

EDWIN ELARD GARCIA ROJAS

**SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE α -LACTOALBUMINA E β -LACTOGLOBULINA
PELA CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR APÓS A EXTRAÇÃO COM
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

EDWIN ELARD GARCIA ROJAS

**SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE α -LACTOALBUMINA E β -LACTOGLOBULINA
PELA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR APÓS A EXTRAÇÃO COM
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

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

APROVADA: 02 de agosto do 2001

Prof. Javier Telis Romero
(Co-orientador)

Prof. Luis Antonio Minim
(Conselheiro)

Prof. José Antonio Marques Pereira

Prof. Luis Henrique Mendes Silva

Prof^a Jane Sélia dos R. Coimbra
(Orientadora)

*A todos aquellos que persisten en la brega
por transformar la realidad.....Adelante !!*

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela acolhida.

Ao PADCT/CNPq (QEQ 620167/97-1) e à FAPEMIG (CAG 1162/97), pelo auxílio financeiro.

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela oportunidade, pela orientação, pelo apoio, pela amizade e pela paciência.

Ao professor Luis Antonio Minim, pela valiosa contribuição como conselheiro, pelo ensinamento, pelo apoio e pela amizade.

Aos amigos, Abraham Giraldo Zuñiga e Sérgio Henriques Saraiva, pela amizade e incansável apoio na conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Santos Garcia e Isabel Rojas, pelo carinho e pelo incentivo de seguir em frente.

Aos meus irmãos Javier, Jorge e Evelyn, pelo carinho e pelo apoio incondicional.

Aos meus amigos e companheiros Wilmer Luera e Milton Cano, pelo apoio e pela amizade.

Aos colegas do LPS (Laboratório de Processos de Separação), Renata, Lauro, Mariana, Rafael, Carol, Kelly, Alexandre, Fernanda, Cássio, Ximena e Elias pela amizade e pelo auxílio nas atividades desenvolvidas,.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Proteínas do soro de queijo.....	4
2.1.1. Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas do soro de queijo.....	5
2.2. A cromatografia como processo de separação.....	7
2.3. Cromatografia por exclusão molecular.....	9
2.3.1. Aspectos gerais do processo de CEM.....	9
2.3.2. Princípios básicos da CEM.....	13
2.3.3. Aplicações da CEM.....	14
2.3.4. Géis usados em CEM.....	16
2.3.4.1. Características da fase estacionária.....	16
2.3.4.2. Tipos de géis.....	17
2.3.5. Parâmetros avaliados na CEM.....	18
2.3.5.1. O gel.....	18
2.3.5.2. Volume e viscosidade da amostra.....	19

2.3.5.3. Vazão da fase móvel.....	21
2.3.5.4. Empacotamento da coluna	22
2.3.5.5. Produtividade.....	22
2.4. Sistemas aquosos bifásicos.....	23
2.5. Modelagem matemática aplicada à CEM.....	24
2.5.1. Modelagem da coluna cromatográfica.....	25
2.5.1.1. Estrutura do modelo.....	26
2.5.2. Formulação do modelo matemático.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Escolha do sistema de trabalho	32
3.1.1. Preparo dos sistemas de fases.....	32
3.1.2. Viscosidade.....	33
3.1.3. Densidade.....	33
3.2. Coeficiente de partição das proteínas.....	34
3.3. Determinação das condições operacionais para purificação das proteínas nas fases.....	34
3.3.1. Preparo do gel e empacotamento da coluna HR 10/10.....	34
3.3.2. Purificação das proteínas presentes nas fases.....	35
3.3.3. Determinação da resolução.....	36
3.3.4. Determinação da produtividade do processo.....	37
3.4. Análises das frações obtidas na purificação das fases.....	37
3.4.1. Análise e quantificação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina	37
3.4.2. Elaboração da curva de calibração.....	38
3.5. Modelagem matemática da CEM.....	38
3.5.1. Determinação da porosidade do leito.....	38
3.5.2. Determinação da porosidade da partícula.....	38
3.5.3. Determinação da porosidade acessível da partícula para o soluto.....	39
3.5.4. Solução numérica do modelo.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41

