

RAFAEL DA COSTA ILHÉU FONTAN

**TERMODINÂMICA E MODELAGEM DA ADSORÇÃO EM SISTEMAS
MONO E MULTICOMPONENTES COMPOSTOS POR
 α - LACTOALBUMINA E β - LACTOGLOBULINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
FEVEREIRO – 2005

RAFAEL DA COSTA ILHÉU FONTAN

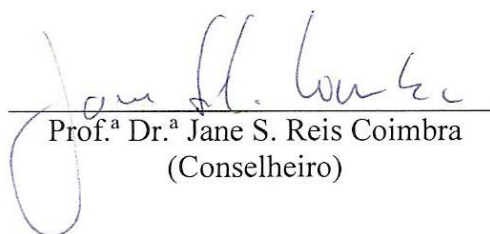
**TERMODINÂMICA E MODELAGEM DA ADSORÇÃO EM SISTEMAS
MONO E MULTICOMPONENTES COMPOSTOS POR
 α - LACTOALBUMINA E β - LACTOGLOBULINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADO: 28 de fevereiro de 2005



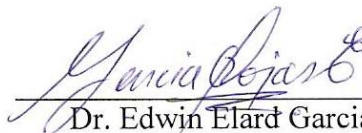
Prof. Dr. Luis Henrique M. da Silva
(Conselheiro)



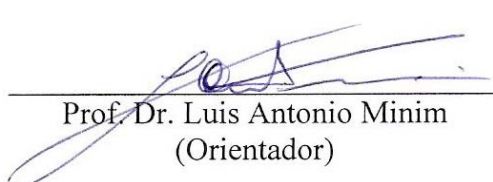
Prof.ª Dr.ª Jane S. Reis Coimbra
(Conselheiro)



Prof.ª Dr.ª Maria Helena C. de Andrade



Dr. Edwin Elard Garcia Rojas


Prof. Dr. Luis Antonio Minim
(Orientador)

A Deus;

A minha família;

A Gabi.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre;

Aos meus pais Ivo e Ana, meus irmãos Ivan e Verônica, minha vó Manuela e meu primo Diogo, por tudo;

À minha querida Gabi, pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão que me fizeram chegar até aqui;

Ao Prof. Luis Antonio Minim, pela orientação, confiança e amizade;

Ao Professor Luis Henrique M. da Silva pela ajuda, conselhos e amizade;

À Prof^ª. Jane S. R. Coimbra, pela igual amizade, conselhos e ajuda;

À Renata C. F. Bonomo, amiga incondicional, pela paciência, disposição e incontáveis momentos de ajuda;

À professora Maria Helena C. de Andrade e ao Doutor Edwin E. Garcia Rojas pelos conselhos e sugestões para esta dissertação;

A todos os meus amigos, representados nos nomes da Suzana, Paulo Bonomo, Maurício e Júnio;

Aos amigos do Laboratório de Processos de Separação, pelo convívio e amizade;

À minha nova família, S. Ronaldo e D. Enilda; Ronaldo, Amanda e Lucas; Ronielli, Harllen e Hugo, e Roselini;

Ao CNPq e à FAPEMIG, pelo auxílio financeiro;

A todos do Departamento de Tecnologia de Alimentos que de alguma forma contribuíram para que essa longa jornada se encerrasse com êxito.

BIOGRAFIA

Rafael da Costa Ilhéu Fontan, filho de Ivonilton Alves Fontan e Ana Paula da Costa Ilhéu Fontan, nasceu em 19 de maio de 1980, no Rio de Janeiro – RJ.

Em março de 1998, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, no curso de Engenharia de Alimentos. Em março de 1999 iniciou atividades de iniciação científica no Laboratório de Processos de Separação sob orientação do Professor Luis Antonio Minim, colando grau em março de 2003.

No mesmo mês ingressou no Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, realizando seus estudos na área de Processos Industriais, concluindo-o em fevereiro de 2005.

CONTEÚDO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	4
<i>ARTIGO 01 – CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA APLICADA À PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....</i>	<i>7</i>
Resumo.....	7
Abstract.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. PROTEÍNAS.....	10
3. TROCA IÔNICA.....	12
3.1. Teoria da Dupla Camada Elétrica.....	12
3.2. Equilíbrio na Troca Iônica.....	15
3.3. Isotermas de Adsorção.....	16
3.3.1. Isotermas Simples ou Monocomponentes.....	17
3.3.2. Isotermas Competitivas ou Multicomponentes.....	19
4. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM LARGA ESCALA.....	20
4.1. Operação em Batelada.....	21
4.2. Operação em Colunas.....	22
4.3. Variáveis de Processo na Cromatografia de Troca Iônica.....	23
4.3.1. Temperatura.....	23
4.3.2. Tipo e Concentração de Sal.....	24
4.3.3. pH.....	25
4.3.4. Natureza da Proteína.....	26
4.3.5. Natureza do Adsorvente.....	27
4.3.6. Recirculação.....	28
5. APLICAÇÕES.....	28
6. CONCLUSÃO.....	31

7. SIMBOLOGIA.....	32
8. REFERÊNCIAS.....	32
<i>ARTIGO 02 – SINGLE COMPONENT ISOTHERMS AND THERMODYNAMIC ANALYSIS OF α-LACTALBUMIN AND β-LACTOGLOBULIN ADSORPTION ON ION EXCHANGER SORBENT...</i>	39
Abstract.....	39
1. INTRODUCTION.....	39
2. THEORY.....	41
2.1. Determination of single-component adsorption isotherms.....	41
2.2. Single-component isotherm models.....	42
a. Freundlich model.....	42
b. Langmuir model.....	42
c. Bi-Langmuir model.....	43
d. Toth model.....	44
e. Jovanovic model.....	44
2.3. Thermodynamic analysis.....	45
3. EXPERIMENTAL.....	47
3.1. Materials.....	47
3.2. Equipment.....	47
3.3. Acquisition of isotherms data points by FA method.....	48
3.4. Modeling equilibrium and thermodynamic analysis.....	48
4. RESULTS AND DISCUSSION.....	49
4.1. Adsorption isotherms of α -la and β -lg.....	49
4.2. Modeling equilibrium data.....	51
4.3. Thermodynamic analysis.....	56
5. CONCLUSIONS.....	60
6. ACKNOWLEDGMENTS.....	60
7. SYMBOLS.....	61
8. REFERENCES.....	62
<i>ARTIGO 03 – MULTI COMPONENT ISOTHERMS OF α-LACTALBUMIN AND β-LACTOGLOBULIN ON ION EXCHANGER SORBENT.....</i>	66
Abstract.....	66
1. INTRODUCTION.....	66

2. THEORY.....	67
2.1. Determination of multi-component adsorption isotherms.....	67
2.2. Multi-component isotherm models.....	70
3. EXPERIMENTAL.....	71
3.1. Materials.....	71
3.2. Equipment.....	71
3.3. Determination of isotherms data points by FA method.....	72
3.4. Mathematical modeling of competitive isotherms.....	73
4. RESULTS AND DISCUSSION.....	73
4.1. Competitive adsorption isotherms to α-la and β-lg.....	73
4.2. Modeling equilibrium data.....	77
5. CONCLUSIONS.....	79
6. ACKNOWLEDGMENTS.....	79
7. SYMBOLS.....	80
8. REFERENCES.....	81
CONCLUSÃO GERAL.....	84
ANEXO: METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO POR ANÁLISE FRONTAL.....	85
1. Adsorvente e Coluna	85
2. Adsorvato	85
3. Experimentos de análise frontal monocomponentes	86
3.1. Determinação da quantidade de soluto adsorvido no leito	87
4. Experimentos de análise frontal multicomponentes	89
5. Referências	90

RESUMO

FONTAN, Rafael da Costa Ilhéu, M. S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005. **Termodinâmica e modelagem da adsorção em sistemas mono e multicomponentes compostos por α -lactoalbumina e β -lactoglobulina.** Orientador: Luis Antonio Minim. Conselheiros: Luis Henrique Mendes da Silva e Jane Sélia dos Reis Coimbra.

A cromatografia de troca iônica é uma técnica que há décadas vem sendo estudada, mas apenas recentemente começou a ser amplamente difundida na purificação de macromoléculas. Para se conhecer os fundamentos e aplicações desta técnica, foi realizada uma revisão sobre o assunto, no formato de artigo, enfocando principalmente a purificação de proteínas. Foram abordados tópicos como a estrutura protéica, o mecanismo de troca iônica, os diversos fatores que influenciam este processo e apresentados exemplos de aplicação da cromatografia de troca iônica na purificação de proteínas. Para que esses processos sejam economicamente viáveis e operacionalmente seguros devem ser otimizados, sendo importante o conhecimento do equilíbrio termodinâmico do processo. Foram determinadas as isotermas de adsorção para as proteínas α -lactoalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg) em uma coluna de troca iônica em sistemas monocomponentes, a quatro temperaturas (283.15 K, 293.15 K, 303.15 K e 313.15 K). Dentre os cinco diferentes tipos de modelos de isotermas ajustados, os modelos de Langmuir, Jovanovic e Toth apresentaram os melhores resultados. A análise termodinâmica baseada na equação não-linear de van't Hoff demonstrou que o processo de troca iônica para as duas

proteínas nas condições estudadas é endotérmico, entropicamente dirigido, ocorrendo de maneira espontânea ($\Delta G_{ad}^0 < 0$) com o aumento da temperatura. Por fim, foram estudados sistemas multicomponentes formados por α -la e β -lg em diferentes proporções (1:1, 1:3, 3:1 e 1:2). Foi proposta uma modificação no método de análise frontal empregado para a determinação das isotermas de adsorção competitivas. Ao invés do método proposto por Jacobson et al. (1987) para sistemas multicomponentes, foi utilizado o método proposto por Jacobson et al. (1984) para sistemas monocomponentes, aplicado simultaneamente para os diferentes compostos do sistema. O modelo competitivo de Langmuir se ajustou satisfatoriamente aos dados experimentais, comprovando que a alternativa proposta pode ser aplicada a sistemas multicomponentes formados por macromoléculas.

ABSTRACT

FONTAN, Rafael da Costa Ilhéu, M. S., Federal University of Viçosa, February, 2005. **Thermodynamics and modeling of adsorption process in single and multi-component systems formed by α -lactalbumin and β -lactoglobulin.** Adviser: Luis Antonio Minim. Committee Members: Luis Henrique Mendes da Silva and Jane Sélia dos Reis Coimbra.

The ion-exchange chromatography is a technique that has been studied at a long time, but just now began to be diffused to macromolecules purification. To a better understanding of this technique, a review was made, focusing mainly the purification of proteins. It was seen topics as protein structure, the mechanism of ion-exchange, the factors that influence this process and many examples of application of ion-exchange chromatography in the proteins purification. For these processes to be economically viable and operationally safes, they should be optimized, being important the knowledge of the thermodynamic equilibrium of the process. It was obtained the adsorption isotherms of α -lactalbumin (α -la) and β -lactoglobulin (β -lg) presents in single-component systems, in a ion-exchange column at four temperatures (283.15 K, 293.15 K, 303.15 K and 313.15 K). The adjustment of five different isotherm models was verified, and the Langmuir, Jovanovic and Toth models presented the best results. Thermodynamic analysis based on the non-linear van't Hoff equation demonstrated that the process of ion-exchange of both proteins in the studied conditions is endothermic, entropically driven, occurring spontaneously ($\Delta G_{ad}^0 < 0$) with the increase of temperature. Finally, it was studied

multicomponent systems formed for α -la and β -lg at different proportions (1:1, 1:3, 3:1 and 1:2). A modification was proposed in the frontal analysis method used for the determination of competitive adsorption isotherms. Instead of the method proposed by Jacobson et al. (1987) for multicomponent systems, the method proposed by Jacobson et al. (1984) for single-component systems was used, applied simultaneously for each compound of the complex system. The competitive Langmuir model was adjusted satisfactorily to the experimental data, showing that this alternative method can be applied to multicomponent systems formed by macromolecules.

INTRODUÇÃO GERAL

A purificação de proteínas por cromatografia de alta eficiência é uma das áreas que mais tem se desenvolvido nas ciências farmacêuticas e biotecnológicas nas últimas décadas, dada a necessidade de obtenção de produtos de elevado grau de pureza, com condições de trabalho não-agressivas para que os compostos não percam sua atividade biológica (SHIOSAKI et al., 1994).

Muitas técnicas cromatográficas têm sido empregadas ao longo dos anos para a separação de componentes de uma mistura, como a interação hidrofóbica, bioafinidade, exclusão molecular e troca iônica (GERBERDING e BYERS, 1998).

A cromatografia de troca iônica é uma das principais técnicas utilizadas na recuperação e purificação de biomoléculas (JAMES e DO, 1991), estando presente nos estágios iniciais da maioria dos processos conhecidos. Como exemplos de aplicações da troca iônica na purificação de proteínas têm-se a recuperação de hormônios sintetizados em microrganismos com DNA-recombinante (RIBELA et al., 2003), anticorpos monoclonais (KNUDSEN et al., 2001), enzimas (SANTOS et al., 2002), proteínas da clara de ovo (LEVISON et al., 2000) e proteínas do soro de queijo (GERBERDING e BYERS, 1998; HAHN et al., 1998; BONOMO et al., 2003).

Explicar o mecanismo básico da troca iônica, as principais relações de equilíbrio existentes e fatores que podem influenciá-lo, assim como demonstrar a aplicabilidade de tal técnica na purificação de proteínas, foi o objetivo da revisão contida na primeira parte deste trabalho.

Para que esses processos de purificação sejam economicamente viáveis e operacionalmente seguros, devem ser otimizados (DAVIS, 1998), sendo necessário

para tanto conhecer dados de equilíbrio termodinâmico e cinético das fases envolvidas no processo de separação (GRITTI e GUIOCHON, 2003).

O equilíbrio termodinâmico nos processos adsorptivos geralmente é apresentado na forma de isotermas de adsorção, que relacionam a distribuição de um determinado soluto entre uma fase fluida e uma sólida (GUIOCHON et al., 1994). Já a cinética de transferência de massa no processo conta com modelos como o do equilíbrio-dispersivo e da taxa geral, que levam em consideração a difusividade no adsorvente, a dispersão axial e outros efeitos cinéticos (GUIOCHON, 2002).

Na segunda parte deste trabalho, foram determinadas as isotermas de adsorção para as proteínas α -lactoalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg) em uma coluna de troca iônica em condições monocomponentes, em quatro temperaturas (283.15 K, 293.15 K, 303.15 K e 313.15 K). Verificou-se o ajuste de cinco diferentes modelos de isotermas e, através da análise não-linear de van't Hoff (BOYSEN et al., 1999) foram determinados parâmetros termodinâmicos do processo (entalpia, entropia e energia livre de Gibbs), que possibilitaram a melhor compreensão do fenômeno.

A grande maioria dos estudos com equilíbrio termodinâmico e avaliação de parâmetros de transferência de massa relacionados a processos cromatográficos tem sido conduzida em sistemas monocomponentes, em condições próximas à idealidade (JACOBSON et al, 1987; GUIOCHON et al., 1994). Entretanto na última década uma grande quantidade de trabalhos tem abordado sistemas multicomponentes, mas, majoritariamente, usando compostos de baixa massa molar (QUIÑONES e GUIOCHON, 1996; SUN et al., 2001; GRITTI e GUIOCHON, 2004).

Mais escassos ainda são os trabalhos com sistemas multicomponentes contendo macromoléculas como as proteínas. Em muitos casos, extrapolações da

cromatografia de aminoácidos são feitas para as proteínas, o que leva a erros nas condições experimentais, uma vez que o comportamento das proteínas e aminoácidos são bem distintos (JAMES e DO, 1991; BELLOT e CONDORET, 1993).

Na terceira e última parte deste trabalho foram determinadas as isotermas de adsorção competitivas para sistemas multicomponentes compostos por diferentes proporções de α -la e β -lg. A técnica usual para tal determinação, a análise frontal competitiva (JACOBSON et al., 1987), possui o inconveniente, ao se trabalhar com macromoléculas, de não levar a formação do *plateau* intermediário entre as curvas de ruptura (CHARTON et al., 1994), que é a premissa fundamental da técnica. Foi proposta então uma adaptação para que os estudos com proteínas fossem possíveis por meio de análise frontal.

Esse trabalho é uma importante contribuição para a melhor compreensão sobre os fenômenos envolvidos na cromatografia de troca iônica aplicada a macromoléculas, e que as informações aqui apresentadas auxiliem no desenvolvimento de novos processos e trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

- BELLOT, J. C.; CONDORET, J. S. Theoretical study of the ion-exchange preparative chromatography of a two-protein mixture. *Journal of Chromatography*, v. 635, p. 1-17, 1993.
- BONOMO, R. C. F.; SARAIVA, S. H.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; MINIM, V. P. R.; FONTAN, R. C. I. Multicomponent adsorption of whey proteins by ion exchanger. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 6, n. 2, p. 323-326, 2003.
- BOYSEN, R. I.; WANG, Y.; KEAH, H. H.; HEARN, M. T. W. Observations on the origin of the non-linear van't Hoff behaviour of polypeptides in hydrophobic environments. *Biophysical Chemistry*, v. 77, p. 79-97, 1999.
- CHARTON, F.; BAILLY, M.; GUIOCHON, G. Recycling in preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 687, p. 13-31, 1994.
- DAVIS, C. J. A. Large-scale chromatography: design and operation – chapter 6. In: SUBRAMANIAN, G. (editor) *Bioseparation and bioprocessing*, v.1. Wiley-VCH, Weinheim, p. 125-143, 1998.
- GERBERDING, S. J.; BYERS, C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *Journal of Chromatography A*, v. 808, p. 141-151, 1998.
- GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Effect of the mobile phase composition on the isotherm parameters and the high concentration band profiles in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 995, p. 37-54, 2003.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Influence of a buffered solution on the adsorption isotherm and overloaded band profiles of an ionizable compound. *Journal of Chromatography A*, v. 1028, p. 197-210, 2004.

GUIOCHON, G. Preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 965, p. 129-161, 2002.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. Academic Press, New York, 700p., 1994.

HAHN, R.; SCHULZ, P. M.; SCHAUPP, C.; JUNGBAUER, A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 795, p. 277-287, 1998.

JACOBSON, J.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C. Measurement of competitive adsorption isotherms by frontal chromatography. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 26, p. 43-50, 1987.

JAMES, E. A.; DO, D. D. Equilibria of biomolecules on ion-exchange adsorbents. *Journal of Chromatography*, v. 542, p. 19-28, 1991.

KNUDSEN, H. L.; FAHRNER, R. L.; XU, Y.; NORLING, L. A.; BLANK, G. S. Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification. *Journal of Chromatography A*, v. 907, p. 145-154, 2001.

LEVISON, P. R.; HOPKINS, A. K.; HATHI, P.; BADGER, S. E.; MANN, F.; DICKSON, N.; PURDOM, G. Suspended bed chromatography, a new approach in downstream processing. *Journal of Chromatography A*, v. 890, p. 45-51, 2000.

QUIÑONES, I.; GUIOCHON, G. Application of different isotherm models to the description of single-component and competitive adsorption data. *Journal of Chromatography A*, v. 734, p. 83-96, 1996.

RIBELA, M. T. C. P.; GOUT, P. W.; BARTOLINI, P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. *Journal of Chromatography B*, v. 790, p. 285-316, 2003.

SANTOS, E. S.; GUIRARDELLO, R.; FRANCO, T. T. Preparative chromatography of xylanase using expanded bed adsorption. *Journal of Chromatography A*, v. 944, p. 217-224, 2002.

SHIOSAKI, A.; GOTO, M.; HIROSE, T. Frontal analysis of protein on a membrane adsorber. *Journal of Chromatography A*, v. 679, p. 1-9, 1994.

SUN, S.; YANG, G.; SUN, H.; WANG, D.; LIU, H. Determination and comparison of competitive isotherms by rectangular pulse method and frontal velocity analysis method. *Journal of Chromatography A*, v. 918, p. 13-23, 2001.

ARTIGO 01

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA APLICADA À PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Resumo

A cromatografia de troca iônica é uma técnica que há décadas vem sendo estudada, mas apenas recentemente tem sido amplamente aplicada à purificação de macromoléculas. No presente trabalho de revisão são abordados tópicos que enfocam tanto a estrutura protéica quanto o mecanismo de troca iônica, bem como os diversos fatores que influenciam o processo de troca iônica. Também são apresentados exemplos de aplicação nas mais diversas áreas da ciência.

Palavras-chave: troca iônica, purificação, proteínas.

