, H. A., DRAEGER, N. M. Affinity purification of proteins using expanded beds, **Journal of Chromatography**, v.597, p.129-145, 1992.

- COIMBRA, J. **Desempenho de um Extrator Tipo Graesser na Separação de Proteínas do Soro de Queijo Usando Sistemas Aquosos Bifásicos**. Campinas, SP: UNICAMP, 1995. Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1995, 129 p.
- COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora Unicamp, 1990, 279 p.
- CRITTENDEN, J. C., SPETH, T. F., HAND, D. W., LUFT, P. J., LYKINS, B. Evaluating multicomponent competitive adsorption in fixed-beds, **Journal of Environmental Engineering-Asce**, v.113, n.6, p. 1363-1375, 1987.
- CRUZ, J. M., **Adsorção de insulina em resina trocadora de íons utilizando leitos fixos e expandidos**. Campinas, SP: FEQ, UNICAMP. 1997. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997, 118 p.
- DRAEGER, N.M., CHASE, H. A. Protein adsorption in liquid fluidized beds – advances in separation processes **In.: Chemical Engineering Symposium Series**, v.118, p.161-172, 1990.
- FENNEMA. **Química de los alimentos**, Zaragoza-España: Editora Acribia, 1993, 1095 p.
- FERRAT, A. Como valorizar o subproduto das fábricas de queijos, o “Lacto Soro”. **Boletim do leite**, v. 618, p.32-38, 1980.
- FRANCIS, G. L., REGESTER, G. O. WEBB, H. A. and BALLARD F. J., Extraction from cheese whey by cation-exchange chromatography of factors that stimulate the growth of mammalian cells. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.1209-1218, 1995.
- FREJ, A. K. B., JOHANSSON, S., LEIJON, P. Expanded bed adsorption at production scale: scale-up verification, process example and sanitization of column and adsorbent. **Bioprocess Engineering**, v.16, p.57-63, 1997.
- FURUSAWA, T., SUZUKI, M., SMITH, J. M. Rate parameters in heterogeneous catalysis by pulse techniques. **Catalysis Review Science Engineering**, v.13, p.43-76, 1976.
- GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba, SP: Nobel, 13. ed., 1990, 467 p.
- GRAYBILL, F. A. **An introduction to linear statistical models**, New York: McGraw-Hill, 1961, 463 p.

- GRASSELLI, M., NAVARRO, A., FERNADEZ, H, L., MIRANDA, M, V., CAMPERI Y., CASCONO, O. Que hacer com el suero de queso. **Ciencia Hoy**, v.43, 1997.
- GUIOCHON, G., SHIRAZI, S. G., KATTI, A. M. **Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography**, London, England: Academic Press, 1 ed., 1994, 697 p.
- HABBABA, M. M., ÜLGEN, K. Ö. Analysis of protein adsorption to ion-exchange in a finite bath. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v.69, p.405-414, 1997.
- HANSE, E., MOLLERUP, J. Application of the two-film theory to the determination on mass transfer coefficients for bovine serum albumin on anion-exchange columns. **Journal of Chromatography A**, v.827, p.259-267, 1998.
- HEDDLESON, R. A., ALLEN, J.C., WANG, Q.W., SWAISGOOD, H. E. Purity and yield of beta-lactoglobulin isolated by an N-retinyl-Celite bioaffinity column. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v.45, n.7, p.2369-2373, 1997.
- HEETER, G. A., LIAPIS, A. I. Model discrimination and estimation of the intraparticle mass transfer parameters for the adsorption of bovine serum albumin onto porous adsorbent particles by the use of experimental analysis data. **Journal of Chromatography A**, v.776, p.3-13, 1997.
- HEJTMÁNEK, V., SCHNEIDER, P. Axial dispersion under liquid-chromatography conditions, **Chemical Engineering Science**, v.48, p.1163-1168, 1993.
- HJORTH, R., LEIJON, P., FREJ, A-K. B., JÄGERSTE, C. Expanded bed adsorption chromatography In: **Bioseparation and Bioprocessing, vol I**, Edited by Gabapathy Subramanian, 1998, 690 p.
- HOLLAR, C. M., LAW, A. J. R., DALGLEISH, D. G., ROWN, R. J. Separation and quantification of major casein fractions using cation-exchange fast protein liquid chromatography, **Journal of Dairy Science**, v.74, p.2403, 1991.
- HORSTMANN, B.J., CHASE, H.A. Modelling the affinity adsorption of immunoglobulin g to protein a immobilized to agarose matrices, **Chemical Engineering Research Development**,v.67, n.3, p.243-254, 1989.
- HUANG, J-X., HORVÁTH, C. Adsorption isotherms on high-performance liquid chromatographic sorbents, **Journal of Chromatography**, v.406, p.275-284, 1987.