4.1. Seleção do sistema de trabalho.....	41
4.1.1. Avaliação das viscosidades nas fases dos SAB.....	41
4.1.2. Coeficiente de partição.....	43
4.2. Determinação das condições operacionais para CEM.....	44
4.2.1. Influência do volume da amostra sobre a resolução.....	45
4.2.2. Influência da vazão da fase móvel sobre a resolução.....	48
4.2.3. Influência do tamanho da partícula sobre a resolução.....	49
4.2.4. Determinação da produtividade do processo.....	50
4.2.5. Determinação das condições operacionais ótimas para CEM.....	52
4.3. Análises das frações obtidas na purificação das fases.....	56
4.4. Modelagem matemática da CEM.....	60
4.4.1. Determinação dos parâmetros físicos do modelo.....	60
4.4.2. Cálculo dos parâmetros de transferencia de massa.....	61
4.4.3. Influência dos parâmetros de transferência de massa sobre o espalhamento dos picos no modelo de CEM.....	62
4.4.3.1. Influência do número de Pe	62
4.4.3.2. Influência do parâmetro Bi	65
4.4.3.3. Influência do parâmetro η	68
4.4.4. Resultado da solução numérica do modelo.....	71
4.4.5. Influência do volume de amostra injetado.....	73
5. CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

RESUMO

ROJAS, Edwin Elard Garcia, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001. **Separação e purificação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina pela cromatografia por exclusão molecular após a extração com sistemas aquosos bifásicos.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-orientador: Javier Telis Romero. Conselheiro: Luis Antonio Minin.

Neste trabalho, foi utilizada a cromatografia por exclusão molecular (CEM) para purificação das proteínas do soro de queijo α -lactoalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg) presentes, respectivamente, nas fases polimérica e salina de sistemas aquosos bifásicos (SAB), compostos por polietilenoglicol (PEG), água e fosfato de potássio (FFP).

As viscosidades das fases foram o parâmetro empregado para selecionar a concentração de soro de queijo a ser adicionada aos SAB. Usando os dados de viscosidade, foi escolhido para estudo o SAB composto por 18% PEG 1500 + 18% FFP + 10% de soro de queijo + 54% água, (%peso/peso).

Partindo deste sistema, foram determinadas as melhores condições operacionais para a CEM: 4,0 mL/min de vazão e 0,5 mL de volume de amostra para a fase polimérica e 2,0 mL/min de vazão e 0,5 mL de volume de amostra para a fase salina. Nestas condições, a resolução, a produtividade e o grau de purificação foram, respectivamente, de 1,53, 0,43 mg.(mL.h)⁻¹ e 99,7% para a fase salina e de 1,29, 0,31 mg.(mL.h)⁻¹ e 99,6% para a fase polimérica. A resina que melhor se adequou ao processo de separação foi a Shepadex G-25® médio (50-150) μ m. Na modelagem do processo cromatográfico, foi empregado

um modelo matemático considerando dispersão axial na coluna e difusão radial em cada partícula. Foram calculados os parâmetros de transferência de massa por meio de regressão não linear, utilizando o método de programação quadrática sucessiva. A modelagem levou a resultados satisfatórios descrevendo, adequadamente, o processo cromatográfico de exclusão molecular.

ABSTRACT

ROJAS, Edwin Elard Garcia, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August 2001.

Separation and purification of α -lactalbumin and β -lactoglobulin using size exclusion chromatography after aqueous two-phase systems extraction.

Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Co-adviser: Javier Telis Romero.

Committee member: Luis Antonio Minin.

Size exclusion chromatography (SEC) was used in this work to purify the cheese whey proteins α -lactalbumin (α -la) and β -lactoglobulin (β -lg) present, respectively, in the polymeric and saline phases of aqueous two phase systems (ATPS), composed by polyethyleneglycol (PEG), water and potassium phosphate (FFP). The phase viscosities where the parameters applied to choose whey proteins concentration to be added into the ATPS. It was selected the ATPS formed by 18% (w/w) PEG 1500 + 18% (w/w) FFP + 10% (w/w) of cheese whey + 54% water.