Abstract

The ion-exchange chromatography is a technique that has been studied for decades, but just recently it has been used in macromolecules purification. In this review paper was covered topics as protein structure, mechanism of ion-exchange, as well as several factors that influence the ion-exchange process. Also application examples were presented to show how this technique has been used in the most areas of the science.

Key-words: ion-exchange, purification, proteins.

1. INTRODUÇÃO

A purificação de biocompostos oriundos das mais diversas fontes naturais é um desafio que sempre motivou os pesquisadores desde épocas remotas. A busca por princípios ativos de extratos vegetais, animais e microbianos levou ao desenvolvimento de técnicas sofisticadas para que tal intento fosse possível.

Na última década foram feitos progressos consideráveis na compreensão dos processos cromatográficos, tornando possível a otimização dos projetos e das condições operacionais de separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (GRITTI e GUIOCHON, 2003).

Os processos cromatográficos podem ser divididos em dois grandes grupos (analíticos e preparativos), que contam com os mesmos princípios e técnicas, mas com finalidades diferentes. Na cromatografia analítica, o objetivo é a identificação e quantificação dos componentes de uma mistura simples ou complexa, enquanto que na cromatografia preparativa, o objetivo é isolar um determinado componente de uma mistura e utilizá-lo para alguma finalidade específica (GUIOCHON, 2002).

Os dois grupos são governados pelas mesmas equações de equilíbrio, os balanços de massa e as isotermas de adsorção (VELAYUDHAN e HORVÁTH, 1988). No entanto, cada um possui regras próprias. Assim, as condições operacionais para ambos devem ser mais bem estudadas para a otimização dos processos, trazendo a cromatografia para o mesmo nível de importância de outros processos de separação em grande escala (BELLOT e CONDORET, 1993a).

A purificação preparativa de biomoléculas a partir de misturas complexas apresenta-se ainda como um desafio para as indústrias farmacêuticas e de biotecnologia (BELLOT e CONDORET, 1993b; VELAYUDHAN e HORVÁTH, 1994), embora o crescente interesse desses segmentos por processos cromatográficos

tenha acelerado o seu desenvolvimento, levando ao estabelecimento de métodos de separação eficientes e altamente específicos (GERBERDING e BYERS, 1998).

As técnicas cromatográficas são fundamentadas em princípios como a exclusão molecular, troca iônica, interação hidrofóbica, bioafinidade, entre outros (GERBERDING e BYERS, 1998; GUIOCHON, 2002). Estas também provêm uma grande versatilidade nos procedimentos experimentais, levando à obtenção de informações sobre o comportamento biofísico de macromoléculas, bem como modelos sobre seu comportamento em sistemas biológicos (BOYSEN et al., 1999).

Dentre as técnicas mencionadas acima, a cromatografia de troca iônica (CTI) é a mais utilizada na recuperação e purificação de proteínas (JAMES e DO, 1991; BELLOT e CONDORET, 1993b; BOWEN e HUGHES, 1993; LIN et al., 2001). Essa técnica é baseada nas interações entre aminoácidos carregados eletricamente na superfície da proteína e resinas eletricamente carregadas com cargas opostas às dos aminoácidos (SKIDMORE e CHASE, 1990; LIN et al. 2001).

Os processos adsortivos são usados em muitos segmentos industriais, desde a concentração e separação de constituintes não-protéicos até o fracionamento de misturas complexas de proteínas (BOWEN e HUGHES, 1993). Na produção industrial, as etapas de concentração, separação e purificação respondem por mais de 50 % dos custos operacionais, envolvidos com equipamentos e materiais de consumo, sendo desejável e necessária a otimização desses processos, garantindo melhor desempenho, maior eficiência e redução de custos operacionais (SKIDMORE e CHASE, 1990; BOWEN e HUGHES, 1993).

Para a otimização do processo cromatográfico de purificação de proteínas, é necessário conhecer o equilíbrio de adsorção para os compostos de interesse. Usualmente, o equilíbrio é apresentado na forma de isotermas de adsorção que

relacionam a concentração de um composto, em solução e na superfície de um sólido adsorvente, ao longo de uma faixa de concentrações de interesse (JACOBSON et al., 1987). A isoterma é uma relação termodinâmica fundamental que permite a predição precisa dos perfis de bandas individuais (GUIOCHON et al., 1994).

Vários parâmetros experimentais podem alterar o comportamento de adsorção das proteínas na CTI, e conseqüentemente seu equilíbrio e a isoterma de adsorção. Dentre eles, tem-se o tipo de tampão utilizado, a natureza dos co- e contra-íons em solução (FANG et al., 1996), a temperatura (MIHELIC̆ et al., 2003), a força iônica e a vazão do eluente (HUANG et al., 1990), dentre outros.

No presente trabalho é apresentada uma revisão sobre os princípios e o emprego da cromatografia de troca iônica na purificação de proteínas em escala analítica e preparativa.

2. PROTEÍNAS

Proteínas são polímeros formados por 19 diferentes α -L-aminoácidos e um iminoácido encadeados por ligações peptídicas. Os aminoácidos constituintes das proteínas possuem uma estrutura básica em comum (um átomo de carbono ligado a um radical carboxila, uma amina terciária e um átomo de hidrogênio, além de uma cadeia lateral R) e diferem somente na natureza química das cadeias laterais ligadas ao átomo do carbono alfa, dividindo-se em apolares (alifáticos e aromáticos) e polares (carregados e não-carregados). Tal diferença nas cadeias laterais leva a diferentes propriedades físico-químicas, como reatividade, carga elétrica e solubilidade (DAMODARAN, 1997).

Tem-se que, em pH neutro, entre os aminoácidos carregados, existem os aminoácidos ácidos (Aspartato e Glutamato) e os aminoácidos básicos, (Lisina, Arginina e Histidina) (LEHNINGER, 1995). Como nas proteínas encontram-se

aminoácidos das duas categorias, sua carga líquida será dependente do pH do meio. Sob condições ácidas (presença de íons H^+), os aminoácidos básicos estão ionizados (protonados) e os ácidos estão na forma neutra, resultando numa carga líquida positiva para a proteína. Em condições básicas (presença de íons OH^-), os grupos carboxila dos aminoácidos ácidos estão ionizados e os básicos estão neutros, ocorrendo o inverso. O valor de pH em que a carga líquida da proteína é nula é chamado ponto isoelétrico (pI) e depende da relação entre aminoácidos ácidos e básicos existentes em sua composição (KOPACIEWICZ et al., 1983).

A seqüência linear de aminoácidos que forma uma proteína é chamada de estrutura primária. Níveis estruturais hierárquicos mais complexos são observados, de modo a definir a forma tridimensional da proteína. O arranjo espacial está intimamente ligado com suas atividades (DAMODARAN, 1997). Por exemplo, proteínas estruturais tendem a ser fibrosas, com uma estrutura em hélice, enquanto que enzimas com atividade catalítica possuem em geral a forma globular. A forma espacial da proteína está relacionada às interações químicas realizadas entre os aminoácidos da estrutura primária e moléculas que as circundam, como moléculas de água. Tais interações variam de ligações de hidrogênio a interações hidrofóbicas, passando por ligações dissulfídicas, entre outras (LEHNINGER, 1995).

Além das funções nutricionais e biológicas já conhecidas das proteínas, estas ainda exibem características tecnológicas de grande interesse industrial, principalmente na indústria de alimentos, como a capacidade de formação de gel, emulsificante, espumante e estabilizante. Tais características são importantes por alterar ou realçar as propriedades sensoriais e reológicas dos alimentos levando a um maior consumo de proteínas nesse segmento industrial (DAMODARAN, 1997).

3. TROCA IÔNICA

A operação de troca iônica pode ser definida como um fenômeno físico-químico em que uma solução troca íons com a superfície de um sólido poroso (GUIOCHON et al., 1994). As técnicas usadas na troca iônica são tão semelhantes às usadas na adsorção que, para a maioria dos casos de interesse na engenharia, pode ser considerada como um caso especial da adsorção (GEANKOPLIS, 1993).

3.1. Teoria da Dupla Camada Elétrica

Na troca iônica, a fase líquida, em geral, é uma fase aquosa eletrolítica e o sólido adsorvente é um eletrólito insolúvel no líquido, geralmente denominado resina trocadora de íons. O mecanismo pelo qual a troca iônica ocorre ainda não é completamente compreendido (KOPACIEWICZ et al., 1983), mas algumas teorias explicam de forma satisfatória o fenômeno em questão.

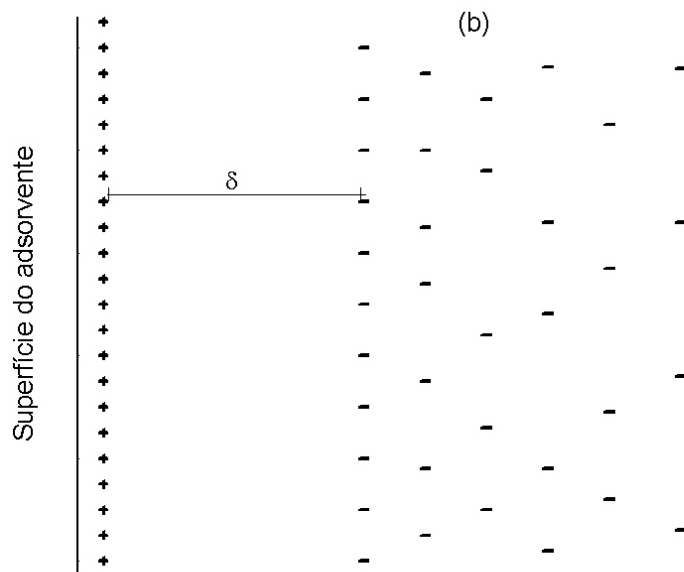
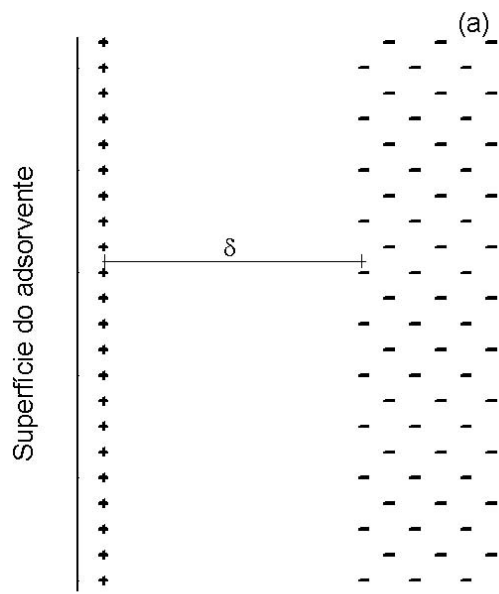
Uma dessas teorias é a teoria da dupla camada elétrica, que se baseia no princípio de que, quando duas fases de constituições químicas diferentes em que existam espécies carregadas estão em contato, uma diferença de potencial entre as fases é estabelecida e uma separação de cargas é observada (KUNIN, 1958; CASTELLAN, 1972; ADAMSON, 1990).

Quando uma das fases é sólida e a outra é uma solução eletrolítica, como na troca iônica, várias são as estruturas possíveis para a dupla camada. Adotando como exemplo didático um trocador aniônico, em que a fase sólida é carregada positivamente e os íons a serem trocados possuem carga negativa (ânions), uma estrutura para a dupla camada considera que todo ânion necessário para neutralizar o potencial elétrico do sólido se disponha em uma única camada situada a uma distância mínima δ da sua superfície, conhecida como dupla-camada de Helmholtz (Figura 1a). Outra estrutura é aquela cuja a camada de ânions é completamente

difusa, diminuindo sua densidade de carga em função da distância da superfície do sólido. A região difusa da camada de ânions é conhecida como camada de Gouy (Figura 1b). E, finalmente para uma situação intermediária às duas anteriores, onde uma parte da camada de ânions seja eletricamente densa e próxima da superfície sólida, e a outra parte seja difusa, tem-se a situação conhecida como a dupla camada de Stern (Figura 1c) (KUNIN, 1958; CASTELLAN, 1972; ADAMSON, 1990). Os mesmos mecanismos são válidos quando o sólido é carregado negativamente e existem cátions em solução.

Na CTI de proteínas, a determinação da espessura da dupla-camada é relevante. Devido ao fato da estrutura de uma proteína ser eletricamente carregada, é de se esperar que ao redor dela também se forme uma dupla camada elétrica. Se essa camada possuir uma densidade de cargas elevada e estiver situada a uma distância muito pequena da estrutura da proteína, a retenção da mesma no adsorvente poderá ser afetada, uma vez que a proteína vai estar neutralizada. No entanto, quando a camada em torno da proteína é difusa o suficiente, a atração eletrostática entre o sólido adsorvente e a proteína permite a aproximação entre eles. Ocorre então uma re-distribuição de íons das duas duplas-camadas (do adsorvente e da proteína), sendo assumida uma alta liberação de íons para a solução, para longe do adsorvente (KOPACIEWICZ, 1983).

Tal processo pode ser subdividido em cinco etapas seqüenciais: (i) desidratação ou deionização da proteína (remoção da dupla camada elétrica); (ii) desidratação ou deionização do adsorvente; (iii) interações eletrostáticas e não-específicas entre proteína e adsorvente; (iv) rearranjo conformacional da proteína após a adsorção e (v) re-distribuição das moléculas de água e contra-íons em solução (LIN et al., 2001).



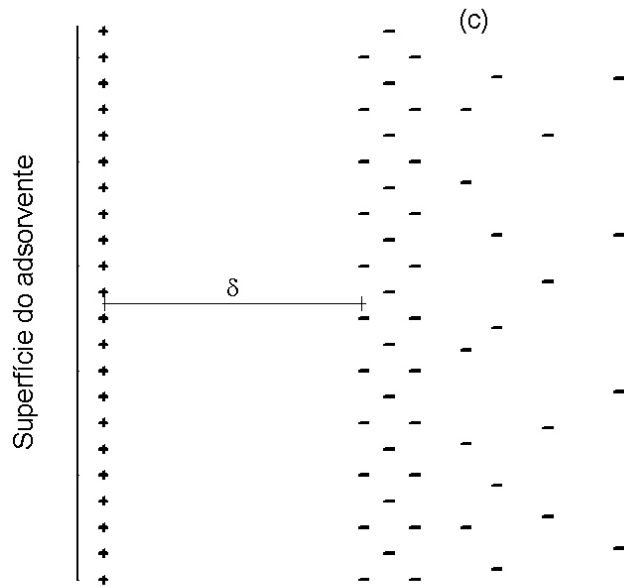


Figura 1: Apresentação didática de diferentes duplas-camadas elétricas em um sistema sólido-líquido modelo, em processos adsorptivos. (a) Helmholtz, (b) Gouy e (c) Stern.

3.2. Equilíbrio na Troca Iônica

A estrutura de um trocador de íons consiste de uma matriz sólida com grupos iônicos carregados (positivos ou negativos) ligados a essa matriz. Íons de cargas opostas, denominados contra-íons, neutralizam essas cargas, mantendo o sistema em equilíbrio. Ao colocar o trocador de íons em contato com uma solução eletrolítica, ocorre uma perturbação do sistema até que um novo equilíbrio seja estabelecido (SAMUELSON, 1963).

A troca iônica ocorre de maneira similar a uma reação estequiométrica. À medida que a concentração de contra-íons sobre a superfície do adsorvente diminui, sua concentração em solução aumenta. Do mesmo modo, a concentração dos íons que estavam em solução é reduzida, à medida que a concentração dos mesmos

aumenta na superfície do adsorvente (GALLANT, 2004). Para um trocador de ânions monovalentes, tal reação é representada por:



Onde I e A são respectivamente, os ânions da solução e da superfície do trocador de íons, que estão sendo trocados. O índice 's' se refere à fase sólida.

No equilíbrio, tem-se que (GUIOCHON et al., 1994):

$$K = \frac{a_{I,s} \cdot a_A}{a_{A,s} \cdot a_I} \quad (2)$$

Onde a_I é a atividade do componente I na fase sólida (s) ou na fase líquida; a_A é a atividade do componente A nas mesmas fases e K é a constante de equilíbrio ou coeficiente de partição.

3.3. Isotermas de adsorção

No projeto de um processo de purificação ou de sua ampliação de escala, é usual o estudo do equilíbrio do soluto entre a solução e o adsorvente usando as isotermas de adsorção. Estas podem ser definidas como a relação no equilíbrio entre a concentração de um composto em solução e na superfície de um sólido adsorvente, ao longo de uma faixa de concentrações de interesse (JACOBSON et al., 1987; GUIOCHON et al., 1994).

Na cromatografia analítica, a concentração dos solutos em solução é geralmente pequena, de modo que um composto não interfere no processo de adsorção do outro. A quantidade dos compostos distribuídos entre as fases líquida e sólida tem uma relação linearmente proporcional, sendo denominada por cromatografia linear. Para esses casos as isotermas de adsorção podem ser obtidas individualmente, sem levar em conta os outros compostos presentes no meio.

Já na cromatografia preparativa, os componentes presentes em solução normalmente estão em concentrações mais elevadas, e a presença de um soluto afeta a adsorção do outro. A quantidade de um determinado soluto adsorvido não é mais função apenas da sua concentração em solução, mas também da concentração dos outros solutos presentes. Neste caso, denomina-se cromatografia não-linear, e as isotermas de adsorção multicomponente ou competitivas devem ser determinadas, considerando-se a presença de todos os solutos interferentes (GUIOCHON et al., 1994).

Freqüentemente, a otimização em processos preparativos é feita a partir das condições usadas na separação analítica, com as concentrações extendidas aos valores desejados (LEVIN e ABU-LAFI, 1991). Essa prática, no entanto, deve ser adotada com cautela, uma vez que, apesar da base teórica ser a mesma para os dois processos, as condições iniciais e de contorno são diferentes para cada um (VELAYUDHAN e HORVÁTH, 1988).

3.3.1. Isoterma Simples ou Monocomponente

Entre os modelos de isotermas de adsorção existentes, o mais utilizado e também um dos mais simples é o modelo de Langmuir (eq. 3), que considera a adsorção em uma monocamada, sem interações soluto-soluto e soluto-solvente, em um adsorvente homogêneo com sítios de adsorção bem definidos (BELLOT e CONDORET, 1993a; GUIOCHON et al., 1994; GRITTI et al., 2003).

$$q = q_s \cdot \frac{bC}{1 + bC} \quad (3)$$

Onde q_s é a capacidade máxima de saturação do adsorvente, b é a constante de equilíbrio de adsorção, q é a quantidade de soluto adsorvido e C é a concentração de soluto em solução.

Outro modelo muito usado é o modelo de Toth, apresentado na equação 4 (TOTH, 1971; GUIOCHON et al., 1994; GRITTI et al., 2003; TERZYK et al., 2003). As considerações para esse modelo são as mesmas que para o modelo de Langmuir, à exceção da homogeneidade do adsorvente, que é avaliada pela inclusão do parâmetro de heterogeneidade n , onde $0 < n < 1$. (TERZYK et al., 2003).

$$q = q_s \frac{b \cdot C}{[1 + (b \cdot C)^n]^{1/n}} \quad (4)$$

Outro modelo que também leva em conta a heterogeneidade da superfície do adsorvente é o modelo de Bi-Langmuir, proposto por GRAHAM (1953). Neste modelo são considerados dois tipos de sítios de adsorção não-cooperativos e independentes, um envolvendo interações fortes e o outro interações fracas (GRAHAM, 1953; BELLOT e CONDORET, 1993a; GUIOCHON et al., 1994).

$$q = q_{s1} \frac{b_1 \cdot C}{1 + b_1 \cdot C} + q_{s2} \frac{b_2 \cdot C}{1 + b_2 \cdot C} \quad (5)$$

onde $q_s = q_{s1} + q_{s2}$, em que q_{s1} é a capacidade máxima de saturação dos sítios de adsorção específicos e q_{s2} é a capacidade máxima de saturação dos sítios não-específicos do adsorvente.

Muitos outros modelos são utilizados, como o modelo de Freundlich (JAMES e DO, 1991; BELLOT e CONDORET, 1993a), o modelo de Jovanovic (HUANG e HORVÁTH, 1987; QUIÑONES e GUIOCHON, 1996a e 1996b), e muitos outros, com graus de complexidade variando de acordo com a rigidez do modelo para explicar o fenômeno de adsorção (GUIOCHON et al., 1994; GRITTI e GUIOCHON, 2004a e 2004b).

3.3.2 Isotermas Competitivas ou Multicomponentes

Modelos para representação do fenômeno de adsorção multicomponente têm sido desenvolvidos ao longo dos anos (JACOBSON et al., 1987; BELLOT e CONDORET, 1993a; QUIÑONES e GUIOCHON, 1996a). Entre os mais utilizados estão o modelo competitivo de Langmuir (JAMES e DO, 1991; BELLOT e CONDORET, 1993a), o modelo competitivo de Bi-Langmuir (JACOBSON et al., 1991; BELLOT e CONDORET, 1993a) e o modelo competitivo de Freundlich-Langmuir (JAMES e DO, 1991).