- JACOBSON, J. M., FRENZ, J., HORVATH, C. Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.316, p.53-68, 1984.
- JACOBSON, J. M., FRENZ, J. Determination of competitive adsorption isotherms for modeling large-scale separations in liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.499, p.5-19, 1990.
- JAMES, E. A. **The Application of Multicomponent Adsorption Theory to an Ion-exchange Chromatography System for Recovery of Whey Proteins**. Brisbane: DCE, The University of Queensland, 1994. Thesis (PhD) – Department of Chemical Engineering, The University of Queensland Australia, 1994, 125 p.
- KATOH, S., KAMBAYASHY, T., DEGUCHI, R., YOSHIDA, F. Performance of affinity chromatography columns. **Biotechnology Bioengineering**, v.20, p.267-280, 1978.
- LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. **Journal of American Chemical Society**, v.30, p.2263-2295, 1916.
- LEAVER, G., CONDER, J. R., HOWELL, J. A. Adsorption isotherms of albumin on a cross-linked cellulose chromatographic ion-exchanger, **I. Chemical E. Symposium Series**, n^o 118, p 1-15, 1990.
- LISEC, O., HUGO, P., SEIDEL, A. –M. Frontal analysis method to determine competitive adsorption isotherms. **Journal Chromatography A**, v.908, p.19-34, 2001.
- McCABE, W. I., SMITH, J. C., HARRIOTT, P. **Unit operations of chemical engineering**, New York: McGraw-Hill Book Co., 5th Edition 1993, 1130 p.
- MADRID, A., CENZANO, I. e VICENTE, J., M. **Nuevo manual de industrias alimentarias**, Madrid, 1995, 599 p.
- MANJI, B., HILL, A., KAKUDA, Y., IRVINE, D. M. Rapid separation of milk proteins by anion exchange chromatography, **Journal of Dairy Science**, v.68, p.3176-3179, 1985.
- MÄKINEN-KILJUNEN, S., SORVA, R. Bovine β -lactoglobulin levels in hidrolysed protein formulas for infant feeding, **Clin. Exp. Allergy**, v.23, p.287-291, 1993.

- MOOR, C., HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processes and functional proprieties critical, **Reviews in Food Science and Nutrition**, **Columbus**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- NEVES, S. B. **Modelagem de um leito fixo de adsorção para sistemas líquido-sólido**. Salvador, BA: EQ, UFBA, 1995. Dissertação (Mestrado), Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, 1995, 130 p.
- PEARCE, R., J. Analysis of whey proteins by high performance liquid chromatography, **The Australian Journal of Dairy Technology**, p.114-117, 1983.
- PEREIRA, J. A. M. **Adsorção de beta-galactosidase de *Scopulariopsis sp.* em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala**, Campinas, SP: FEQ, Unicamp, 1999. Dissertação (Doutorado), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999, 138 p.
- QUADRI, M. B., CRUZ, J. M., SANTANA, C. C. Modelagem numérica do processo de adsorção em coluna da insulina sobre a resina Accel Plus QMA[®]. **II Encontro Brasileiro Sobre Adsorção**. Florianópolis, Santa Catarina, 1998.
- SAS Institute Inc. **SAS/STAT[®] User's Guide, Version 6**, Fourth Edition, Volume 2, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1989, 846 p.
- SOMORJAI, G. A. **Introduction to surface chemistry and catalysis**, New York: John Wiley & Sons, 1994. 335 p.
- SKIDMORE, G. L., CHASE, A. H. Two-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose[®] FF. **Journal of Chromatography**, v.505, p.329-347, 1990.
- SKUDDER, P. J. Evaluation of a porous silica based in ion-exchange medium for the production of protein fractions from rennet and acid whey. **Journal of Dairy Research**, v.52, p.167-181, 1985.
- SPIEKER, A., KLOPPENBURG, E., GILES, E-D. Computer Modeling of Chromatographic Bioseparation In: **Bioseparation and Bioprocessing, vol I**, Edited by Gabapathy Subramanian, 1998, 690 p.
- TRUEI, Y. -H., GU, T., TSAI, G. -J., TSAO, G. T. Large-scale gradient elution chromatography. **Advanced Biochemistry Engineering/Biotechnology**, v.47, p.1-43, 1992.
- UGER, K. K. **J. Chromatography library**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1979.

- USDEC NEWS, O uso de produtos de soro em iogurtes e produtos lácteos fermentados, **The U.S. Dairy Export Council**, v.2, nº2, outubro de 1999.
- VOGT, S., FREIGAT, R. Comparison of anion-exchange and hydroxyapatite displacement chromatography for the isolation of whey proteins. **Journal of Chromatography**, v.760, n.1, p.125-137,1997.
- WANG, Q. W., SWAISGOOD, H. E. Characteristics of beta-lactoglobulin binding to the all-trans-retinal moiety covalently immobilized on celite(Tm), **Journal of Dairy Science**, v.76, n.7, p.1895-1901, 1993.
- WANKAT, P.C. **Large scale adsorption and chromatography**, Boca Raton; CRC Press, vol. 1 and 2, 1986.
- WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products, **Journal of Dairy Science**, v.81, p.597-608, 1998.
- WOLF, F. J. **Separation methods in organic chemistry and biochemistry**, New York: Academic Press, p.181-211, 1971.