Based on this system, the best operational conditions for SEC were 4,0 mL/min of flow rate and 0,5 mL of sample volume for the polymeric phase and 2,0 mL/min of flow rate and 0,5 mL of sample volume for the saline phase. Under these conditions, resolution, productivity and purification degree were, respectively, of 1.53, 0.43 mg.(mL.h)⁻¹ and 99.7% for the saline phase and 1.29, 0.31 mg.(mL.h)⁻¹

¹ and 99.6% for the polymeric phase. The resin that best fit the purification process was ShepadexG-25® medium (50-150 μm).

A mathematical model with axial dispersion in the column and radial diffusion in each particle was used to model the chromatographic process. Mass transfer parameters were calculated by means of non-linear regression, using the successive quadratic programming method. The process was successfully described by the model

1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo é um subproduto da indústria de laticínios e contém, aproximadamente, 20 % da composição protéica original do leite. São comercializados no mercado derivados de leite processados, tal como o soro de leite em pó, com diferentes graus de concentração de proteínas do soro, o que aumenta o valor agregado desse subproduto. Embora usado como ingrediente alimentício, o soro apresenta ainda um grande potencial para outras aplicações. As proteínas do soro de queijo possuem elevado valor funcional e nutricional; podem ser empregadas como espumantes, emulsificantes e possuem capacidade para substituir outros compostos mais dispendiosos como, por exemplo, a ovoalbumina nos produtos cárneos, nos de panificação e na fortificação de cereais. A β -lactoglobulina (β -lg) e a α -lactoalbumina (α -la) são as proteínas presentes em maior quantidade no soro de queijo, (2 a 4) g/L e (1 a 1,5) g/L, respectivamente (MORR e HÁ, 1993).

No ano 2000, a produção mundial de soro de queijo e de suas proteínas foram estimadas em torno de 90×10^9 L e 540×10^6 kg, respectivamente (MCINTOSHI et al., 1998). Devido ao alto valor agregado e à vasta aplicabilidade das proteínas do soro de queijo tanto em quantidade como em qualidade, justifica-se o desenvolvimento de processos de separação e purificação dessas biomoléculas.

Na separação de produtos biológicos, podem ser utilizados, entre outros, os métodos cromatográficos tendo em vista sua elevada eficiência de separação. Destes, destaca-se a cromatografia por exclusão molecular (CEM).

Esta técnica é empregada para o isolamento de macromoléculas desde 1959 (IRVINE, 1997), e tem por fundamento o tamanho molecular das mesmas (GARCIA et al., 2000). Assim, compostos com massas moleculares diferentes são separados em tempos de retenção diferentes. É uma metodologia de fácil execução empregada para a determinação da massa molecular de substâncias, para o fracionamento de compostos e para a separação de grupos de misturas multicomponentes como, os sais e as proteínas (NIELSEN, 1998 ; IRVINE, 1997).

Neste trabalho, foi utilizada a CEM para purificar as proteínas α -la e β -lg presentes, respectivamente, nas fases polimérica e salina de sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por polietilenoglicol (PEG) + água + fosfato de potássio (FFP). Os SAB foram empregados no pré-tratamento do processo de purificação das proteínas do soro de queijo via extração líquido-líquido, visando separá-las e concentrá-las, inicialmente, em fases distintas.

Os SAB resultam da incompatibilidade, em solução, de dois polímeros como, por exemplo, o PEG e a dextrana ou entre um polímero e um sal tal como o PEG e o fosfato de potássio (COIMBRA, 1995).

Na CEM, são excluídas as moléculas maiores do que os volumes dos poros da partícula do gel a ser usado no processo de purificação. Para a separação de proteínas das fases polimérica e salina dos SAB, os compostos de menor massa molecular presentes, como o sal (FFP) e o PEG, penetram no interior dos poros das partículas produzindo um retardamento no tempo de retenção dos mesmos em relação ao tempo de retenção das proteínas.

Para o estudo do emprego da CEM na purificação de α -la e β -lg das fases dos SAB foram avaliados neste trabalho:

- A influência de diferentes concentrações de soro de queijo sobre as viscosidades das fases salina e polimérica de sistemas aquosos bifásicos compostos por 18% (p/p) polietilenoglicol 1500 + 18% (p/p) fosfato de potássio + 64% (p/p) água.
- As condições operacionais ótimas da cromatografia por exclusão molecular para a purificação das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina das fases dos sistemas aquosos analisados.
- O grau de purificação das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina obtidas por cromatografia por exclusão molecular
- A modelagem e a análise matemática do processo de separação das proteínas das fases, usando CEM.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Proteínas do soro de queijo

O conteúdo de proteínas no soro de queijo é de (6 a 9) g/L, o que representa um grande potencial disponível (WIT, 1998). A tabela 2.1 mostra a concentração média das proteínas presentes no soro de queijo *in natura*, onde pode-se observar que a α -lactoalbumina (α -la) e a β -lactoglobulina (β -lg) possuem maior concentração.