O modelo clássico de Langmuir pode ser estendido para uma mistura com n -componentes, usando-se as mesmas hipóteses que em sistemas monocomponentes, sendo expresso da seguinte forma:

$$q_i = \frac{q_{s,i} \cdot b_i \cdot C_i}{1 + \sum_{j=1}^n b_j \cdot C_j} \quad (6)$$

Onde $q_{s,i}$ é a capacidade de saturação do i -ésimo componente e b_i é a constante de equilíbrio do i -ésimo componente.

O modelo de Bi-Langmuir também pode ser estendido para um sistema multicomponente. Para um sistema binário, tem-se:

$$q_i = \frac{q_{s1,i} \cdot b_{1,i} \cdot C_i}{1 + b_{1,i} \cdot C_i + b_{1,j} \cdot C_j} + \frac{q_{s2,i} \cdot b_{2,i} \cdot C_i}{1 + b_{2,i} \cdot C_i + b_{2,j} \cdot C_j} \quad (7)$$

Na equação 7, b_1 e b_2 são as constantes de equilíbrio para os diferentes sítios, q_{s1} e q_{s2} são as quantidades máximas de soluto adsorvido em cada tipo de sítio.

Devido à predição inadequada da quantidade de soluto adsorvida pelo modelo de Langmuir em alguns sistemas, outros modelos empíricos, baseados em híbridos de modelos de isotermas monocomponentes, têm sido testados (GUIOCHON et al., 1994). Uma das formulações matemáticas mais simples nessas condições é a de

Freundlich-Langmuir, em que a lei de potência do modelo de Freundlich ($0 < m < 1$) foi introduzida no modelo de Langmuir (JAMES e DO, 1991).

$$q_i = \frac{q_{s,i} \cdot b_i \cdot C_i^{m_i}}{1 + \sum_{j=1}^n b_j \cdot C_j^{m_j}} \quad (8)$$

Assim como em sistemas monocomponentes, para sistemas multicomponentes existem muitos outros modelos de isothermas de adsorção, com diferentes graus de complexidade que descrevem o processo adsorptivo com maior ou menor detalhe (GUIOCHON et al., 1994).

4. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM LARGA ESCALA

O planejamento e operação de sistemas de purificação em larga escala baseados em princípios cromatográficos envolve um grande número de variáveis, que devem ser consideradas para que o processo possa ter uma reprodutibilidade de resultados, garantias dentro de níveis adequados de higiene e manutenção, de modo que a qualidade dos produtos obtidos seja assegurada (DAVIS, 1998).

Nos processos cromatográficos, a fase fluída contendo os componentes a serem purificados deve ser colocada em contato com o adsorvente, para que ocorra a transferência de massa para a fase sólida. Duas maneiras usuais de provocar o contato das fases são o emprego de sistemas descontínuos (batelada), em tanques de mistura, ou de sistemas semi-contínuos, em colunas cromatográficas (KHYM, 1974). Em ambos os métodos, são observadas duas etapas distintas no processo de purificação: a etapa de adsorção ou retenção, e a etapa de dessorção ou eluição (PERRY et al., 1997).

A produção em larga escala deve ser precedida de testes em escalas menores (laboratorial e piloto) para que sejam determinados parâmetros cinéticos e de equilíbrio, além de se verificar a influência de uma série de fatores sobre o processo,

como alterações na temperatura, pH e força iônica da solução, ou o tipo de adsorvente. Assim minimizam-se custos, sendo possível a avaliação da viabilidade do projeto (DAVIS, 1998).

4.1. Operação em Batelada

No método em batelada, o contato entre o adsorvente e a solução é feito sob agitação ou mistura em um tanque com quantidade limitada de solução. Depois de mantido o contato por um intervalo de tempo pré-determinado, o adsorvente é separado da solução por filtração ou centrifugação, sendo feita a avaliação da quantidade de soluto adsorvida. O adsorvente é então lavado e posteriormente misturado com a solução do eluente para a retirada dos compostos adsorvidos (KHYM, 1974; GRANDISON, 1996).

Este modo de operação pode ser conduzido em um único estágio ou em multi-estágios, conhecido como operação em cascata. Devido à dificuldade operacional, o método em cascata não é muito utilizado, sendo mais freqüente o processo em estágio simples nos processos de purificação. O maior uso dos processos em batelada é na determinação de constantes físicas relativas ao processo adsorativo, como nas isotermas de adsorção e coeficientes de transferência de massa (KHYM, 1974).

Apesar da operação em coluna ser de mais fácil operação e controle, o processo em batelada tem sido empregado quando o soluto está presente em meios complexos (sangue, soro de queijo, meio celulares, etc...), onde a presença de sólidos em suspensão pode causar transtornos na operação em colunas, como a obstrução e consequente elevação da pressão na coluna (LEVISON et al. 2000; QUIÑONES-GARCIA et al., 2001). Com o processo em batelada, esse problema é evitado, porém a agitação mecânica pode levar à fragmentação do adsorvente, reduzindo a eficiência do processo (GRANDISON, 1996).

4.2. Operação em Colunas

O processo de cromatografia em coluna é composto por de uma série de quatro passos básicos realizados de maneira cíclica: adsorção, lavagem, eluição e regeneração. A alimentação com o soluto-alvo percorre o leito da coluna, até que ocorra a saturação do mesmo. O processo é então interrompido, procedendo-se a etapa de lavagem, para retirada de material não adsorvido de dentro da coluna. Segue-se então a eluição para a retirada do material adsorvido e finalmente a regeneração da coluna para o início de um novo ciclo de trabalho (KHYM, 1974; DAVIS, 1998).

No início da etapa de adsorção, quando a coluna ainda está isenta do soluto, ao passar a solução através do leito, a concentração de soluto na fase fluida cai rapidamente com a distância percorrida dentro do leito até chegar a zero, antes do final do mesmo. Depois de um curto período, a concentração do sólido próximo à entrada está próxima do valor da concentração de saturação, e a maior parte da transferência de massa passa a ocorrer em uma região no interior do leito. O mesmo raciocínio é válido ao longo de todo o leito, que vai se saturando por completo, ao final de um certo tempo (GEANKOPLIS, 1993).

Quando a coluna está saturada, a alimentação é interrompida, sendo feita então uma lavagem da mesma para a retirada de solutos não-adsorvidos. Esta operação visa a retirada de compostos interferentes ou não-desejados na etapa de eluição, elevando a grau de pureza obtido nesta etapa.

A etapa de eluição é realizada de maneira isocrática ou em gradiente, sendo o modo isocrático usualmente escolhido em operações em larga-escala por apresentar menor complexidade e custo operacional (DAVIS, 1998). Em colunas de troca iônica, ao se purificar proteínas, a eluição é realizada utilizando-se um eluente com

elevada força iônica, que devido à alta densidade de cargas desloca a proteína para a fase fluída, ou então com um eluente com um pH diferente, alterando a carga líquida da proteína, promovendo sua dessorção e conseqüente saída da coluna (GRANDISON, 1996).

A etapa de regeneração pode ser realizada simultaneamente à eluição ou não. Quando o eluente prepara o adsorvente para um novo ciclo do processo, não existe a necessidade de regeneração. No entanto, na maioria dos casos as condições de adsorção e eluição são opostas, sendo necessária a utilização de uma solução-tampão para a regeneração. Essa solução re-equilibra a coluna e seus sítios de adsorção, tornando-os prontamente aptos à troca dos íons, de modo que as condições iniciais sejam re-estabelecidas e o processo possa ser re-iniciado (GRANDISON, 1996, DAVIS, 1998).

Periodicamente, além das etapas regulares ao ciclo produtivo, é necessário que se faça uma limpeza da coluna e do sistema, para evitar a contaminação na eluição ou perdas na eficiência e reprodutibilidade do processo. Esse processo é denominado de limpeza CIP (do inglês *clean in place*), em que soluções com valores extremos de pH (ácido e alcalino) são utilizadas para a remoção de qualquer tipo de resíduo existente dentro da coluna, sendo realizada inclusive com fluxo em sentido oposto às etapas de produção (DAVIS, 1998).

4.3. Variáveis de Processo na Cromatografia de Troca Iônica

4.3.1. Temperatura

Antes considerada sem importância, a influência da temperatura no equilíbrio de troca iônica tem despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores. O efeito da temperatura é um fenômeno complexo, que pode afetar tanto as propriedades

físico-químicas do adsorvente, como as constantes de dissociação de eletrólitos, quanto as propriedades do soluto, como mudanças conformacionais em proteínas (MIHELICĀ et al., 2003).

A influência da temperatura no processo de adsorção de pequenos compostos inorgânicos e aminoácidos tem sido amplamente estudada, enquanto que os estudos com compostos de alta massa molar, em particular de proteínas, não tem sido extensivamente investigado (FANG et al., 1996).

Em alguns casos, a elevação na temperatura aumenta a capacidade adsortiva do leito (MIHELICĀ et al., 2003), enquanto que em outros, ocorre o inverso (HUANG et al., 1990). Tais diferenças ainda não são bem compreendidas, mas sabe-se que quando o processo de adsorção é exotérmico, o fenômeno é entálpicamente dirigido e a capacidade adsortiva da resina aumenta com a elevação da temperatura. Já para o processo de adsorção endotérmico, a contribuição entrópica é maior, ocorrendo o comportamento inverso (FANG et al., 1996; MIHELICĀ et al., 2003).

Estudos demonstram que a mudança na temperatura de trabalho influencia na conformação das proteínas e na liberação de contra-íons e água das superfícies do adsorvente e da proteína (MIHELICĀ et al., 2003), podendo assim ser usada no ajuste da resolução cromatográfica na eluição de proteínas (FANG et al., 1996).

Sabendo-se que elevadas temperaturas levam à desnaturação e precipitação de proteínas (FANG et al., 1996), o que se busca em um processo de purificação de proteínas é otimizar a temperatura de trabalho, aumentando a capacidade adsortiva da coluna com o mínimo de desnaturação protéica possível.

4.3.2. Tipo e Concentração de Sal

É conhecido que o tipo de sal pode afetar o processo de troca iônica de várias maneiras. HEARN et al. (1991) verificaram para diferentes ânions monovalentes (Cl⁻

e Br⁻) que o raio iônico e a eletronegatividade influenciam o comportamento da adsorção de proteínas em trocadores aniônicos.

FANG et al. (1996) avaliaram o efeito da valência de cátions (Na⁺ e Ca⁺⁺), usados como contra-íons na troca catiônica de proteínas, observando maiores valores de coeficientes de atividade quando foi utilizado Na⁺ como contra-íon, enquanto que o emprego de Ca⁺⁺ permitiu a eluição de proteínas em temperaturas mais elevadas.

Quanto à concentração de sal em solução, na cromatografia de troca iônica quanto maior a concentração de sal, menor a capacidade adsortiva da resina (HUANG et al., 1990; FANG et al., 1996) indicando que a principal força envolvida no processo de troca iônica é a atração eletrostática (LIN et al., 2001).

LIN et al. (2001) relataram ainda que no processo de adsorção das variantes A e B da β-lactoglobulina em resina Q-Sepharose, a elevação da força iônica da solução tornou o processo de troca iônica menos exotérmico, aumentando a contribuição entrópica do processo. Tal elevação, no entanto, não foi suficiente para diminuir a energia livre de Gibbs (ΔG), cujo valor aumentado comprovou que o processo estava se tornando menos favorável.

4.3.3. pH

Alguns estudos sobre o efeito do pH no processo de troca iônica de proteínas têm sido relatados ao longo dos últimos anos (HUANG et al., 1990; LIN et al., 2001).

Os resultados encontrados não são concludentes sobre a influência do pH no processo de troca iônica. HUANG et al. (1990) verificaram que a elevação do valor de pH de 7,6 para 9,6 aumentou a capacidade de adsorção de conalbumina em um trocador aniônico. Já na adsorção de albumina de ovo, verificou-se uma maior capacidade adsortiva em pH 8,6 do que em pH 9,6 utilizando-se a mesma resina,

apesar de ambas possuírem carga líquida negativa nessa faixa de pH (KOPACIEWICZ et al., 1983).

LIN et al. (2001) verificaram, através da variação no pH, que forças não-iônicas, como a interação hidrofóbica, também atuam no processo de troca iônica. Esses autores observaram que a adsorção de β -lactoglobulina em uma resina aniônica ocorria de maneira espontânea ($\Delta G < 0$) mesmo quando a carga líquida da proteína era positiva ($pH < pI$).

A influência do pH no processo de troca iônica de proteínas está associada ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, e conseqüentemente à sua carga líquida em diferentes valores de pH. Quanto mais distante do pI , maior é a carga líquida da proteína e maior poderá ser a interação entre ela e o adsorvente (KOPACIEWICZ et al., 1983). No entanto, condições extremas de pH podem levar a alterações conformacionais e perda de atividades específicas, como no caso de enzimas. Tais alterações conformacionais podem levar a um aumento na hidrofobicidade da proteína, reduzindo sua interação com o trocador iônico. Deve-se buscar, portanto, o melhor valor de pH para que seja obtida a máxima quantidade adsorvida com um mínimo de mudanças conformacionais e de perda de atividades.

4.3.4. Natureza da Proteína

A natureza da proteína é outro fator que afeta o processo adsortivo. Dependendo da composição de aminoácidos, a proteína poderá ter um variado número de grupos carregados, levando a diferentes valores de pI e arranjos espaciais, em função de sua estrutura primária, secundária, terciária e quaternária (KOPACIEWICZ et al., 1983).

SKIDMORE e CHASE (1990) analisando a adsorção de Albumina de Soro Bovino (BSA) e Lisozima (LIS) em uma resina catiônica verificaram que além da

diferença de carga líquida entre as proteínas, a diferença na massa molar também influenciou o processo adsorptivo. A LIS (MM ~14 kDa) apresentou maior capacidade de adsorção que a BSA (MM ~69 kDa) em condições mono e multi-componentes, dentre outros motivos, por ter maior facilidade em penetrar nos poros do adsorvente.

KOPACIEWICZ et al. (1983) avaliando a retenção de diferentes proteínas em adsorventes catiônicos e aniônicos ao longo de um grande faixa de pH observaram que além da carga líquida das proteínas, a distribuição das cargas em seu interior e na superfície contribui para a orientação espacial da proteína ao ser adsorvida.

4.3.5. Natureza do Adsorvente

Como regra geral, para a retenção de proteínas em condições de pH acima do pI (com carga líquida negativa) utilizam-se trocadores aniônicos (com grupos fixos positivos), enquanto que para condições abaixo do seu pI utilizam-se trocadores catiônicos (KOPACIEWICZ et al., 1983; GRANDISON, 1996). No entanto, outras características dos adsorventes podem exercer influência no processo de troca iônica.

ANSPACH et al. (1990) observaram para a adsorção de lisozima em leito fixo de adsorventes com base rígida de sílica e base 'macia' de géis poliméricos melhores resultados para os adsorventes com base de sílica que os de base polimérica. Enquanto os primeiros mantinham sua estrutura intacta ao longo do tempo de operação, os adsorventes poliméricos apresentaram deformações em sua estrutura, causando um excesso de compactação da coluna e impedimento estérico para a entrada da proteína nos poros da resina.

FANG et al. (1996) verificaram diferenças no mecanismo de adsorção de proteínas em adsorventes do tipo 'tentáculo' (com poros de grande diâmetro nominal) e em adsorventes tradicionais microporosos, principalmente na morfologia

dos ligantes e acessibilidade aos sítios de adsorção. Os autores submeteram os adsorventes às mesmas condições de trabalho com diferentes proteínas, observando as alterações no comportamento de cada uma.

4.3.6. Recirculação

O volume de produção ao se utilizar processos cromatográficos é em geral muito baixo, o que o torna muito oneroso, devendo a otimização ser feita com muito cuidado para obtenção da minimização dos custos operacionais. Algumas modificações à eluição convencional têm sido propostas, e uma das mais promissoras é a recirculação do efluente da coluna na etapa de eluição (ou eluato) (CHARTON et al., 1994).

Nesta modificação, frações do eluato em que a completa separação de dois ou mais compostos não tenha ocorrido são re-introduzidos na coluna, para ocorra a separação dos mesmos. Esta técnica simples é economicamente atrativa, porque diminui custos com soluções eluentes e pode reduzir o número de colunas cromatográficas em operação; no entanto, demanda um maior tempo de processo (CHARTON et al., 1994). Dessa maneira, deve-se buscar o equilíbrio entre a minimização de custos e aumento no tempo de processamento, bem como as necessidades de purificação no processo e se os compostos a serem purificados podem ser submetidos a tal procedimento.

5. APLICAÇÕES

A troca iônica tem sido amplamente usada em muitos processos de purificação de proteínas nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Graças a natureza anfótera das proteínas, resinas catiônicas ou aniônicas podem ser utilizadas,

dependendo das condições de pH do meio em que a proteína se encontra (GRANDISON, 1996).

Provavelmente, uma das fontes de proteínas mais utilizada atualmente em processos de purificação em larga escala é o soro de queijo, um líquido de cor amarelo-esverdeado claro com cerca de 0,7 % de proteínas, separado da massa de caseína coagulada durante a fabricação de queijo (GERBERDING e BYERS, 1998).

HAHN et al. (1998) estudaram o fracionamento de imunoglobulinas, lactoferrina e lactoperoxidase do soro de queijo bovino utilizando diferentes resinas catiônicas, e chegaram à conclusão que as resinas testadas podem ser utilizadas em larga escala, devendo-se buscar a melhor relação entre a capacidade de adsorção das proteínas e a resolução na separação dos componentes na eluição.

GERBERDING e BYERS (1998) também propuseram um processo para o fracionamento das proteínas do soro, utilizando resinas de troca catiônica e aniônica, obtendo frações purificadas de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina com graus de pureza respectivamente iguais a 98,9 % e 86,8 %.

Outra proteína de origem animal de grande utilidade industrial é o colágeno, cujos processos de separação dos mais de 25 tipos foi extensivamente discutido por DEYL et al. (2003). Utilizando cromatografia de troca iônica, bioafinidade e precipitação, em combinação com outras técnicas de purificação, como a hidrólise ácida e enzimática e centrifugação, os autores relataram a separação de diferentes colágenos com alto grau de pureza.

LEVISON et al. (2000) estudaram em escala piloto a purificação de albumina de ovo presente em 500 L de uma solução diluída de clara de ovo utilizando uma coluna com 16,25 kg de um trocador aniônico. A solução de alimentação possuía uma concentração total de proteínas igual a $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo a albumina responsável

por 63,8 % desse total. Após a purificação em um único estágio de adsorção e eluição, a fração recuperada continha cerca de 45 % de toda a proteína presente na alimentação, composta basicamente de albumina, com traços de ovoglobulina e ovomucóide.

Enzimas de origem microbiana também podem ser purificadas por troca iônica. Um exemplo é a xilanase, enzima utilizada para hidrolisar a xilana da parede celular vegetal, que tem sido usada no branqueamento em indústrias de polpa de celulose e papel, em substituição aos compostos organo-clorados. SANTOS et al. (2002) estudaram o processo de purificação da xilanase produzida por culturas de *Bacillus pumilus* utilizando um trocador catiônico forte. A eluição do material adsorvido foi realizada em modo gradiente, conseguindo-se obter dois picos independentes com alta resolução. No primeiro pico, a xilanase recuperada era trinta vezes mais pura que na alimentação, com cerca de 22 % da atividade enzimática inicial, enquanto que no segundo pico foi recuperada cerca de 67 % da atividade da enzima, com um fator de purificação de cinco vezes.

Metabólitos humanos sintetizados em microrganismos com DNA recombinante também podem ser purificados através da cromatografia de troca iônica. KNUDSEN et al. (2001) avaliaram a purificação de anticorpos monoclonais recombinantes e chegaram a conclusão de que a troca catiônica não é economicamente viável, ao passo que a troca aniônica pode ser uma opção para remover impurezas. Já RIBELA et al. (2003) testando a utilização de diferentes técnicas cromatográficas (troca iônica, interação hidrofóbica e afinidade) na purificação de hormônios recombinantes da pituitária humana relataram a recuperação de cerca de 50 % da quantidade presente na alimentação, com um grau de pureza superior a 95 %.

Proteínas das mais diversas origens podem ser purificadas por meio da troca iônica em pelo menos uma etapa do processo (GRANDISON, 1996). Aqui foram apresentados apenas alguns dos vários exemplos das aplicações dessa técnica. Cabe ao pesquisador ou ao engenheiro de processos adequar a técnica à sua necessidade, verificando qual o melhor tipo de adsorvente a ser usado, quais as condições operacionais e também a viabilidade técnica e econômica do processo em questão.

6. CONCLUSÃO

Foram abordados neste trabalho os princípios da cromatografia de troca iônica e sua utilização na purificação de proteínas, em seus conceitos básicos, desde a estrutura da proteína e equilíbrio químico, até o princípio da troca iônica, bem como diversos fatores que podem influenciar este processo. Foram apresentados exemplos nas mais diversas áreas evidenciando assim a importância dessa técnica e que a cada dia tem se desenvolvido mais.

7. SIMBOLOGIA

a_A	atividade do componente A na fase líquida
$a_{A,s}$	atividade do componente A na fase sólida
a_I	atividade do componente I na fase líquida
$a_{I,s}$	atividade do componente I na fase sólida
A_s	ânions que originalmente estavam na superfície do adsorvente
b	constante de equilíbrio ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
b_1	constante de equilíbrio nos sítios de adsorção específicos ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
b_2	constante de equilíbrio nos sítios de adsorção não-específicos ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
C	concentração na fase móvel ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
I	ânions que originalmente estavam em solução
K	coeficiente de partição
n	parâmetro de heterogeneidade do modelo de Toth
q	quantidade de soluto adsorvida ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
q_s	quantidade máxima de soluto adsorvida ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
q_{s1}	quantidade máxima de soluto adsorvida nos sítios específicos ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
q_{s2}	quantidade máxima de soluto adsorvida nos sítios não-específicos ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

8. REFERÊNCIAS

ADAMSON, A. W. *Physical chemistry of surfaces*. 5th edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 777p., 1990.

ANSPACH, F. B.; JOHNSTON, A.; WIRTH, H. J.; UNGER, K. K.; HEARN, M. T. W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins – XCV^a Thermodynamic and kinetic investigations on rigid and soft affinity gels with varying particle and pore sizes: comparison of thermodynamic parameters and the adsorption behaviour of proteinsevaluated from bath and frontal analysis experiments. *Journal of Chromatography*, v. 499, p. 103-124, 1990.

BELLOT, J. C.; CONDORET, J. S. Modelling of liquid chromatography equilibria. *Process Biochemistry*, v. 28, p. 365-376, 1993.

BELLOT, J. C.; CONDORET, J. S. Theoretical study of the ion-exchange preparative chromatography of a two-protein mixture. *Journal of Chromatography*, v. 635, p. 1-17, 1993.

BOYSEN, R. I.; WANG, Y.; KEAH, H. H.; HEARN, M. T. W. Observations on the origin of the non-linear van't Hoff behaviour of polypeptides in hydrophobic environments. *Biophysical Chemistry*, v. 77, p. 79-97, 1999.

BOWEN, W. R.; HUGHES D. T. Ion exchange of proteins: a microcalorimetric study of the adsorption of bovine serum albumin on anion-exchange materials. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 158, p. 395-402, 1993.

CASTELLAN, G. W. *Físico-química*. v.1, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 489p., 1972.

CHARTON, F.; BAILLY, M.; GUIOCHON, G. Recycling in preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 687, p. 13-31, 1994.

DAMODARAN, S. Food proteins: an overview – chapter 1. *In*: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (editors) *Food proteins and their applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 1-24, 1997.

DAVIS, C. J. A. Large-scale chromatography: design and operation – chapter 6. *In*: SUBRAMANIAN, G. (editor) *Bioseparation and bioprocessing*, v.1. Wiley-VCH, Weinheim, p. 125-143, 1998.

DEYL, Z.; MIKŠÍK, I.; ECKHARDT, A. Preparative procedures and purity assessment of collagen proteins. *Journal of Chromatography B*, v. 790, p. 245-275, 2003.

FANG, F.; AGUILAR, M. I.; HEARN, M. T. W. Influence of temperature on the behaviour of proteins in cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 729, p. 49-66, 1996.

GALLANT, S. R. Modeling ion-exchange adsorption of proteins in a spherical particle. *Journal of Chromatography A*, v. 1028, p. 189-195, 2004.

GEANKOPLIS, C. J. *Transport processes and unit operations*, 3rd edition, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 921p., 1993.

GERBERDING, S. J.; BYERS, C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *Journal of Chromatography A*, v. 808, p. 141-151, 1998.

GRAHAM, D. The characterization of physical adsorption systems. I. The equilibrium function and standard free energy of adsorption. *Journal of Physical Chemistry*, v. 57, p. 665-669, 1953.

GRANDISON, A. S. Ion-exchange and electro dialysis – chapter 6. In: GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. (editors) *Separation process in the food and biotechnology industries*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, p. 153-176, 1996.

GRITTI, F.; GOTMAR, G.; STANLEY, B. J.; GUIOCHON, G. Determination of single component isotherms and affinity energy distribution by chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 988, p. 185-203, 2003.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Effect of the mobile phase composition on the isotherm parameters and the high concentration band profiles in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 995, p. 37-54, 2003.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Heterogeneity of the surface energy on unused C18-Chromolith adsorbents in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1028, p. 105-119, 2004.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Influence of a buffered solution on the adsorption isotherm and overloaded band profiles of an ionizable compound. *Journal of Chromatography A*, v. 1028, p. 197-210, 2004.

GUIOCHON, G. Preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 965, p. 129-161, 2002.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. Academic Press, New York, 700p., 1994.

HAHN, R.; SCHULZ, P. M.; SCHAUPP, C.; JUNGBAUER, A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 795, p. 277-287, 1998.

HEARN, M. T. W.; HODDER, A. N.; FANG, F. W.; AGUILAR, M. I. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins – CXI^a Retention behaviour of proteins with macroporous tentacle-type anion-exchangers. *Journal of Chromatography*, v. 548, p. 117-126, 1991.

HUANG, J.; HORVÁTH, C. Adsorption isotherms on high-performance liquid chromatographic sorbents – I. Peptides and nucleic acid constituents on octadecyl-silica. *Journal of Chromatography*, v. 406, p. 275-284, 1987.

HUANG, J.; SCHUDEL, J.; GUIOCHON, G. Adsorption behaviour of albumin and conalbumin on TSK-DEAE 5PW anion exchanger. *Journal of Chromatography*, v. 504, p. 335-349, 1990.

JACOBSON, J.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C. Measurement of competitive adsorption isotherms by frontal chromatography. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 26, p. 43-50, 1987.

JACOBSON, S.; GOLSHAN-SHIRAZI, S.; GUIOCHON, G. Isotherm selection for band profile simulations in preparative chromatography. *AIChE Journal*, v. 37, n. 6, p. 836-844, 1991.

JAMES, E. A.; DO, D. D. Equilibria of biomolecules on ion-exchange adsorbents. *Journal of Chromatography*, v. 542, p. 19-28, 1991.

KHYM, J. X. *Analytical ion-exchange procedures in chemistry and biology: theory, equipment, techniques*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 257p., 1974.

KNUDSEN, H. L.; FAHRNER, R. L.; XU, Y.; NORLING, L. A.; BLANK, G. S. Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification. *Journal of Chromatography A*, v. 907, p. 145-154, 2001.

KOPACIEWICZ, W.; ROUNDS, M. A.; FAUSNAUGH, J.; REGNIER, F. E. Retention model for high-performance ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 266, p. 3-21, 1983.

KUNIN, R. *Ion exchange resins*. 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 466p., 1958.

LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. 2^a edição, Ed. Sarvier, São Paulo, 839p., 1995.

LEVIN, S.; ABU-LAFI, S. Adsorption isotherms of phenylalanine in a chromatographic column measured simultaneously by system peaks analysis and frontal analysis. *Journal of Chromatography*, v. 556, p. 277-285, 1991.

LEVISON, P. R.; HOPKINS, A. K.; HATHI, P.; BADGER, S. E.; MANN, F.; DICKSON, N.; PURDOM, G. Suspended bed chromatography, a new approach in downstream processing. *Journal of Chromatography A*, v. 890, p. 45-51, 2000.

LIN, F. Y.; CHEN, C. S.; CHEN, W. Y.; YAMAMOTO, S. Microcalorimetric studies of interaction mechanisms between proteins and Q-Sepharose at pH near the isoelectric point (pI) – effects of NaCl concentration, pH value and temperature. *Journal of Chromatography A*, v. 912, p. 281-289, 2001.

MIHELIČ, I.; PODGORNIK, A.; KOLOINI T. Temperature influence on the dynamic binding capacity of a monolithic ion-exchange column. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 159-168, 2003.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W.; MALONEY, J. O. *Perry's chemical engineers' handbook*, 7th edition, McGraw-Hill, New York, 1997.

QUIÑONES-GARCIA, I.; RAYNER, I.; LEVISON, P. R.; DICKSON, N.; PURDOM, G. Performance comparison of suspended bed and batch contactor chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 908, p. 169-178, 2001.

QUIÑONES, I.; GUIOCHON, G. Application of different isotherm models to the description of single-component and competitive adsorption data. *Journal of Chromatography A*, v. 734, p. 83-96, 1996.

QUIÑONES, I.; GUIOCHON, G. Derivation and application of a Jovanovic-Freundlich isotherm model for single-component adsorption on heterogeneous surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 183, p. 57-67, 1996.

RIBELA, M. T. C. P.; GOUT, P. W.; BARTOLINI, P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. *Journal of Chromatography B*, v. 790, p. 285-316, 2003.

SAMUELSON, O. *Ion exchange separations in analytical chemistry*. John Willey & Sons Inc., New York, 474p., 1963.

SANTOS, E. S.; GUIRARDELLO, R.; FRANCO, T. T. Preparative chromatography of xylanase using expanded bed adsorption. *Journal of Chromatography A*, v. 944, p. 217-224, 2002.

SKIDMORE, G. L.; CHASE, H. A. Two-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose[®] FF. *Journal of Chromatography*, v. 505, p. 329-347, 1990.

TERZYK, A.; CHATŁAS, J.; GAUDEN, P. A.; RYCHLICKI, G.; KOWALCZYK, P. Developing the solution of the Toth adsorption isotherm equation. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 266, p. 473-476, 2003.

TOTH, J. State equations of the solid-gas interface layers. *Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae*, v. 69, p. 311-328, 1971.

VELAYUDHAN, A.; HORVÁTH, C. Adsorption and ion-exchange isotherms in preparative chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 663, p. 1-10, 1994.

VELAYUDHAN, A.; HORVÁTH, C. Preparative chromatography of proteins – analysis of the multivalent ion-exchange formalism. *Journal of Chromatography*, v. 443, p. 13-29, 1988.

ARTIGO 02

SINGLE COMPONENT ISOTHERMS AND THERMODYNAMIC ANALYSIS OF α -LACTALBUMIN AND β -LACTOGLOBULIN ADSORPTION ON ION EXCHANGER SORBENT

Abstract

Adsorption behavior of two whey proteins, α -lactalbumin (α -la) and β -lactoglobulin (β -lg), were studied on an ion-exchange resin, Streamline[®] Q XL, at four different temperatures. It was observed for β -lg the adsorptive capacity increase with higher temperatures while for α -la the capacity decreases. Five isotherm models were tested, with Langmuir, Toth and Jovanovic models presenting the best fits. Thermodynamic analysis based on non-linear van't Hoff equation shows an endothermic process entropically driven that occurs spontaneously ($\Delta G_{ad}^0 < 0$) increasing the temperature. To α -la the process tends to be less endothermic and to β -lg tends to be more endothermic with elevation of temperature. Possibly stronger changes on β -lg structure raise its hydrophilic affinity increasing its adsorbed amount.

Key-words: adsorption isotherms, ion exchange, whey proteins, enthalpy, entropy, Gibbs free energy.

1. INTRODUCTION

Studies on preparative purification of macromolecules, such as the proteins, still today is a great challenge for the researchers. Among the known techniques, liquid chromatography is one of the most popular technique used in separation and

purification of proteins. It has been used thoroughly in several fields of the biotechnology due to the possibility of isolation of compounds without losses of its biological activity, being worked with equipments in non-aggressive conditions (SHIOSAKI et al., 1994). The interest for chromatographic processes grew up a lot in the last decade, because of the growth of the biotechnological industry and the needs of high specificity and efficiency of the methods of separation by chemical and pharmaceutical industries (GERBERDING and BYERS, 1998; GRITTI et al., 2003).

Many kinds of chromatographic techniques are used industrially for the separation and purification of multicomponents mixtures, such as processes based on the molecular exclusion, ionic exchange or affinity chromatographic (GERBERDING and BYERS, 1998). The ion-exchange chromatography (IEC) is one of main used in the recovery and purification of biomolecules (JAMES and DO, 1991), usually in the initial stages of the most.

The basic mechanism of the ion-exchange can be explained by a couple-exchange reaction among counter ions that neutralize linked groups to an insoluble support and ions or charged groups presents in a solution (HELFFERICH, 1962).

Many factors can influence the process of ion-exchange of macromolecules, such as the pH, ionic strength of the solution and temperature. HUANG et al. (1990) evaluated the influence of these parameters in the albumin and conalbumin adsorption in the resin TSK-DEAE 5PW, a weak anionic exchanger, and concluded that the ionic strength and the pH of the solution had a higher influence on the process than the temperature.

Other factors are also involved once the ion-exchange process is not controlled by the interactions among opposite charges only. In case of macromolecules, the main factors are the structure of the compound, its chemical

surface, the magnitude and signal of the present charges and the degree of hydration of the macromolecule. Therefore, is important to a deep knowledge about the variations of energy (enthalpy and entropy) involved in this process (BOWEN and HUGHES, 1993), due to equilibrium between liquid and solid phases be the most important factor that influence the adsorptive process (PERRY et al., 1997).

In the present work, equilibrium data of ion-exchange of two whey proteins, α -lactalbumin and β -lactoglobulin, and an anionic adsorbent at different temperatures were obtained. Five isotherm models were tested to adjust to data, besides the determination of thermodynamic parameters relationship with the adsorptive process.

2. THEORY

2.1. Determination of single-component adsorption isotherms

There are many chromatographic methods existent to determination of the adsorption isotherms (the frontal analysis method, FA, the front analysis by characteristic points method, FACP, the elution by characteristic points method, ECP, the method of pulses, MP, and the static method, SM) (GUIOCHON et al., 1994; GRITTI et al., 2003). In this work, we adopted the FA method, one of the slowest but also the more accurate of the known methods.

This method consists in modify successfully the inlet solute concentration in the column in steps, being determined the breakthrough curves formed. The area between the point in that solute concentration was modified and the inflection point of the breakthrough curve formed gives the value of the amount of adsorbed solute in this stage, using the following equation (GUIOCHON et al., 1994).

$$q_{i+1} = q_i + \frac{(C_{i+1} - C_i)(V_{F,i+1} - V_0)}{V_a} \quad (1)$$

where q_{i+1} and q_i are the amounts of adsorbed component on the column packed after the $(i+1)^{\text{th}}$ and i^{th} steps, C_{i+1} and C_i are the concentration of compound in solution in the same steps, $V_{F,i+1}$ is the retention volume between the inflection points of the i^{th} and $(i+1)^{\text{th}}$ breakthrough curves, V_0 is void volume of the system and V_a is volume of adsorbent in the column.

2.2. Single-component isotherm models

a. Freundlich model

This model was proposed by Boedeker in 1885 to describe the adsorption of polar compounds on polar adsorbents, and has been popularized by Freundlich (GUIOCHON et al., 1994). Is an empirical model that is not thermodynamically consistent due to the fact that the amount adsorbed in the process increase indefinitely with the elevation in concentration (JAMES and DO, 1991), being restricted to a limited range of concentrations depending of the solute and adsorbent (BELLOT and CONDORET, 1993). Is given by:

$$q = a \cdot C^{1/n} \quad (2)$$

where a and n ($n > 1$) are constants at a given temperature.

b. Langmuir model

The simplest theoretical model used to describe single-component adsorption processes is the Langmuir model, is given by equation 3 (BELLOT and CONDORET, 1993). The model assumes an ideal adsorption condition in monolayer coverage, without solute - solute and solute – solvent interactions (GUIOCHON et al., 1994).

$$q = q_s \cdot \frac{bC}{1+bC} \quad (3)$$

where q_s is the monolayer saturation capacity of the adsorbent and b is the equilibrium constant of adsorption. This model still assumes that the adsorbent is homogeneous and that the adsorption is specific (GRITTI et al., 2003).

c. Bi-Langmuir model

Considering the heterogeneity of an adsorptive surface, the simplest model used is the Bi-Langmuir model (GRAHAM, 1953; BELLOT and CONDORET, 1993 and GUIOCHON et al., 1994). It was first suggested by GRAHAM (1953) that considers the existence of two kinds of different adsorption sites, non-cooperatives and independents in adsorbent surfaces. One kind of the sites involved stronger interactions and the other involved weaker interactions.

The effects of these kinds of sites can be observed when the surface coverage (q/q_s) is high (usually greater than 0.5) and the ideality of the system is lost (GRAHAM, 1953). The Bi-Langmuir model is given by:

$$q = q_s \left(\frac{\alpha \cdot b_1 \cdot C}{1 + b_1 \cdot C} + \frac{(1 - \alpha)b_2 \cdot C}{1 + b_2 \cdot C} \right) = q_{s1} \frac{b_1 \cdot C}{1 + b_1 \cdot C} + q_{s2} \frac{b_2 \cdot C}{1 + b_2 \cdot C} \quad (4)$$

$$\text{where } q_s = q_{s1} + q_{s2} \quad (5)$$

In equation (4), α is the fraction of total sites occupied by stronger sites, b_1 and b_2 are equilibrium constants for stronger sites and weaker sites, respectively (GRAHAM, 1953), and q_{s1} and q_{s2} are the amount of solute adsorbed in the stronger sites and weaker sites, respectively (GRITTI et al., 2003).

d. Toth model

Like Langmuir' isotherm model, the Toth model originally derive for the study of gas-solid equilibrium and can be easily extended to liquid-solid equilibrium (GUIOCHON et al., 1994). The model is given by (GRITTI et al., 2003):

$$q = q_s \frac{b \cdot C}{[1 + (b \cdot C)^n]^{\frac{1}{n}}} \quad (6)$$

where q_s and b have the same meaning as in the Langmuir isotherm and n is the heterogeneity parameter ($0 < n < 1$). If n deviates further away from unity, the system is said to be more heterogeneous (TOTH, 1971; TERZYK et al., 2003). The parameters b and n in this model permit the independent adjustment of the initial slope and curvature of the isotherm (GUIOCHON et al., 1994).

e. Jovanovic model

This isotherm model was derived for an adsorption on a homogeneous solid surface, considering the phenomenon non-specific, without lateral interactions and covering the surface with a monolayer of solute (QUIÑONES and GUIOCHON, 1996a). The model to a single-component can be written as (HUANG and HORVÁTH, 1987; QUIÑONES and GUIOCHON, 1996a and 1996b):

$$q = q_s [1 - \exp(-b \cdot C)] \quad (7)$$

where q_s is the surface concentration at saturation and b is the appropriate binding constant.

2.3. Thermodynamic analysis

A general procedure to determine thermodynamics parameters as enthalpy and entropy involves a relation between the capacity factor, k' , and temperature, known as van't Hoff relation (BOYSEN et al., 1999; ESQUIBEL-KING et al., 1999; GRUSHKA et al. 1982). This relation is given by:

$$\ln k' = -\frac{\Delta H_{ad}^0}{RT} + \frac{\Delta S_{ad}^0}{R} + \phi \quad (8)$$

where k' is the capacity factor, ΔH_{ad}^0 and ΔS_{ad}^0 are respectively the standard changes in enthalpy and entropy of adsorption, and ϕ is a system constant depending on the phase ratio.

A plot of $\ln k'$ versus $1/T$ gives a linear relationship, which the enthalpy can be determined by the angular coefficient and the entropy can be obtained by the linear coefficient. However, this parameters are mean values in the range of temperature studied, generating few information about those parameters at a specific temperature.

ESQUIBEL-KING et al. (1999) observed a non-linear comportment in van't Hoff analysis in experiments with hydrophobic interaction chromatography (HIC) of bovine serum albumin (BSA). BOYSEN et al. (1999) relates that when enthalpy and entropy are dependent on temperature, the plots of $\log k'$ vs. $1/T$ wasn't follow a linear relationship. Then this relation can be approximated by a polynomial expression, represented by:

$$\ln k' = a + \frac{b}{T} + \frac{c}{T^2} + \ln \phi \quad (9)$$

where a , b and c are empirical parameters and ϕ is the phase ratio of the used bed.