Tabela 2.1- Concentração das proteínas no soro de queijo

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

Fonte: Fennema, 1993

A α -la é uma molécula constituída por 123 resíduos de aminoácidos. O triptofano é o aminoácido mais abundante nesta proteína. A massa molecular estimada da α -la é de 14,2 kDa. O ponto isoelétrico é de 5,1, sendo facilmente desnaturada em pH 6,7 a 65,2 °C. É encontrada no soro de queijo, com uma concentração média aproximada de 1,5 g/L. Exibe uma seqüência homóloga à da

lisozima, além de ser parte da enzima galactosil transferase, tomando parte na biossíntese da lactose (CAYOT e LORIENT, 1997; MORR e HÁ, 1993).

A β -lg, é encontrada no soro de queijo, com uma concentração que varia de (2 a 4) g/L. É constituída por 162 resíduos de aminoácidos; massa molecular de aproximadamente 18,3 kDa, ponto isoelétrico de 5,3; é termolábil e apresenta mudanças conformacionais reversíveis a temperaturas inferiores a 70 °C. Temperaturas elevadas podem provocar a desnaturação e a polimerização irreversível desta proteína, que é considerada um ótimo agente de gelatinização (MORR e HÁ, 1993).

2.1.1. Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas do soro de queijo

O soro de queijo tem a vantagem de ser uma fonte de proteínas de baixo custo além de não necessitar de pré-tratamento para o seu processamento em larga escala. Uma maneira de reutilizar as proteínas de soro para o consumo humano é empregá-las em formulações alimentícias (WIT, 1998).

Uma área de interesse dentro desse segmento relaciona-se com a alimentação infantil e de pacientes que necessitam da administração de alimentos por via enteral. Como o soro de queijo é praticamente o leite bovino de onde foi retirada a fração de caseína, ele é qualificado para o emprego na formulação de alimentos infantis em substituição ao leite materno. Entretanto, deve-se considerar que o uso direto do soro em leites infantis, eleva o conteúdo de β -lg quando comparado ao leite materno. Este último apresenta somente resíduos de β -lg, considerada o maior componente alergênico do leite bovino (MÄKINEN-KILJUNEN e PALOUSUO, 1992).

A característica alergênica da β -lg deve-se à sua estrutura compacta e ao empilhamento de nove “folhas” em conformação β . As duas pontes dissulfeto a tornam resistente à proteólise completa pelas enzimas digestivas, vindo daí, em parte, sua condição alergênica (CAYOT e LORIENT, 1997).

A separação de β -lg do soro produzirá, então, uma fração pobre em β -lg, mas com elevadas propriedades químicas, físicas e nutricionais devido à presença

das outras proteínas que compõem o soro (CHIANCONE e GATTONI, 1993 ; SMITHERS et al., 1996).

As proteínas α -la, β -lg, lactoferrina, lactoperoxidase, imunoglobulinas e glicomacropeptídios provocam em grande quantidade, efeitos biológicos observados em estudos feitos em animais e em humanos, além de apresentarem atividades anti-carcinogênicas e de influenciarem nas atividades digestivas (MCINTOSHI et al., 1998). Algumas propriedades destas proteínas podem ser observadas na tabela 2.2

Tabela 2.2 - Função Biológica das Proteínas do soro de queijo

Proteína	Função Biológica
Proteínas do soro em geral	Anti-carcinogênicas Aumento da resistência do sistema imunológico Aumento da longevidade do organismo Hipocolesterolêmica
β -lactoglobulina	Digestiva Suplemento alimentício
α -lactoalbumina	Anti-carcinogênica Regula o sono e a vigília
Lactoferrina	Antimicrobiana Regulador de transporte de metais Aumento da resistência do sistema imunológico Antiinflamatório Anti-carcinogênica
Lactoperoxidase	Antimicrobiana

Fonte: MCINTOSHI et al., 1998 ; GRASELLI et al., 1997

2.2. A Cromatografia como processo de separação

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura. É realizada pela distribuição dos compostos entre duas fases que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através da fase estacionária. Durante a passagem da fase móvel pela estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre ambas, de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (COLLINS et al., 1997). Em um processo de purificação de biocompostos podem ser empregados diferentes técnicas cromatográficas que são fundamentadas nas várias formas de interação que podem ocorrer entre o componente e a fase estacionária.