The enthalpy of adsorption is obtained from angular coefficient of eq. (8) as observed below:

$$\frac{\partial \ln k'}{\partial (1/T)} = -\frac{\Delta H_{ad}^0}{R} \Rightarrow \Delta H_{ad}^0 = -R \frac{\partial \ln k'}{\partial (1/T)} \quad (10)$$

By the same argument, using eq. (9) the enthalpy will be equal to:

$$\Delta H_{ad}^0 = -R \left(b + 2 \frac{c}{T} \right) \quad (11)$$

To estimate changes in Gibbs free energy for a process, the following equation related to the equilibrium constant (K) can be used (LEVINE, 1995):

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (12)$$

When the process is the adsorption of a macromolecule (as a protein) in a solid, GERSTNER et al. (1994) used a similar equation, where the equilibrium constant K is given by k'/φ . The eq. 12 can be re-written as:

$$\Delta G_{ad}^0 = -RT \ln \left(\frac{k'}{\varphi} \right) \quad (13)$$

The Gibbs free energy also is given by Gibbs-Helmholtz equation (LEVINE, 1995):

$$\Delta G_{ad}^0 = \Delta H_{ad}^0 - T \Delta S_{ad}^0 \quad (14)$$

Re-arranging this equation, the entropy value can be determined by:

$$\Delta S_{ad}^0 = \frac{1}{T} (\Delta H_{ad}^0 - \Delta G_{ad}^0) \quad (15)$$

Consequently, with the information given by equations 11 – 15 is possible obtain a more extensive thermodynamic study and a better understanding of the adsorption phenomenon can be obtained.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Materials

The proteins α -la and β -lg were purchased from Sigma (St. Louis, USA). Tris-hydroxymethyl-aminometane (MM 121.14 g·mol⁻¹, analytical grade) was acquired from Merck (Whitehouse Station, USA) and all other chemicals, also analytical grade, were purchased from Vetec (São Paulo, BRA). The adsorbent used was the stronger anion-exchanger Streamline[®] Q XL (amino quaternary as exchanger group and density equal to 1200 kg·m⁻³) acquired from GE Health Care (Uppsala, SWE).

3.2. Equipment

The adsorbent was packed into a HR 2/5 column (GE Health Care) resulting in a bed with 29.0 mm of length and 5.0 mm of internal diameter. A characterization of the column was made using the momentum method (FURUSAWA et al., 1976) with Dextrana Blue (MM 2.0 x 10⁶ g·mol⁻¹, Sigma) and Acetone (MM 58.0 g·mol⁻¹, Merck) as tracers, revealing a bed porosity (ε_b) and particle porosity (ε_p) equal to 0.2537 and 0.5819 respectively.

The experiments were conducted in an *Äkta Purifier* System MOD 10X (GE Health Care), using a UV detector fixed in 280 nm and flow rate of 2.0 mL·min⁻¹. To control the equipment was used the software Unicorn v.1.0 (GE Health Care). The system temperature was controlled by immersion of the column in a thermostatic bath with precision range of ± 0.1 K (QUIMIS, São Paulo, BRA).

3.3. Acquisition of isotherms data points by FA method

The equilibrium data were obtained by the FA method. The packed adsorbent was equilibrated with 20 column volumes (CV) of a buffer solution of Tris-hidroximetil-aminometano buffer (Tris-HCl) 45 mM, pH 7.4 in a constant temperature, according to FONTAN et al. (2003).

After equilibration, a single solution of protein with $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ was percolated trough the column until the complete formation of the breakthrough curve. At this point, the protein concentration was abruptly increased to a new value, kept constant until the completely formation of a new breakthrough curve. This was made sucessively until the final concentration reached of $3.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ with a total of twelve experimental data points to each temperature. Adsorption isotherms of both proteins were obtained experimentally at temperatures of 283.15 K, 293.15 K, 303.15 K and 313.15 K.

At the end of each run, the column was regenerated with 40 CV of NaCl 1.0 M in Tris-HCl solution and then it was re-equilibrated with more 20 CV of Tris-HCl 45 mM pH 7.4 solution.

3.4. Modeling equilibrium and thermodynamic analysis

Once obtained experimental data points, modeling could be made. The fit of the best parameters to each used model was processed in the software package SAEG v.8.1 (RIBEIRO JÚNIOR, 2001), being as criteria of selection the determination coefficient (R^2), the analysis of variance (ANOVA) with Fisher test at $P < 0.05$ and the Student test of the adjusted parameters, beside residual analysis.

The non-linear van't Hoff analysis was used to determine the thermodynamics properties enthalpy (ΔH_{ad}^0), Gibbs free energy (ΔG_{ad}^0) and the

entropy (ΔS_{ad}^0) of adsorption, in each studied temperature, according to equations 11, 13 and 15.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Adsorption isotherms of α -la and β -lg

Experimental adsorption isotherms of α -la and β -lg obtained at different temperatures are shown in Figures 1 and 2. For both proteins the isotherms have a convex upward shape, with a steep initial slope. This is in agreement with the experimental determinations, where the breakthrough fronts obtained were very steep, showing that the amount adsorbed in column increases less quickly than the increase in a solute concentration. The same behavior was observed by HUANG et al. (1990) in a study of adsorption of albumin and conalbumin on a weak exchanger adsorbent.

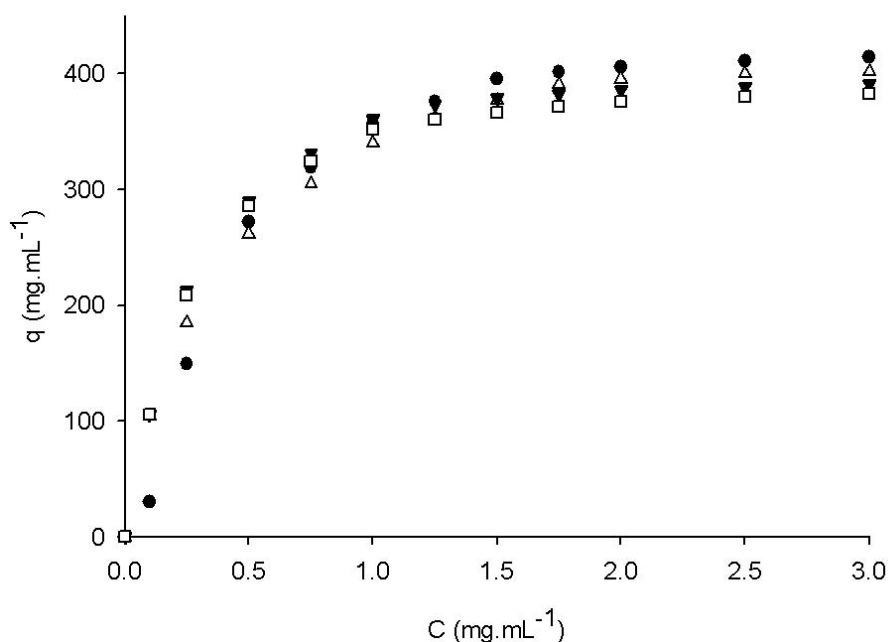


Figure 1: Experimental isotherms of α -la in Streamline[®] Q XL packed in a 29 x 5 mm column and flow rate of 2.0 mL·min⁻¹. at different temperatures. (●) at 283.15 K; (△) at 293.15 K; (▼) at 303.15 K and (□) at 313.15 K.

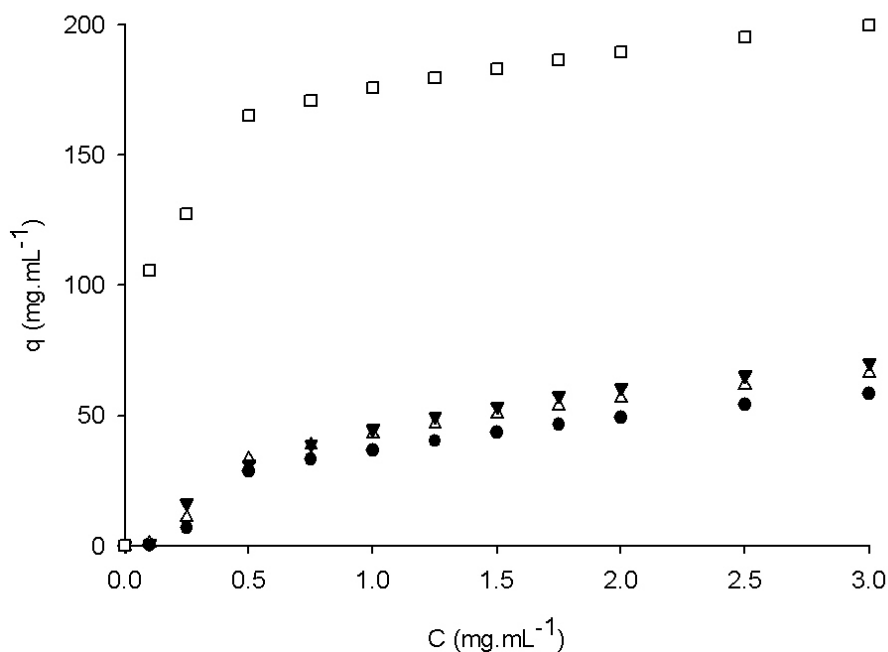


Figure 2: Experimental isotherms of β -lg in the same column and conditions than α -la. (●) at 283.15 K; (△) at 293.15 K; (▼) at 303.15 K and (□) at 313.15 K.

In Figures 1 and 2 can be observed that the behavior of β -lg in respect to temperature, is contrary to α -la. While the saturation capacity of β -lg increase with the temperature increase, the saturation capacity of α -la decrease with the increase in temperature. Besides the amount of adsorbed α -la is substantially higher than β -lg.

HUANG et al. (1990) studying the adsorption of chicken albumin on TSK-DEAE 5PW, observed the same behavior seen to α -la in this work while MIHELIC^Ā et al. (2003) studying the temperature influence in adsorption of proteins on a monolithic ion-exchange column concluded that increasing the temperature, the

saturation capacity of the column was improved when soybean trypsin inhibitor was eluted.

A possible explication of the opposite behavior presented by β -lg and α -la may be attributed to the net charge of the proteins. When ions of equal net charges are involved in the ion exchange process, an increase in temperature is followed by a decrease in selectivity, whereas in systems including ions of different net charges a higher temperature usually leads to increased selectivity (SAMUELSON, 1963).

Possibly, with the variation of temperature inside the range studied, the tertiary structure of α -la remains intact, while the tertiary structure of β -lg was modified, exposing more ionic groups to ion-exchange process with increase of temperature, increasing consequently the saturation capacity of the column. This fact will be discussed with more details in the next sessions.

4.2. Modeling equilibrium data

To select the model that have the best fit to experimental data, five different models of adsorption isotherms were tested: Langmuir (LA), Bi-Langmuir (BL), Toth (TO), Jovanovic (JO) and Freundlich (FR). A preliminary investigation with a Scatchard data plot (q/C vs. q) was made (GRITTI and GUIOCHON, 2004), indicating a non-langmuirian comporment to both proteins. Figure 3 presents data point to Scatchard plots at 313.15 K, being this behavior equal in other temperatures. A convex upward shape of plot to α -la shows that possibly the Jovanovic model will have the best adjustment, and the convex downward shape to β -lg indicate that the best model will be Toth or Bi-Langmuir model (GRITTI and GUIOCHON, 2004).

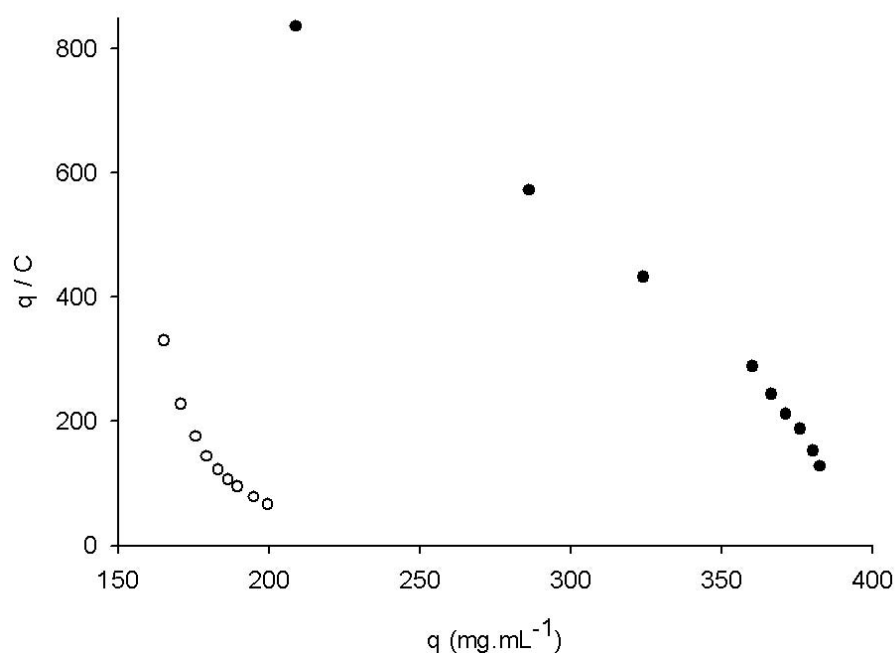


Figure 3: Scatchard plots to α -la and β -Ig adsorption on Streamline[®] Q XL adsorbent at 313.15 K. (●) α -la; (○) β -Ig.

The adjusted parameters to each adsorption isotherm were presented in Tables 1 and 2. It could be observed that Langmuir, Toth and Jovanovic models have a good adjustment of the parameters with a high R^2 , the Freundlich model have a good adjustment, but an unsatisfactory determination coefficient while the Bi-Lan model have a good R^2 with a poor adjustment of parameters.

KALTENBRUNNER and JUNGBAUER (1996) studying adsorption of BSA on an ion-exchanger adsorbent didn't obtain a good fit to isotherms used, although higher R^2 values obtained. QUIÑONES and GUIOCHON (1996b) tested the Toth model and a derivation of a Jovanovic-Freundlich model to adsorption of small organic compounds on heterogeneous surfaces have a good R^2 values with an acceptable adjustment of parameters, as obtained by GRITTI et al. (2003) for phenol and caffeine on reversed-phase adsorbent. In general small compounds have a best fit

of parameters than proteins due to a less complexity in the interactions on the adsorption phenomenon.

Table 1: Adjusted parameters for the tested isotherm models to adsorption of α -la on Streamline[®] Q XL at different temperatures.

Langmuir model									
T (K)	q_s (mg·mL ⁻¹)	CI 95%	b (mL·mg ⁻¹)	CI 95%	R ²				
283.15	511.992	±24.710	1.972	±0.330	0.979				
293.15	462.814	±5.313	2.719	±0.126	0.998				
303.15	439.296	±6.603	3.822	±0.273	0.995				
313.15	426.410	±5.605	3.918	±0.248	0.996				
Toth model									
T (K)	q_s (mg·mL ⁻¹)	CI 95%	b (mL·mg ⁻¹)	CI 95%	n	CI 95%	R ²		
283.15	511.992	±82.286	1.972	±0.563	1.000	±0.391	0.979		
293.15	462.814	±16.450	2.719	±0.245	1.000	±0.102	0.998		
303.15	439.297	±19.198	3.822	±0.595	1.000	±0.151	0.995		
313.15	426.410	±16.229	3.918	±0.544	1.000	±0.133	0.996		
Jovanovic model									
T (K)	q_s (mg·mL ⁻¹)	CI 95%	b (mL·mg ⁻¹)	CI 95%	R ²				
283.15	417.930	±7.961	1.872	±0.131	0.992				
293.15	394.520	±6.057	2.223	±0.139	0.992				
303.15	384.391	±2.860	2.962	±0.105	0.997				
313.15	373.665	±2.986	3.031	±0.116	0.997				
Bi-Langmuir model									
T (K)	q_{s1} (mg·mL ⁻¹)	CI 95%	b_1 (mL·mg ⁻¹)	CI 95%	q_{s2} (mg·mL ⁻¹)	CI 95%	b_2 (mL·mg ⁻¹)	CI 95%	R ²
283.15	229.346	±5.8x10 ⁹	1.972	±1.8x10 ⁵	282.644	±5.8x10 ⁹	1.972	±1.5x10 ⁵	0.979
293.15	192.710	±399.886	2.719	±22.835	270.104	±399.886	2.719	±16.293	0.998
303.15	188.373	±3.4x10 ⁸	3.822	±2.0x10 ⁴	250.924	±3.4x10 ⁸	3.822	±1.5x10 ⁴	0.995
313.15	192.479	±482.464	3.918	±47.200	233.931	±482.464	3.918	±38.838	0.996
Freundlich model									
T (K)	a	CI 95%	n	CI 95%	R ²				
283.15	312.950	±15.917	2.663	±0.460	0.909				
293.15	314.406	±8.689	3.179	±0.352	0.962				
303.15	324.132	±10.748	3.754	±0.578	0.934				
313.15	316.357	±10.155	3.795	±0.571	0.940				

Standard error gives at 95% confidence interval (CI 95%).

Table 2: Adjusted parameters for the tested isotherm models to adsorption of β -lg on Streamline[®] Q XL at different temperatures.

Langmuir model										
T (K)	q_s (mg·mL ⁻¹)	CI 95%	b (mL·mg ⁻¹)	CI 95%						R^2
283.15	81.854	±7.834	0.789	±0.171						0.975
293.15	89.977	±7.045	0.886	±0.165						0.980
303.15	96.802	±5.229	0.849	±0.107						0.991
313.15	198.897	±3.038	9.143	±0.986						0.990
Toth model										
T (K)	q_s (mg·mL ⁻¹)	CI 95%	b (mL·mg ⁻¹)	CI 95%	n	CI 95%				R^2
283.15	81.854	±34.579	0.789	±0.181	1.00	±0.635				0.975
293.15	89.977	±29.977	0.886	±0.180	1.00	±0.530				0.980
303.15	96.803	±22.483	0.849	±0.115	1.00	±0.363				0.991
313.15	231.817	±18.547	32.243	±21.269	0.531	±0.122				0.996
Jovanovic model										
T (K)	q_s (mg·mL ⁻¹)	CI 95%	b (mL·mg ⁻¹)	CI 95%						R^2
283.15	59.590	±3.762	0.946	±0.141						0.975
293.15	66.637	±3.439	1.027	±0.132						0.980
303.15	71.539	±2.686	0.985	±0.089						0.990
313.15	183.901	±4.231	6.017	±0.870						0.959
Bi-Langmuir model										
T (K)	q_{s1} (mg·mL ⁻¹)	CI 95%	b_1 (mL·mg ⁻¹)	CI 95%	q_{s2} (mg·mL ⁻¹)	CI 95%	b_2 (mL·mg ⁻¹)	CI 95%	R^2	
283.15	36.933	±1.8x10 ⁸	0.789	±5.3x10 ³	44.912	±1.8x10 ⁸	0.789	±4.4x10 ³	0.975	
293.15	42.052	±313.901	0.887	±15.772	47.925	±313.901	0.886	±13.839	0.980	
303.15	48.644	±227.574	0.849	±9.288	48.159	±227.574	0.849	±9.381	0.991	
313.15	68.022	±11.972	5.1x10 ⁶	±2.1x10 ⁸	140.343	±9.706	3.470	±0.879	0.996	
Freundlich model										
T (K)	a	CI 95%	n	CI 95%						R^2
283.15	33.703	±1.782	1.818	±0.224						0.947
293.15	39.378	±1.919	1.900	±0.226						0.951
303.15	41.594	±1.669	1.890	±0.184						0.966
313.15	170.550	±2.169	5.919	±0.523						0.986

Standard error gives at 95% confidence interval (CI 95%).

Figures 4 and 5 shows adsorption isotherms of α -la and β -lg at 313.15 K with the fitted models. The same behavior was observed to others temperatures studied. The results indicate a great homogeneity of the adsorbent, once the n parameter of Toth model was significantly equal 1.0, reducing its to a Langmuir model for all isotherms, except to β -lg at 313.15K. At this same temperature, parameters of the Bi-

Langmuir model presented the best fit but showed a high value to parameter b_1 suggesting the predominance of selective sites on adsorbent. To other temperatures the parameters b_1 and b_2 in BL model are practically equals, showing an inefficiency of the model in differentiate the two kinds of proposed sites. It does also suggest a high homogeneity of the adsorbent tested. The classical Langmuir and the Jovanovic model, which considers the homogeneity surface, showed good fits describing very well the phenomenon studied.

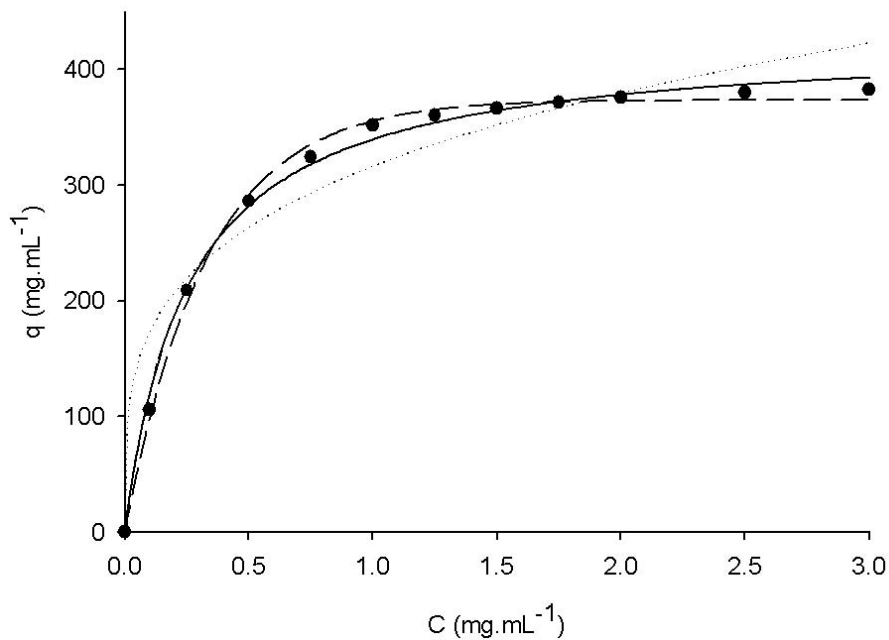


Figure 4: Adsorption isotherm of α -la on Streamline[®] Q XL adsorbent at 313.15 K with fitted models. (—) LA model, (.....) FR model, (—) JO model, (---) BL model, (----) TO model, (●) experimental data. LA, TO and BL are fitted under the same line.

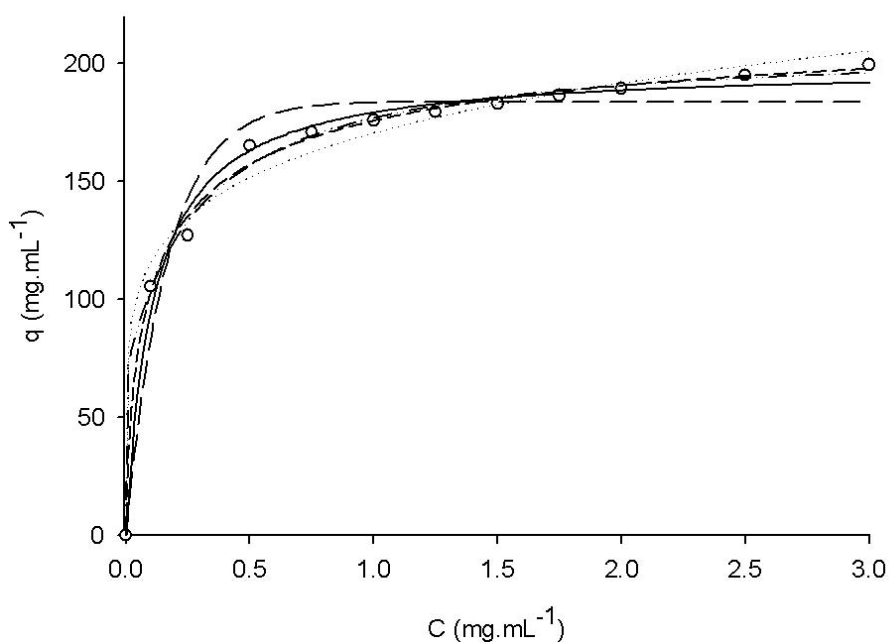


Figure 5: Adsorption isotherm of β -lg on Streamline[®] Q XL adsorbent at 313.15 K with fitted models. (—) LA model, (.....) FR model, (— — —) JO model, (-·-·-) BL model, (----) TO model, (●) experimental data.

4.3. Thermodynamic analysis

To be possible the thermodynamic analysis in question, the adsorption isotherms to α -la and β -lg in different temperatures were determined, as described above. Adsorption enthalpy of α -la and β -lg were determined by non-linear van't Hoff analysis. Besides the Langmuir model had a good fit and to be thermodynamically consistent, the k' value was calculated according to JACOBSON et al. (1984):

$$k' = q_s \cdot b \cdot \varphi \quad (16)$$

where q_s and b are the fitted parameters of LA model and φ is the phase ratio.

Calculated the k' value, were plotted to both proteins graph of $\ln k'$ vs. $1/T$.

Figure 6 shows this plots and the fitted polynomial equations.

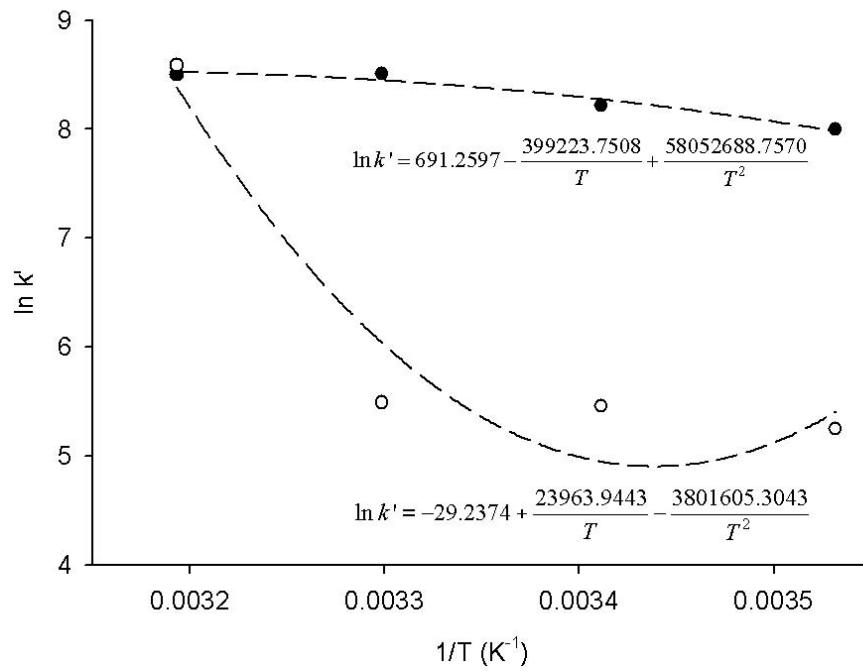
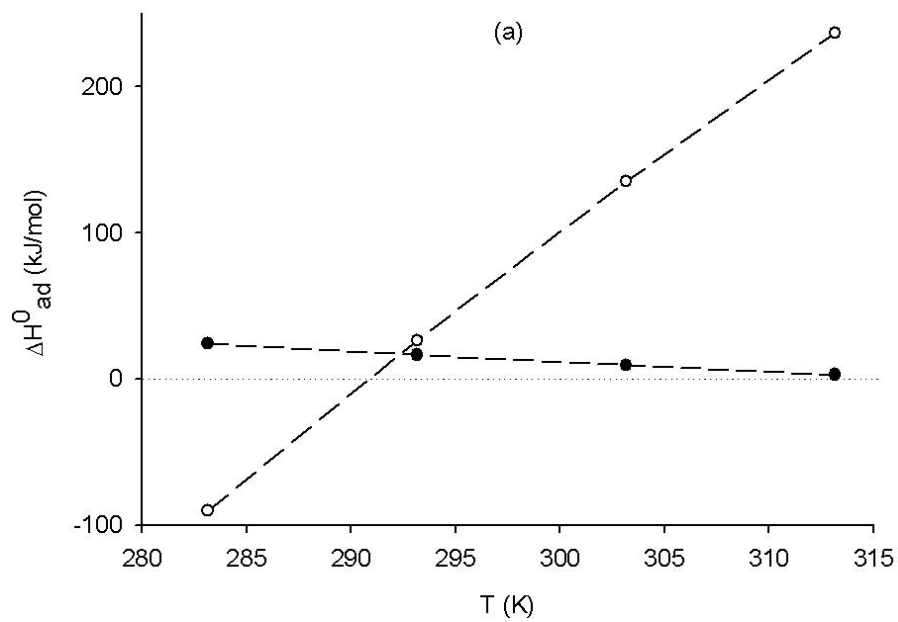


Figure 6: van't Hoff plots to (●) α -la and (○) β -lg adsorption on Streamline[®] Q XL.

The values of enthalpy, Gibbs free energy and entropy were determined using eqs. 11, 13 and 15, respectively, as can be see in Figures 7a to 7c.



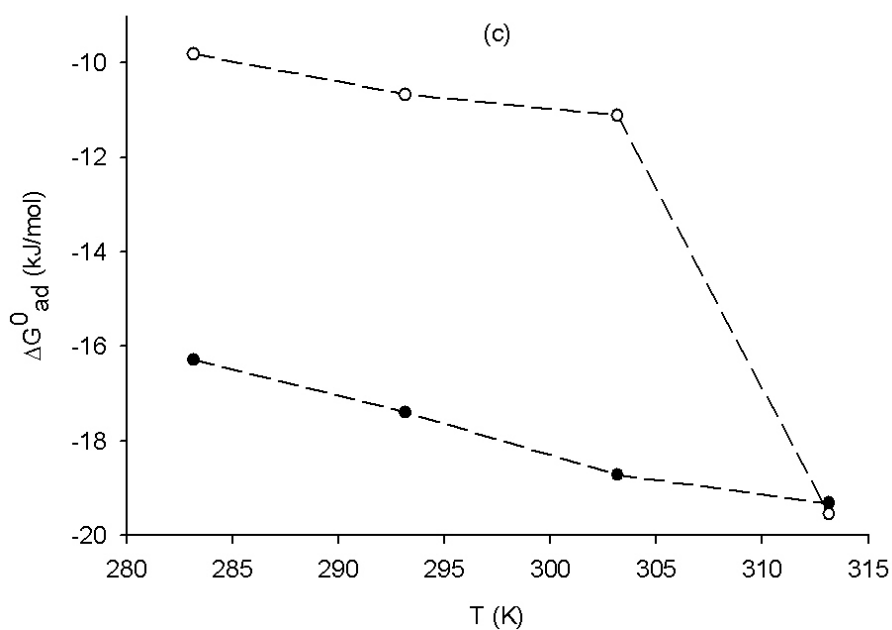
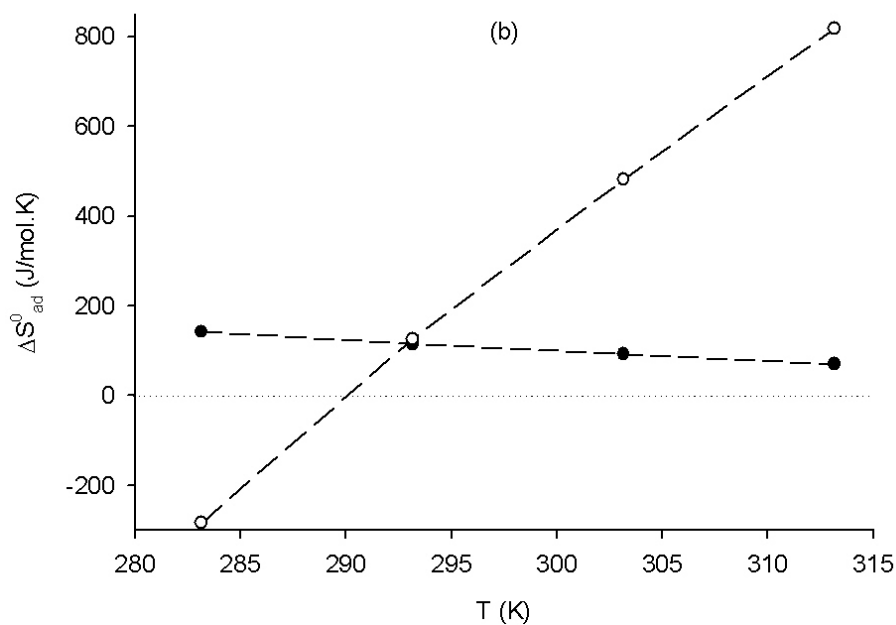


Figure 7: (a) enthalpy, (b) entropy and (c) Gibbs free energy to adsorption of α -la (●) and β -Ig (○) on Streamline[®] Q XL at studied temperatures.

Analyzing Figures 7a and 7b some information could be extracted: (i) at studied conditions the adsorption process is endothermic, being adsorptive compartment opposite for α -la and β -Ig. While for β -Ig the enthalpy tends to be more endothermic (more positive) with the increase in temperature, for α -la the enthalpy

tends to an exothermic compartment (a less endothermic compartment) with the same elevation in temperature. (ii) The adsorptive process to β -lg tends to be more entropically driven than α -la with the higher temperature, possibly due to conformational changes on β -lg structure.

BOWEN and HUGHES (1993) studying the adsorption of BSA on anion-exchange materials verifies different results depending of the used adsorbent, observing a similar compartment of β -lg for one kind of adsorbent (QA52, Whatman) and of α -la with other adsorbent (PL-SAX 1000, Polymer Laboratories).

In Figure 7c it could be observed that the adsorption of both proteins on Streamline[®] Q XL in the studied conditions occurs spontaneously, due to negative values of the Gibbs free energy. Increasing temperature α -la tends to be more stable in solution, reducing your adsorbed amount, while β -lg tends to be more stable in the adsorbed state. A possible theory is due to increasing temperature, a conformational change in β -lg structure occurs, increasing the entropy of the system. NAKANISHI et al. (2001) in a review about adsorption of proteins on solid surfaces reports that adsorption of β -lg on stainless steel was nearly constant until around 323.15 K, when then the adsorption increase with the temperature. The authors attribute this fact to conformational changes on β -lg structure, exposing a free cysteine residue to make linkages with adsorbents or other protein molecules. A similar compartment was observed in this study (Figure 1) with a great increase in adsorptive capacity at 313.15 K.

The protein α -la is considered “soft”, being more flexible than β -lg, a more “hard” or rigid (NAKANISHI et al. 2001). The capacity of α -la in maintains its structure and properties with the increase in the temperature is better than β -lg due to

its flexibility. With the elevation of temperature, disulfide binds in β -lg are broken, changing its conformation and taking it to be more hydrophilic, increasing the amount of adsorbed protein. Furthermore, α -la is more adaptable to the elevation at temperature, turning its structure more compact and causing a little raise in its hydrophobicity, decreasing the amount adsorbed.

5. CONCLUSIONS

In conditions studied at this paper was observed that adsorptive capacity to ion exchanger Streamline[®] Q XL increases for β -lg with the increase in temperature, while to α -la to the opposite behavior was observed. Langmuir, Toth and Jovanovic models had the best fits, pointing to a great homogeneity of the adsorbent. Thermodynamic analysis indicates a spontaneous process ($\Delta G_{ad}^0 < 0$), endothermic and entropically driven, principally to β -lg, suggesting a conformational change in its structure turning it more hydrophilic, thus increasing its amount adsorbed.

6. ACKNOWLEDGMENTS

To National Council of Research and Development – CNPq and Minas Gerais State' Foundation of Help to Research – FAPEMIG by financial support; and to Laboratory of Separation Process – LPS at Federal University of Viçosa – UFV by human support that turn possible this work.

7. SYMBOLS

α	fraction of total sites occupied by stronger sites in adsorbent
ϕ	constant relationship to phase ratio
φ	phase ratio of the used bed $[(1-\varepsilon_b) \cdot \varepsilon_b^{-1}]$
ε_b	bed porosity
ΔG_{ad}^0	standard change in Gibbs free energy of adsorption (kJ·mol ⁻¹)
ΔH_{ad}^0	standard change in enthalpy of adsorption (kJ·mol ⁻¹)
ΔS_{ad}^0	standard change in entropy of adsorption (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)
b	equilibrium constant of adsorption (mg·mL ⁻¹)
b_1	equilibrium constant of adsorption in specific sites (mg·mL ⁻¹)
b_2	equilibrium constant of adsorption in non-specific sites (mg·mL ⁻¹)
C	concentration of solute in solution (mg·mL ⁻¹)
C_i	conc. in solution at i^{th} step of frontal analysis (FA) method (mg·mL ⁻¹)
C_{i+1}	conc. in solution at $(i+1)^{th}$ step of frontal analysis method (mg·mL ⁻¹)
CI 95%	confidence interval at 95%
k'	capacity factor
n	heterogeneity parameter
q	amount of adsorbed solute (mg·mL ⁻¹)
q_i	amount of adsorbed solute at i^{th} step of FA method (mg·mL ⁻¹)
q_{i+1}	amount of adsorbed solute at $(i+1)^{th}$ step of FA method (mg·mL ⁻¹)
q_s	maximum capacity of adsorbed solute (mg·mL ⁻¹)
q_{s1}	maximum capacity of adsorbed solute in specific sites(mg·mL ⁻¹)
q_{s2}	maximum capacity of adsorbed solute in non-specific sites(mg·mL ⁻¹)
R	ideal gas constant (N·m·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)
T	temperature (K)
V_0	void volume of the system (mL)
V_a	volume of adsorbent in the bed (mL)
$V_{F,i+1}$	volume between i^{th} and $(i+1)^{th}$ breakthrough points in FA method (mL)

8. REFERENCES

BELLOT, J. C.; CONDORET, J. S. Modelling of liquid chromatography equilibria. *Process Biochemistry*, v. 28, p. 365-376, 1993.

BOYSEN, R. I.; WANG, Y.; KEAH, H. H.; HEARN, M. T. W. Observations on the origin of the non-linear van't Hoff behaviour of polypeptides in hydrophobic environments. *Biophysical Chemistry*, v. 77, p. 79-97, 1999.

BOWEN, W. R.; HUGHES D. T. Ion exchange of proteins: a microcalorimetric study of the adsorption of bovine serum albumin on anion-exchange materials. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 158, p. 395-402, 1993.

ESQUIBEL-KING, M. A.; DIAS-CABRAL, A. C.; QUEIROZ, J. A.; PINTO, N. G. Study of hydrophobic interaction adsorption of bovine serum albumin under overload conditions using flow microcalorimetry. *Journal of Chromatography A*, v. 865, p. 111-122, 1999.

FONTAN, R. C. I.; MINIM, L. A.; BONOMO, R. C. F.; COIMBRA, J. S. R.; SARAIVA, S. H.; MINIM, V. P. R. Utilização de técnicas adsortivas na purificação de proteínas do soro de queijo. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 58, n. 333, p. 210-214, 2003.

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.

GERBERDING, S. J.; BYERS, C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *Journal of Chromatography A*, v. 808, p. 141-151, 1998.

GERSTNER, J. A.; BELL, J. A.; CRAMER, S. M. Gibbs free energy of adsorption for biomolecules in ion-exchange systems. *Biophysical Chemistry*, v. 52, p. 97-106, 1994.

GRAHAM, D. The characterization of physical adsorption systems. I. The equilibrium function and standard free energy of adsorption. *Journal of Physical Chemistry*, v. 57, p. 665-669, 1953.

GRITTI, F.; GOTMAR, G.; STANLEY, B. J.; GUIOCHON, G. Determination of single component isotherms and affinity energy distribution by chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 988, p. 185-203, 2003.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Heterogeneity of the surface energy on unused C18-Chromolith adsorbents in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1028, p. 105-119, 2004.

GRUSHKA, E.; COLIN, H.; GUIOCHON, G. Retention behaviour of alkylbenzenes as a function of temperature and mobile phase composition in reversed-phase chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 248, p. 325-339, 1982.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. Academic Press, New York, 700p., 1994.

HELFFERICH, F. *Ion exchange*. McGraw-Hill Inc., New York, 624p., 1962.

HUANG, J.; HORVÁTH, C. Adsorption isotherms on high-performance liquid chromatographic sorbents – I. Peptides and nucleic acid constituents on octadecyl-silica. *Journal of Chromatography*, v. 406, p. 275-284, 1987.

HUANG, J.; SCHUDEL, J.; GUIOCHON, G. Adsorption behaviour of albumin and conalbumin on TSK-DEAE 5PW anion exchanger. *Journal of Chromatography*, v. 504, p. 335-349, 1990.

JACOBSON, J.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C. Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 316, p. 53-68, 1984.

JAMES, E. A.; DO, D. D. Equilibria of biomolecules on ion-exchange adsorbents. *Journal of Chromatography*, v. 542, p. 19-28, 1991.

KALTENBRUNNER, O.; JUNGBAUER, A. Adsorption isotherms in protein chromatography – combined influence of protein and salt concentration on adsorption isotherm. *Journal of Chromatography A*, v. 734, p. 183-194, 1996.

LEVINE, I. N. *Physical chemistry*. 4th edition. McGraw-Hill Inc., New York, 901p., 1995.

MIHELIČ, I.; PODGORNIK, A.; KOLOINI T. Temperature influence on the dynamic binding capacity of a monolithic ion-exchange column. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 159-168, 2003.