A cromatografia pode ser aplicada em nível analítico ou preparativo. Segundo PEREIRA (1999), o principal objetivo da cromatografia analítica é a obtenção de uma elevada resolução na separação dos solutos durante o tempo de retenção. Amostras diluídas são aplicadas em pequenos volumes, (1 a 5)% do volume total da coluna, para minimizar interações entre cada componente do sistema cromatográfico. Por outro lado, o foco da separação em escala preparativa (comercial) não é somente a resolução, mas também o custo global do processo. Neste caso, o método básico para elevar a produtividade é a maximização do uso da coluna por meio do aumento do volume de injeção da mistura a ser separada.

A cromatografia líquida preparativa, em grande escala, é uma técnica importante para isolar e purificar mistura de biomoléculas como as proteínas, os peptídios, os aminoácidos, as enzimas, entre outras (ASENJO, 1990; FALLOW, 1993).

A Tabela 2.3 apresenta algumas operações cromatográficas usadas na purificação de proteínas. Dentre essas técnicas, podem ser citadas a troca iônica, a interação hidrofóbica e a exclusão molecular.

Na prática, usa-se a cromatografia por exclusão molecular na etapa final do processo de purificação visando: a) mudar a fase móvel por outra que possa ser volatilizada durante uma etapa posterior de liofilização ou de concentração, e b)

remover as moléculas contaminantes de baixa massa molecular como os sais, o polipropileno, os detergentes não iônicos, entre outros (FALLOW, 1993).

A aplicação mais conhecida da CEM, no processo de purificação de soluções protéicas, é a dessalinização, o que ocorre em condições onde não há desnaturação das proteínas.

Tabela 2.3 - Operações cromatográficas usadas na purificação de proteínas

Propriedades físico-químicas	Operação	Características	Usos
Forças de Van der Waals, polaridade, momento Dipolar	Adsorção	Alta resolução, boas capacidade e velocidade	Sorção, fracionamento
Carga	Troca Iônica	Altas resolução, velocidade e capacidade	Sorção inicial, fracionamento
Superfície hidrofóbica	Interação hidrofóbica	Boas resolução, velocidade e capacidade	Fracionamento parcial
Afinidade biológica	Afinidade	Excelente resolução, altas capacidade e velocidade	Fracionamento, adsorção
Tamanho molecular	Exclusão molecular	Moderada resolução, baixa capacidade	Dessalinização, troca de tampão, purificações
Interação hidrofóbica	Fase reversa	Excelente resolução e capacidade intermédia	Fracionamento

Fonte: Asenjo (1990)

2.3. Cromatografia por exclusão molecular (CEM)

2.3.1. Aspectos gerais da CEM

Esta técnica foi introduzida em 1959, com o nome de filtração gélica. É um método cromatográfico do tipo líquido-líquido, capaz de separar os componentes de uma mistura, com base nas suas dimensões moleculares usando, para tanto, um leito composto por partículas eletricamente descarregadas (LOUGH et al., 1996).

A partição ocorre devido ao acesso diferenciado das moléculas de tamanhos variados nos volumes dos poros das partículas que compõem o gel de filtração. Os compostos de baixas massas moleculares, como os sais, penetrarão no poro e terão um volume de retenção igual ao volume interno do poro ocupado pelo solvente por serem pequenos quando comparados com o tamanho do poro do gel de filtração. Se os compostos apresentarem tamanho intermediário, somente penetrarão uma parte do volume do poro. Quando forem muito grandes, seu volume de retenção será igual ao volume intersticial da coluna, como é o caso de proteínas (PHARMACIA BIOTECH, 1998).