NAKANISHI, K.; SAKIYAMA, T.; IMAMURA, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, n. 3, p. 233-244, 2001.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W.; MALONEY, J. O. *Perry's chemical engineers' handbook*, 7th edition, McGraw-Hill, New York, 1997.

QUIÑONES, I.; GUIOCHON, G. Application of different isotherm models to the description of single-component and competitive adsorption data. *Journal of Chromatography A*, v. 734, p. 83-96, 1996.

QUIÑONES, I.; GUIOCHON, G. Derivation and application of a Jovanovic-Freundlich isotherm model for single-component adsorption on heterogeneous surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 183, p. 57-67, 1996.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. *Análises estatísticas no SAEG*. Ed. Folha de Viçosa, Viçosa, 301p., 2001.

SAMUELSON, O. *Ion exchange separations in analytical chemistry*. John Willey & Sons Inc., New York, 474p., 1963.

SHIOSAKI, A.; GOTO, M.; HIROSE, T. Frontal analysis of protein on a membrane adsorber. *Journal of Chromatography A*, v. 679, p. 1-9, 1994.

TERZYK, A.; CHATŁAS, J.; GAUDEN, P. A.; RYCHLICKI, G.; KOWALCZYK, P. Developing the solution of the Toth adsorption isotherm equation. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 266, p. 473-476, 2003.

TOTH, J. State equations of the solid-gas interface layers. *Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae*, v. 69, p. 311-328, 1971.

ARTIGO 03

MULTI COMPONENT ISOTHERMS OF α -LACTALBUMIN AND β -LACTOGLOBULIN ON ION EXCHANGER SORBENT

Abstract

Exists few studies with macromolecules systems and the utilization of multi-component frontal analysis in these systems is limited to strait ranges of low concentrations due to absence of the intermediate plateau on breakthrough curves. By this reason is proposed in this work a small modification on method improved by Jacobson et al. (1987). A simultaneous individual frontal analysis was made in binary systems composed by different proportions of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin. The isotherms were obtained successfully and well fitted to competitive Langmuir model, showing the efficiency of the method, besides generate more data about macromolecules multi-component systems.

Key-words: multi-component system, proteins, simultaneous frontal analysis, competitive isotherms.

1. INTRODUCTION

Chromatographic techniques are in constant development in order to supply needs of pharmaceuticals and biotechnology industries, due to high specificity and selectivity present by them (GERBERDING and BYERS, 1998; GRITTI et al., 2003). One of the major difficulties encountered in the development of new techniques resides in transfer to a real system data obtained in single systems. Thus the study of multi-component systems that approximate real systems had been used to understand better their adsorptive behavior.

Equilibrium relationships of adsorption in multi-components systems are less studied than in single-component systems due to difficult caused by different species presents competing for interaction with stationary phase (GUIOCHON et al., 1994). Individual isotherms in single systems must be supplemented by a quantitative description of the interference or competition for adsorption sites among components in complex systems (JACOBSON et al., 1987).

Studies with adsorption in multi-component systems has increased in the last two decades, principally with small and inorganic compounds (SUN et al., 2001; QUIÑONES and GUIOCHON, 1996; JACOBSON et al., 1987, 1991), contributing to a better understanding about adsorption equilibrium. However biomolecules, principally macromolecules such as proteins, has been studied in a minor scale, with few experimental observations, limited to theory studies (VELAYUDHAN and HORVÁTH, 1988; BELLOT and CONDORET, 1993a, 1993b).

All the known methodologies to determine adsorption isotherms (single and multi-components) are based on studies with small compounds which takes errors when macromolecules were investigated. In this paper was proposed a modification on the frontal analysis method, using its single-component technique simultaneously for two proteins in a multi-component system. This modification was validate by fit of the competitive Langmuir isotherm model to experimental data.

2. THEORY

2.1. Determination of multi-component adsorption isotherms

In adsorption chromatography, the behavior of the feed components in multicomponents systems for access to adsorption sites is expressed by competitive isotherms. The methods used to determine competitive adsorption isotherms can be

static (in batch), which is tedious and with a long experimental time, and dynamic methods in chromatographic columns (GUIOCHON et al., 1994). Among the dynamic methods, the most used are the frontal analysis (FA) and the pulse method (PM) extended from single-components methods.

The FA method to determine adsorption isotherms in liquid chromatography was developed by JACOBSON et al. (1984) to single systems and extended by JACOBSON et al. (1987) to multi-component systems formed by phenol and p-cresol in different proportions. The authors starting from mass balances and equilibrium relations observed that to a binary system at each change in concentration of the compounds, two breakthrough curves were formed with an intermediate plateau, corresponding to each component in the mixture. Then, to each component, the amount adsorbed was given by:

$$q_i = \frac{1}{V_a} \left[(V_2 - V_0)(C_{i,B} - C_{i,A}) - (V_2 - V_1)(C_{i,m} - C_{i,A}) \right] \quad (1)$$

Where V_a is the volume of adsorbent into column, V_1 is the volume of solution at the inflection point in the first breakthrough curve and V_2 is the volume of solution at the inflection point in the second breakthrough curve. V_0 is the dead volume of the system, $C_{i,A}$ and $C_{i,B}$ are respectively the initial and the final concentration of the i^{th} component and $C_{i,m}$ is the concentration of the i^{th} component between the breakthrough curves.

Changing concentration of the solutes in the feed solution, other data points to isotherms are obtained. This method can also be conducted continuously, successively changing the solute concentration in steps. Although more tedious and time consuming, this method prevent cumulative errors on experiments, beside avoid the need for analysis of the intermediates plateaus (GUIOCHON et al., 1994).

However, in this paper was observed that the adsorption behavior of the proteins studied didn't follow this compartment, where the intermediate plateau has not been observed. CHARTON et al. (1994) studying purification of ketoprofen enantiomers didn't use high concentrations of these compounds because the intermediate plateau wasn't formed. These authors worked with low concentration range, where was possible the utilization of the equations proposed by JACOBSON et al. (1987).

Then, an alternative to be possible to determinate the experimental isotherm data was developed for protein adsorption in complex systems, presented here in this work. A modification of classical frontal analysis was made, where two frontal analysis were made simultaneously for both proteins presents in the same feed solution.

To make it possible, aliquots of the solution leaving the column were taken regularly and the proteins were analyzed in an analytical column. Once the frontal curves for both proteins were obtained, the equation valid to single-component frontal analysis was used (JACOBSON et al., 1984; GUIOCHON et al., 1994):

$$q_{i+1} = q_i + \frac{(C_{i+1} - C_i)(V_{F,i+1} - V_0)}{V_a} \quad (2)$$

where q_{i+1} and q_i are the amounts of compound adsorbed by the column packing after the $(i+1)^{\text{th}}$ and i^{th} steps, C_{i+1} and C_i are the concentration of compound in solution in the same steps, $V_{F,i+1}$ is the retention volume between the inflection points of the i^{th} and $(i+1)^{\text{th}}$ breakthrough curves, V_0 is the void volume of the system and V_a is the volume of adsorbent in the column

With this alternative, compounds presents in a complex system can be treated as the unique in solution, being possible however study the influence of adsorption of

one compound another just by changes in concentration and proportion between themselves.

2.2. Multi-component isotherm models

When several components are present in a solution, the amount of each component adsorbed at equilibrium is smaller than if that component were alone. In order to simplify the competitive adsorption, usually is adopted that the solvent is not adsorbed (only solute-adsorbent interactions), and in general the Gibbs excess isotherms is not considered (GUIOCHON et al., 1994). Many models to explain this phenomenon has been developed and used along the time (QUIÑONES and GUIOCHON, 1996; BELLOT and CONDORET, 1993a; JACOBSON et al., 1987). Among these models, the most common used is the competitive Langmuir model.

The classical Langmuir model can be extended to an n-component mixture, and the same hypothesis considered to single-component systems are also valid (BELLOT and CONDORET, 1993a; JAMES and DO, 1991). This model is only thermodynamically consistent when the saturation capacity of the adsorbed components is equal ($q_{s1} = q_{s2} = \dots = q_{sn}$), limiting its use to low concentrations in strait ranges (JAMES and DO, 1991).

$$q_i = \frac{q_{s,i} \cdot b_i \cdot C_i}{1 + \sum_{j=1}^n b_j \cdot C_j} \quad (3)$$

where q_i is the monolayer saturation capacity of the i^{th} component, b_i is the equilibrium constant of the i^{th} component and C_i is the equilibrium concentration in fluid phase of the i^{th} component.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Materials

The binary system used was made with the whey proteins α -lactalbumin (α -la) and β -lactoglobulin (β -lg) purchased from Sigma (St. Louis, USA). Tris-hydroxymethyl-aminometane ($\text{MM } 121.14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Analytical grade) was acquired from Merck (Whitehouse Station, USA) and all other chemicals, also analytical grade, were purchased from local laboratories. As adsorbent was used the stronger anion-exchanger Streamline[®] Q XL acquired from GE Health Care (Uppsala, SWE).

3.2. Equipment

The experiments were conducted in a HR 2/5 column (GE Health Care) packed with Streamline[®] Q XL, in a bed with 29.0 mm of length and 5.0 mm of internal diameter. The column characterization was made by the method of momentum (FURUSAWA et al., 1976), resulting the bed porosity (ε_b) of 0.2537 and particle porosity (ε_p) of 0.5819.

The experiments were conducted with this column at room temperature ($295.15 \pm 1.00 \text{ K}$) in *Äkta Purifier* System MOD 10X (GE Health Care), using a UV detector fixed in 280 nm and flow rate of $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. To control the equipment was used the software Unicorn v.1.0 (GE Health Care).

The quantification of α -la and β -lg presents on aliquots collected was conducted in HPLC Chromatograph (Shimadzu, JAP), using a Supelcosil C-18 column (25.0 cm x 4.8 mm, Supelco) with a guard column (2.0 cm x 4.8 mm) and UV detector at 210 nm, according to BONOMO et al. (2003).

3.3. Determination of isotherms data points by FA method

To obtain the experimental equilibrium data was used the modified FA method proposed. The packed adsorbent was equilibrated with 20 column volumes (CV) of a buffer solution of Tris-HCl 45 mM, pH 7.4 (FONTAN et al. 2003).

Competitive isotherms were determined at four different proportions between α -la and β -lg. As JACOBSON et al. (1987), were used the proportions of 1:1, 1:3 and 3:1 (α -la : β -lg, respectively). In this work was introduced a fourth proportion, 1:2, similar to ratio present in the fresh whey (CAYOT and LORIENT, 1997). Total protein concentration varies from 0.0 mg·mL⁻¹ to 4.0 mg·mL⁻¹, in a total of ten experimental points for each proportion.

Along entire FA runs, aliquots around 400 μ L were collected at regular time intervals and analyzed in an analytical C-18 column according to the methodology proposed by BONOMO et al. (2003). In this method, 20 μ L of the sample are injected in a C-18 column (25 cm x 4.8 mm) with a gradient elution (Acetonitrile 100 % and NaCl 0.15 M pH 2.5 as mobile phases) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, monitored at 210 nm and constant temperature of 313.15 K. With this method is possible the simultaneous quantification of α -la and β -lg presents in solution, using calibration curves previously obtained.

Finished the FA run with a specific ratio between the proteins, the column was cleaned with 40 CV of NaCl 1.0 M in Tris-HCl solution and then re-equilibrated with more 20 CV of Tris-HCl 45 mM pH 7.4.

3.4. Mathematical modeling of competitive isotherms

Once concluded each session of experiments with different proportions, the adsorbed amount of solute, q_i , corresponding to a equilibrium solution concentration, C_i , was calculated using eq.2. Then experimental isotherms were obtained.

To fit experimental data points to the isotherm equations, a prior identification of the common parameters in a system of non-linear equations is required. This task may be classified as a multi-variant, multi-objective, non-linear programming problem (QUIÑONES and GUIOCHON, 1996). In case of the competitive Langmuir model to a binary mixture, the non-linear system of equations is given by:

$$q_1 = \frac{q_{S1} \cdot b_1 \cdot C_1}{1 + b_1 \cdot C_1 + b_2 \cdot C_2} \quad (6a)$$

$$q_2 = \frac{q_{S2} \cdot b_2 \cdot C_2}{1 + b_1 \cdot C_1 + b_2 \cdot C_2} \quad (6b)$$

The same procedure can be used to obtain the system of equations using the other models. The adjustment of model parameters to experimental data point was made by non-linear regression analysis based on Gauss-Newton's method, using the software package SAEG v. 8.1. (RIBEIRO JÚNIOR, 2001).

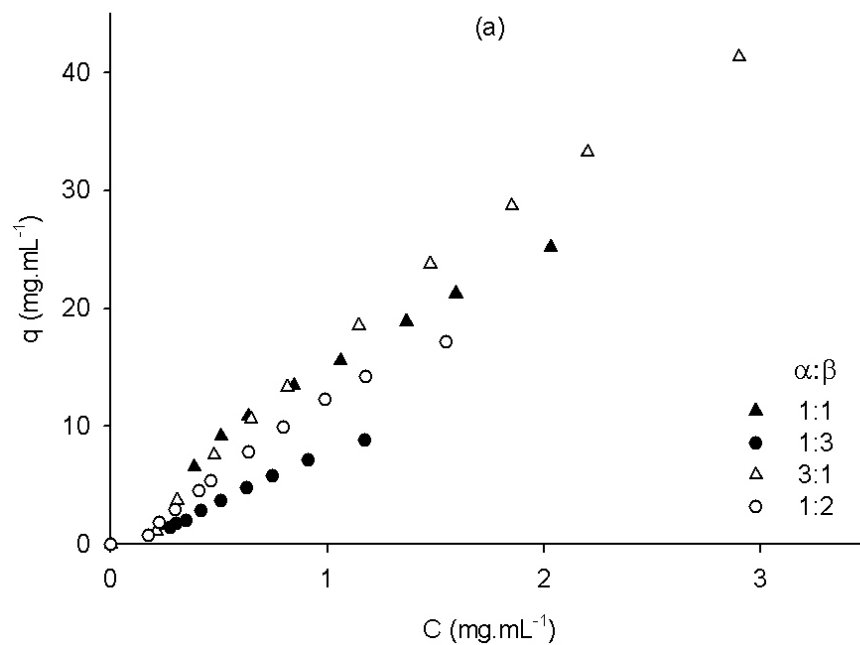
4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Competitive adsorption isotherms to α -la and β -lg

Comparing obtained values with single-component isotherms determined in our previous work using the same proteins, it could be observed that the adsorbed solute amount is lower in multi-component systems, mainly to α -la, which present a great reduction on its adsorbed quantities. It was expected, once in multi-component systems exists the competition between different species by adsorption sites.

JACOBSON et al. (1987) studying competitive adsorption in a binary system observed that quantities adsorbed of phenol and p-cresol were lower than in single systems. They also observed that the influence of p-cresol on phenol adsorption was similar to effect of phenol on p-cresol adsorption. This fact was not observed in our study, where different α -la concentrations results in similar isotherms to β -lg.

It was observed in Figure 1a that the adsorptive equilibrium of α -la was greatly influenced by the presence of β -lg. In contrast, Figure 1b shows that the equilibrium of β -lg was almost not affected by the addition of α -la.



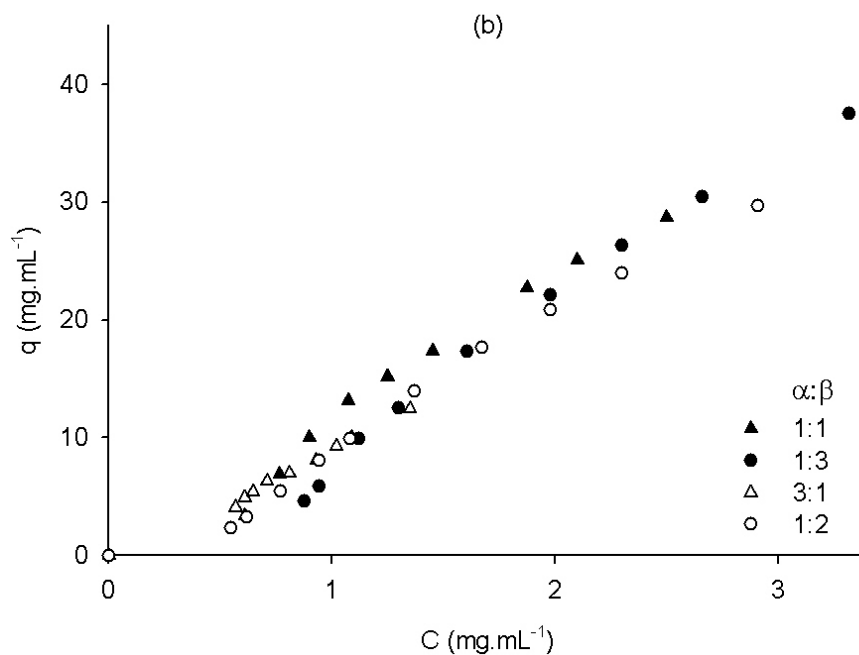


Figure 1: Experimental competitive isotherms of α -la (a) and β -lg (b) at different proportions on Streamline[®] Q XL packed in a 25.0 mm x 5.0 mm column, flow rate equal to 1.0 mL·min⁻¹ and room temperature.

SUN et al. (2001) comparing frontal analysis and pulse methods in multi-component systems observed that in 2-phenylethanol (PE) / 3-phenylpropanol (PP) system at same proportion of these compounds PP adsorbs more than PE. When different proportions were used, the component in higher concentration was more adsorbed. In the same work, the authors verified that to p-dihydroxybenzene / resorcinol system in all studied proportions the amount adsorbed of resorcinol was superior to p-dihydroxybenzene.

Multi-component systems formed by biomolecules, in particular macromolecules, are less studied than systems formed by small components. JAMES and DO (1991) studied the influence of different salt concentrations in BSA adsorption on DEAE-Sepharose Fast Flow, adjusting experimental data to Competitive Langmuir-Freundlich model, obtaining good results.

BONOMO et al. (2003) and FONTAN et al. (2003) studied adsorption of α -la and β -lg presents in a whey protein isolate solution on stronger anion exchangers and observed the same comportment as in this work, with the quantities of adsorbed β -lg always superior to α -la.

A possible explication to the opposite comportment in single and multi-component systems for these proteins could be related to its own structures. The protein α -la is globular with 14.2 kDa of molar mass and isoelectric point (pI) near 4.8, while β -lg, another globular protein, has a pI equal 5.2 and 18.4 kDa of molar mass. But, at pH 5-8 β -lg exists as a dimer, with a total mass equal to 36.8 kDa. Besides, β -lg has in your primary structure more negatively charged aminoacids (at pH 7.4) than α -la, 16 residues/mol of glutamyl and 10 residues/mol of aspertyl, against 8 residues/mol of glutamyl and 9 residues/mol of aspertyl in α -la structure. However, β -lg is more hydrophobic than α -la, having an average hydrofobicity equal 508 kJ/residue, against 468 kJ/residue for α -la (CAYOT and LORIENT, 1997).

The greater hydrophobicity of β -lg suggests that its adsorbed amount on an anion-exchange process at pH 7.4 be smaller than α -la at same conditions. In fact, this was observed in our previous work with single-component systems.

An alternative to explain why in multi-component systems the inverse comportment was observed is given as follow. A major number of glutamyl and aspertyl residues presents in β -lg leads to a more strong interactions the adsorbent, while this does not happen with α -la. A stronger interaction allied with a higher molar mass suggests a steric impediment of α -la. When the α -la concentration is two or three times larger, the interaction between adsorbent sites and α -la tends to be dominant in the system, increasing its amount adsorbed.

4.2. Modeling equilibrium data

The fitted parameters of competitive Langmuir model are presented below in Table 1. A satisfactory determination coefficient (R^2) was obtained with the adjusted parameters, showing that the used model, beside its simplicity, describe very well the equilibrium data.

Table 1: Adjusted parameters for the competitive Langmuir model to adsorption of α - la and β - lg on Streamline[®] Q XL at different proportions.

Proportion α -la : β -lg	$q_{s,\alpha\text{-la}}$ (mg·mL ⁻¹)	$q_{s,\beta\text{-lg}}$ (mg·mL ⁻¹)	$b_{\alpha\text{-la}}$ (mL·mg ⁻¹)	$b_{\beta\text{-lg}}$ (mL·mg ⁻¹)	$R^2_{\alpha\text{-la}}$	$R^2_{\beta\text{-lg}}$
1:3	30.8699	160.7002	0.3682	0.1085	0.944	0.915
1:2	64.9861	125.1408	0.2440	0.1281	0.982	0.942
1:1	65.9980	116.4990	0.3590	0.2090	0.994	0.881
3:1	361.1787	114.9757	0.0502	0.0833	0.997	0.958

$R^2_{\alpha\text{-la}}$ and $R^2_{\beta\text{-lg}}$ indicates the R^2 value to α -la and β -lg isotherms respectively.