Segundo FISCHER (1974), na CEM, as moléculas maiores migram com maior velocidade através do leito, enquanto as menores são retardadas. Para determinados grupos de substâncias existe uma correlação muito íntima entre a massa molecular (ou tamanho molecular) e seu tempo de retenção.

Na prática, o tempo de retenção é relacionado diretamente às dimensões moleculares, como pode ser observado na figura 2.1. As moléculas maiores sairão primeiro (A), as médias serão retardadas (B) e as menores serão retidas (C) penetrando nos poros da partícula e aumentando seu tempo de retenção.

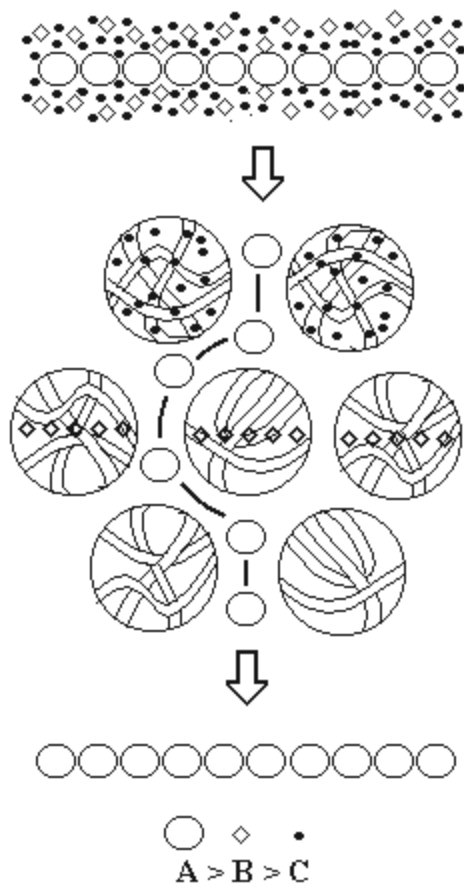


Figura 2.1 Representação esquemática do processo de CEM

A saída das moléculas em tempos diferentes expressa o grau de separação que, em cromatografia, é definido como resolução.

Segundo RAHMS (1993) e conforme a Fig 2.2, a resolução (R_s) pode ser expressa como uma relação entre a distância entre os picos separados (ΔV_R) e a média das larguras de suas respectivas bases $[(\Delta W_{H1} + \Delta W_{H2}) / 2]$.

Idealmente, um pequeno volume de uma solução de uma mistura multicomponente injetada em uma coluna cromatográfica, seria totalmente separado se cada soluto fosse eluído em volumes de retenção diferentes. Dois picos gaussianos serão efetivamente separados se a R_s for igual a 1. Quando R_s for maior ou igual a 1,5, a separação será excelente e sem sobreposição (FISCHER, 1974). Valores de R_s maiores que 1,5 indicam uma boa separação de dois componentes, quando ambos estão presentes em proporções aproximadamente iguais. Adicionalmente, R_s maiores que 1,5 serão também alcançadas quando um dos componentes estiver em excesso em relação ao outro.

A resolução pode ser aumentada de várias formas, como, por exemplo, usando uma coluna de maior comprimento, um gel de partículas de melhor seletividade, um volume de amostra pequeno ou baixas vazões (LOUGH e WAINER, 1996).

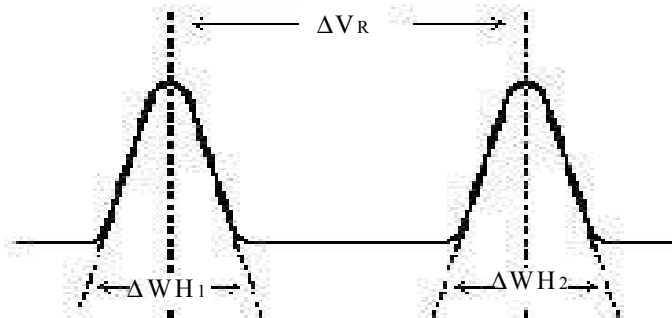


Figura 2.2 Separação eficiente de dois componentes

Segundo FALLOW et al. (1993), a R_s pode ser expressa por meio de uma equação, em função de três fatores fundamentais: o de seletividade (α), o de retenção $\left[\frac{K'^B}{1 + K'^B} \right]$ e o número de pratos teóricos (N). Assim:

$$R_s = \frac{1}{4} * [\alpha - 1] * \left[\frac{K'^B}{1 + K'^B} \right] * N \quad (1)$$

em que:

K'^B : capacidade de retenção

Esses três fatores podem ser otimizados independentemente. O fator de seletividade (α) quantifica a capacidade de separação para dois componentes, sendo o mais importante na determinação da resolução. Deve ser diferente de 1 pois, caso contrário, não haverá resolução. A seletividade pode ser alterada com variações na temperatura ou na composição da fase móvel ou da fase estacionária. O melhor método é, ainda alterar a natureza da fase móvel, o que implicará em melhorar a seletividade com pequena influência sobre o fator de capacidade. Mudar a fase estacionária não é prático, e modificar a temperatura tem um efeito mais pronunciado em cromatografia de troca iônica do que em outros métodos cromatográficos. O valor de seletividade ótimo, normalmente, é alcançado por tentativa e erro. Deve-se ressaltar que variações na seletividade levam a modificações na difusão molecular.

O fator de retenção deve ser necessariamente considerado quando K'^B for pequeno. Em situações onde os compostos são retidos fortemente, variará pouco e poderá ter uma influência desprezível sobre a resolução.

O número de pratos teóricos (N) expressa o fator de eficiência de coluna e poderá ser aumentado usando uma coluna mais longa, diminuindo o tamanho das partículas do gel ou otimizando a vazão de alimentação do processo.

2.3.2. Princípios básicos da CEM

O principal mecanismo que governa a separação por CEM deve-se ao efeito estérico durante a exclusão, ou a retenção dos compostos de diferentes tamanhos que atravessam o leito cromatográfico. Este comportamento está relacionado com alterações na entropia do sistema produzido pelas moléculas que penetram na fase estacionária. A extensão das alterações entrópicas depende tanto das dimensões das macromoléculas quanto dos poros da matriz gélica. Assim, o tempo que a macromolécula leva para atravessar a fase estacionária é um parâmetro importante na CEM, sendo utilizado para representar o grau de retenção dos compostos. O tempo de retenção aumenta com a redução do tamanho do composto e decresce com o aumento do volume acessível da fase estacionária. A retenção de macromoléculas em cromatografia líquida pode ser expressa por (BEREK, 2000):

$$k_d = \frac{C_s}{C_m} = \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right) = \exp\left(\frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT}\right) \quad (2)$$

Em que k_d é o coeficiente de partição; C_s e C_m são as concentrações de soluto nas fases estacionária e móvel, respectivamente; ΔG , ΔS e ΔH são as variações de energia livre de Gibbs, entropia e entalpia no sistema, respectivamente; R é a constante universal dos gases ideais e T é a temperatura de processo. Na condição de idealidade a variação entálpica no processo de exclusão pode ser considerada igual a zero e o coeficiente de partição pode ser dado por:

$$k_d = \frac{C_s}{C_m} = \exp\left(\frac{\Delta S}{R}\right) \quad (3)$$

em que ΔS é a redução da entropia no sistema, devido às moléculas que penetram nos poros das partículas do leito.

2.3.3. Aplicações da CEM

Teoricamente, dois tipos de separações podem ser identificados na CEM para aplicações tanto na escala preparativa quanto em nível analítico. Em um deles, as substâncias com elevadas massas moleculares são separadas das com baixas massas moleculares. É a separação por grupos de compostos ou dessalinização; assim chamada, mesmo que os sais não estejam envolvidos no processo. No outro tipo, as substâncias apresentam massas moleculares próximas, sendo separadas dentro da faixa de fracionamento do gel, isto é, não existe uma classe definida de compostos que penetram no poro do gel. Pode haver sobreposição na migração dos constituintes durante sua eluição. É a separação por fracionamento (FISCHER, 1974).

O emprego da dessalinização antecedendo uma etapa de concentração é uma técnica eficiente e rápida comparada com outros métodos, tal como a diálise.

Na Figura 2.3, observa-se a dessalinização da proteína BSA (albumina de soro bovino), em escala de laboratório, usando Shepadex® G-25 (superfino). Foram obtidos bons resultados com este processo de purificação de BSA (PHARMACIA BIOTECH, 1998).