In Table 1, it can be observed that the saturation capacity (q_s) of a protein increases as its proportion in the mixture is higher, which is more evidenced for the α -la. Specifically, the q_s value of β -lg in the 1:1 proportion is higher than the q_s value of α -la, which reinforces the theory about the stronger interaction of β -lg and the adsorbent.

The b values changes so few in the different proportions, except in 3:1, suggesting an alteration relevant on the system equilibrium. This changing was observed exactly in the proportion when α -la has a higher saturation capacity.

An interesting observation was made by SKIDMORE and CHASE (1990) in their study with cation-exchange of Bovine serum albumin (BSA) and Lysozyme. These authors verified the competition between its, occurring elution of BSA by Lysozyme. In general Lysozyme has higher saturation capacity than BSA, due to more aminoacids residues positively charged. However, the presence of large

quantities of BSA within the adsorbent pores could hinder the access of lysozyme to the sites presents there.

Experimental and predicted isotherms of α -la and β -lg in proportion of 3:1 are presented in Figure 2. A satisfactory agreement between predicted and experimental data was observed. The same result was also observed with the others conditions studied, demonstrating that the used technique had good results, being an alternative tool for the existents methods.

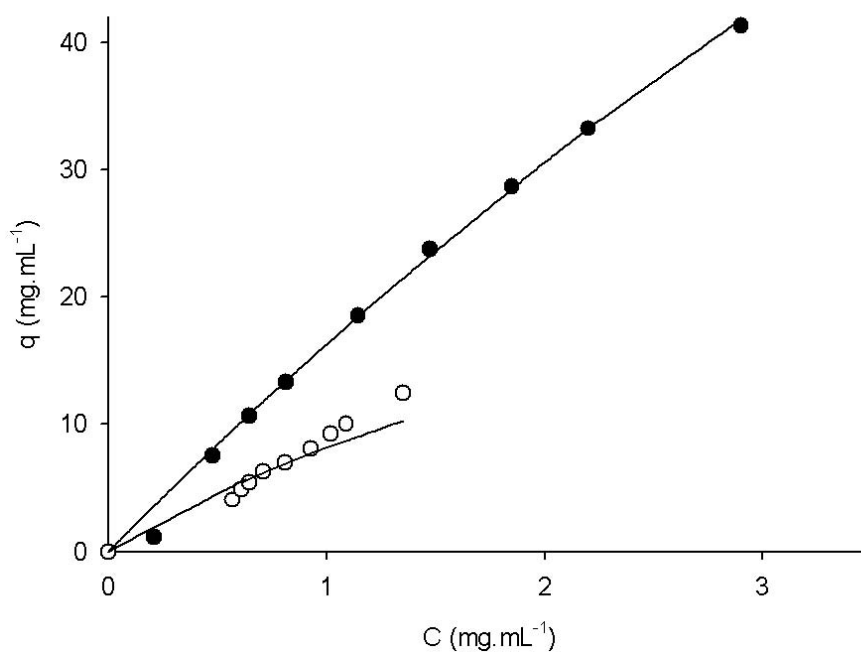


Figure 2: Adsorption isotherms to α -la and β -lg on Streamline[®] Q XL adsorbent at 3:1 proportion with fitted competitive Langmuir model. (●) α -la data, (○) β -lg data (—) predict by model. The same comportment was observed in other proportions.

5. CONCLUSIONS

Due to difficulties in obtain the intermediate plateau in traditional multi-component frontal analysis when macromolecules are studied, a modification on the technique was proposed.

The simultaneous individual frontal analysis to each component in a binary mixture with different proportions between α -la and β -lg were accomplished successfully, fact confirmed by a good fit of competitive Langmuir model to obtained data.

This paper also provide data of a more realistic system than single-component systems generally studied, being an important contribution to development and even the improvement of pilot and large scale process.

6. ACKNOWLEDGMENTS

To National Council of Research and Development – CNPq and Minas Gerais State' Foundation of Help to Research – FAPEMIG by financial support; and to Laboratory of Separation Process – LPS at Federal University of Viçosa – UFV by human support that turn possible this work.

7. SYMBOLS

- b_i equilibrium constant of adsorption to i^{th} component ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- b_j equilibrium constant of adsorption to j^{th} component ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- C_i in equation 2: concentration in solution at i^{th} step of frontal analysis (FA) method ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- C_i in equation 3: concentration in solution of i^{th} component ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- $C_{i,A}$ conc. of component A at i^{th} step of FA method ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- $C_{i,B}$ conc. of component B at i^{th} step of FA method ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- $C_{i,m}$ conc. of i^{th} component between the breakthrough curves at i^{th} step of FA method ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- C_{i+1} conc. in solution at $(i+1)^{th}$ step of frontal analysis method ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- C_j concentration in solution of j^{th} component ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- q_i amount of adsorbed solute at i^{th} step of FA method ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- q_{i+1} amount of adsorbed solute at $(i+1)^{th}$ step of FA method ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- $q_{s,i}$ maximum capacity of adsorbed i^{th} component ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- V_0 void volume of the system (mL)
- V_1 volume of solution at inflection point in first breakthrough curve (mL)
- V_2 volume of solution at inflection point in second breakthrough curve (mL)
- V_a volume of adsorbent in the bed (mL)
- $V_{F,i+1}$ volume between i^{th} and $(i+1)^{th}$ breakthrough points in FA method (mL)

8. REFERENCES

BELLOT, J. C.; CONDORET, J. S. Modelling of liquid chromatography equilibria. *Process Biochemistry*, v. 28, p. 365-376, 1993.

BELLOT, J. C.; CONDORET, J. S. Theoretical study of the ion-exchange preparative chromatography of a two-protein mixture. *Journal of Chromatography*, v. 635, p. 1-17, 1993.

BONOMO, R. C. F.; SARAIVA, S. H.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; MINIM, V. P. R.; FONTAN, R. C. I. Multicomponent adsorption of whey proteins by ion exchanger. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 6, n. 2, p. 323-326, 2003.

CAYOT, P., LORIENT, D. Structure-function relationships of whey proteins – chapter 8. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (editors) *Food proteins and their applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 226-256, 1997.

CHARTON, F.; BAILLY, M.; GUIOCHON, G. Recycling in preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 687, p. 13-31, 1994.

FONTAN, R. C. I.; MINIM, L. A.; BONOMO, R. C. F.; COIMBRA, J. S. R.; SARAIVA, S. H.; MINIM, V. P. R. Utilização de técnicas adsorptivas na purificação de proteínas do soro de queijo. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 58, n. 333, p. 210-214, 2003.

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.

GERBERDING, S. J.; BYERS, C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *Journal of Chromatography A*, v. 808, p. 141-151, 1998.

GRITTI, F.; GOTMAR, G.; STANLEY, B. J.; GUIOCHON, G. Determination of single component isotherms and affinity energy distribution by chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 988, p. 185-203, 2003.

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. Academic Press, New York, 700p., 1994.

JACOBSON, J.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C. Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 316, p. 53-68, 1984.

JACOBSON, J.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C. Measurement of competitive adsorption isotherms by frontal chromatography. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 26, p. 43-50, 1987.

JACOBSON, S.; GOLSHAN-SHIRAZI, S.; GUIOCHON, G. Isotherm selection for band profile simulations in preparative chromatography. *AIChE Journal*, v. 37, n. 6, p. 836-844, 1991.

JAMES, E. A.; DO, D. D. Equilibria of biomolecules on ion-exchange adsorbents. *Journal of Chromatography*, v. 542, p. 19-28, 1991.

QUIÑONES, I.; GUIOCHON, G. Application of different isotherm models to the description of single-component and competitive adsorption data. *Journal of Chromatography A*, v. 734, p. 83-96, 1996.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. *Análises estatísticas no SAEG*. Ed. Folha de Viçosa, Viçosa, 301p., 2001.

SKIDMORE, G. L.; CHASE, H. A. Two-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose[®] FF. *Journal of Chromatography*, v. 505, p. 329-347, 1990.

SUN, S.; YANG, G.; SUN, H.; WANG, D.; LIU, H. Determination and comparison of competitive isotherms by rectangular pulse method and frontal velocity analysis method. *Journal of Chromatography A*, v. 918, p. 13-23, 2001.

VELAYUDHAN, A.; HORVÁTH, C. Preparative chromatography of proteins – analysis of the multivalent ion-exchange formalism. *Journal of Chromatography*, v. 443, p. 13-29, 1988.

CONCLUSÃO GERAL

A cromatografia de troca iônica aplicada à purificação de proteínas vem se desenvolvendo cada vez mais nos últimos anos. Foram apresentados alguns princípios básicos sobre essa técnica e exemplos de aplicações, bem como diversos fatores que podem influenciar este processo.

Ao se trabalhar com as proteínas α -la e β -lg isoladas, em sistemas monocomponentes, verificou-se que as duas possuem comportamentos opostos. Enquanto a capacidade adsortiva da α -la decrescia com o aumento da temperatura, a da β -lg crescia sob as mesmas condições. Os modelos de isothermas de Langmuir, Toth e Jovanovic tiveram um ajuste satisfatório aos dados experimentais, indicando uma grande homogeneidade do adsorvente. Análises termodinâmicas demonstraram que o processo é espontâneo ($\Delta G_{ad}^0 < 0$), endotérmico e entropicamente dirigido, principalmente para a β -lg.

E por fim, a utilização da técnica de análise frontal monocomponente aplicada simultaneamente a mais de um componente presente em um sistema complexo mostrou-se eficiente, comprovada pelo ajuste satisfatório do modelo competitivo de Langmuir aos dados experimentais obtidos.

ANEXO

METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO POR ANÁLISE FRONTAL

1. Adsorvente e Coluna

Nos experimentos foi utilizado o adsorvente aniônico forte Streamline® Q XL (GE Health Care, Uppsala, Sweden), cujo grupo de troca é o amino quaternário. Sua matriz possui um núcleo de quartzo cristalino, forma esférica, tamanho médio da partícula de 200 μm e densidade média igual a 1200 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$, sendo estável em todos os tampões aquosos comumente usados.

O adsorvente foi empacotado em uma coluna HR 2/5 (GE Health Care) perfazendo um leito com 29 mm de comprimento e 5 mm de diâmetro. Foi feita a caracterização do leito através do método dos momentos (FURUSAWA et al., 1976), que revelou uma porosidade de leito (ε_b) e porosidade de partícula (ε_p) respectivamente iguais a 0,254 e 0,582.

2. Adsorvato

As proteínas α -lactoalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg) fornecidas pela Sigma (St. Louis, MO, USA) foram utilizadas como adsorvato. A α -la é uma proteína globular, com 14,2 kDa de massa molar e ponto isoelétrico (pI) igual a 4,8. A β -lg também é uma proteína globular, com 18,4 kDa de massa molar e pI igual a 5,2. Em valores de pH entre 5,0 e 8,0, a β -lg existe na forma de dímero, com massa molar total igual a 36,8 kDa (CAYOT e LORIENT, 1997).

3. Experimentos de análise frontal monocomponentes

Os experimentos foram conduzidos em um cromatógrafo Äkta Purifier MOD 10X (GE Health Care), usando um detector de UV com comprimento de onda fixado em 280 nm e vazão de 2,0 mL.min⁻¹.

O leito empacotado com a resina Streamline[®] Q XL foi inicialmente equilibrado com 20 volumes de coluna (VC) de uma solução-tampão de Tris-hidroximetil-aminometano (Tris-HCl, MM 121,14 g.mol⁻¹) 45 mM, pH 7,4 e temperatura constante.

Os experimentos foram desenvolvidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro temperaturas de trabalho (283,15 K; 293,15 K; 303,15 K e 313,15 K) e soluções monocomponentes de α -la e β -lg, com concentração variando de 0,1 mg.mL⁻¹ a 3,0 mg.mL⁻¹. Para assegurar a manutenção da temperatura constante, a coluna empacotada foi imersa em um banho termostático com recirculação de água e precisão de $\pm 0,1$ K, fornecido pela Quimis (Brasil). A figura 1 mostra o esquema experimental utilizado.

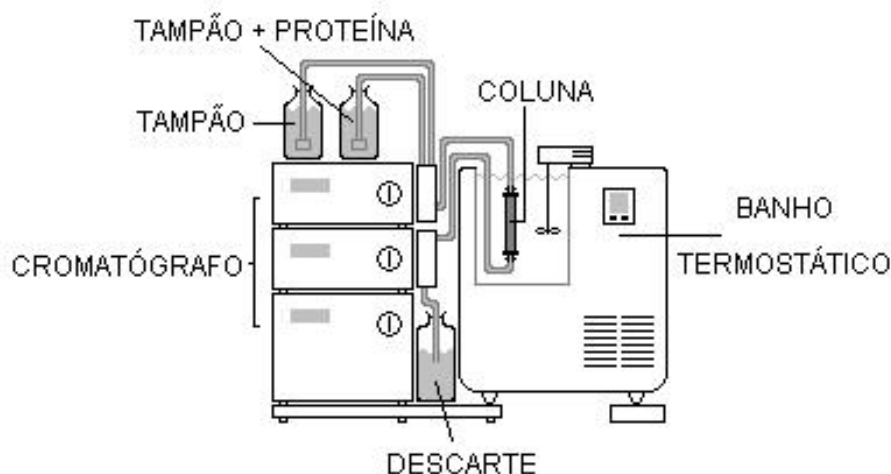


Figura 1: Representação esquemática da montagem experimental utilizada.

Após a coluna ter sido equilibrada com a solução-tampão na temperatura desejada, uma solução protéica com concentração igual a 0,1 mg.mL⁻¹ era percolada,

através do leito até a completa formação da curva de ruptura. Após a estabilização da curva na saída do leito, a concentração da solução de alimentação era aumentada para um novo valor. Esta nova solução era percolada através do leito até a formação de uma nova curva de ruptura, sendo este procedimento realizado sucessivamente até concentração final de $3,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, obtendo-se um perfil da curva obtida no experimento similar à descrita na Figura 2. Terminado cada experimento, a coluna era lavada com 10 VC de solução-tampão e regenerada com 40 VC de uma solução 1,0 M de NaCl em tampão Tris-HCl, com posterior re-equilíbrio da coluna com mais 20 VC da solução-tampão de Tris-HCl. O mesmo procedimento foi utilizado tanto para a α -la quanto para a β -lg, perfazendo um total de oito curvas de análise frontal obtidas.

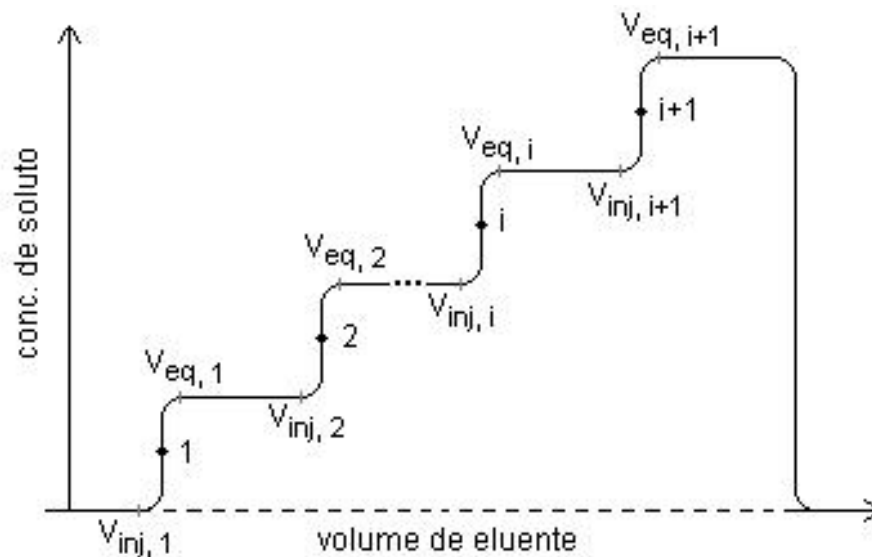


Figura 2: Perfil obtido no experimento de análise frontal.

3.1. Determinação da quantidade de soluto adsorvido no leito

A quantidade de proteína adsorvida no leito, é obtida por :

$$q_{i+1} = q_i + \frac{(C_{i+1} - C_i)(V_{F,i+1} - V_0)}{V_a} \quad (1)$$

Em que q_i e q_{i+1} são as quantidade de soluto adsorvido por volume de adsorvente (expressas em mg.mL^{-1}) no i -ésimo e no $(i+1)$ -ésimo passo, quando no equilíbrio com as concentrações C_i e C_{i+1} , respectivamente (também expressas em mg.mL^{-1}). $V_{F,i+1}$, é o volume (mL) entre o ponto de inflexão da i -ésima e a $(i+1)$ -ésima curva de ruptura, V_0 é o volume (mL) não-preenchido da coluna, e V_a é o volume (mL) de adsorvente na coluna.

Em estudos anteriores (JACOBSON et al., 1984; JACOBSON et al., 1987; GRITTI et al., 2003) a mudança de concentração de um passo para outro era realizada de modo manual. Neste trabalho, foi usada uma programação em gradiente, em que a solução tampão pura e a solução tampão com proteína (no valor máximo de concentração trabalhada) eram misturadas pelo cromatógrafo, de acordo com o programa pré-estabelecido. Por exemplo, para a concentração de proteína na entrada da coluna ser igual a $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, a solução-tampão e a solução com proteína eram misturadas em partes iguais pelo equipamento.

Com isso, em alguns passos do experimento, o equilíbrio há muito já havia sido alcançado, e a nova concentração ainda não havia começado a ser percolada através da coluna. Este fato poderia levar a erros no cálculo da quantidade de soluto adsorvida, uma vez que o valor de $V_{F,i+1}$ estaria superestimando o valor real.

Utilizou-se então um artifício para que fosse realizada a correção desse valor.

O valor de $V_{F,i+1}$ foi calculado de acordo com a seguinte expressão:

$$V_{F,i+1} = V_{i+1} - V_i - (V_{inj,i+1} - V_{eq,i}) \quad (2)$$

Em que $V_{F,i+1}$ é o volume ajustado percolado através da coluna do ponto i até o ponto $i+1$, V_{i+1} é o valor real percolado através da coluna até o ponto $i+1$, V_i é o valor real percolado através da coluna até o ponto i , $V_{inj,i+1}$ é o volume em que a

concentração de proteína é alterada para o passo $i+1$ e $V_{eq,i}$ é o volume em que a curva de ruptura do passo i é estabilizada (atinge o equilíbrio).

Desse modo foi possível calcular o valor da quantidade de soluto adsorvida em cada passo, determinando-se os pontos experimentais das isotermas de adsorção nas condições estudadas.

4. Experimentos de análise frontal multicomponentes

Dada a impossibilidade de se realizar o experimento de análise frontal multicomponente utilizando-se a metodologia proposta por Jacobson et al. (1987), devido ao fato de não se conseguir a formação do plateau intermediário nas curvas de ruptura, foi feita uma proposta alternativa, em que foi realizada a determinação simultânea das análises frontais monocomponentes para α -la e β -lg presentes em um mistura binária.

As isotermas competitivas foram determinadas em quatro diferentes proporções entre as proteínas α -la e β -lg (repectivamente iguais a 1:1; 1:3; 3:1 e 1:2), com concentração variando entre $0,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $4,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Ao longo de todo o experimento de análise frontal, alíquotas de $400 \mu\text{L}$ eram coletadas a intervalos de tempo regulares, e analisadas de acordo com a metodologia proposta por Bonomo et al. (2003).

Todos os outros procedimentos de equilíbrio, lavagem e regeneração do leito foram idênticos aos realizados nos experimentos monocomponentes, decritos no item 3 deste anexo.

5. Referências

BONOMO, R. C. F.; SARAIVA, S. H.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; MINIM, V. P. R.; FONTAN, R. C. I. Multicomponent adsorption of whey proteins by ion exchanger. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 6, n. 2, p. 323-326, 2003.

CAYOT, P., LORIENT, D. Structure-function relationships of whey proteins – chapter 8. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (editors) *Food proteins and their applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 226-256, 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.

GRITTI, F.; GOTMAR, G.; STANLEY, B. J.; GUIOCHON, G. Determination of single component isotherms and affinity energy distribution by chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 988, p. 185-203, 2003.

JACOBSON, J.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C. Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 316, p. 53-68, 1984.

JACOBSON, J.; FRENZ, J.; HORVÁTH, C. Measurement of competitive adsorption isotherms by frontal chromatography. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 26, p. 43-50, 1987.