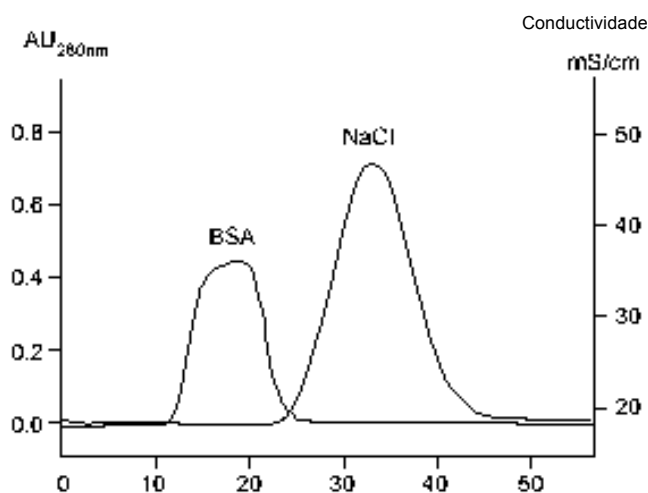


Figura 2.3 Dessalinização de BSA em escala de laboratório (PHARMACIA BIOTECH, 1998).

Dentro das aplicações em nível industrial, as colunas cromatográficas devem ser avaliadas de acordo com suas condições de uso. Por exemplo, a coluna BPSS (“Bio Procesos Stainless Steel”, Pharmacia Biotech) é utilizada em grande escala na etapa de dessalinização de biocompostos em geral (PHARMACIA BIOTECH, 1998).

Para o fracionamento em escala industrial, pode-se conectar três colunas de BPSS em série, tal como mostrado na Figura 2.4, e obter um melhor resultado final.

O fracionamento de substâncias para a separação de moléculas com massas moleculares próximas é usado na análise e na purificação de peptídios, de proteínas, de enzimas e de hormônios (IRVINE, 1997).

A CEM é também aplicada na determinação da massa molecular de proteínas nativas ou desnaturadas, em diferentes condições de pH, de temperatura e de força iônica. Permite ainda a obtenção da massa molecular de polímeros naturais ou sintéticos, essencial para o controle de qualidade destes mesmos polímeros.



Figura 2.4 Fracionamento em nível industrial por filtração em gel usando três colunas (30 cm comprimento por 140 cm de diâmetro interno) conectadas em série; produção total de 1500 L. (PHARMACIA BIOTECH, 1998).

2.3.4. Géis usados em CEM

2.3.4.1. Características da fase estacionária

De acordo com GARCIA et al. (2000), a característica peculiar da CEM em relação aos outros tipos de cromatografia de partição é que o material que forma a fase estacionária no leito cromatográfico, é constituído por um gel sem carga. Este gel apresenta turgescência no mesmo solvente que escoar como fase móvel através do leito. Os géis típicos utilizados em CEM são compostos por macromoléculas com grande afinidade com o solvente empregado.

O gel é uma rede tridimensional, cuja estabilidade mecânica é devida às ligações cruzadas em sua estrutura. Os espaços vazios não ocupados pelo material estrutural é preenchido pelo líquido usado como solvente. Muitas substâncias, tais como os polissacarídeos de frutas, os de raízes, as proteínas, os silicatos inorgânicos e os fosfatos, podem formar géis. A combinação adequada destes compostos com um agente de reticulação pode originar um gel em presença de solventes compatíveis. Os géis reagem de forma diferenciada à remoção ou a adição de líquidos. Em alguns casos, quando o líquido é retirado (secagem) e/ou reincorporado, o gel não retorna ao seu estado inicial (FISCHER, 1974).

A microestrutura do gel pode ser homogênea ou heterogênea. No primeiro caso, os géis apresentam propriedades que indicam uma distribuição homogênea da matriz. Estes géis são usualmente mais macios e possibilitam a entrada de moléculas de pequena massa molecular. Os géis de estrutura heterogênea têm regiões com grande concentração de matriz e outras quase destituídas de matriz. Essa estrutura com grandes espaços permite a entrada de moléculas maiores (YOST et al., 1980).

É desejável que os géis que apresentam constituição química semelhante possuam faixas de fracionamento diferentes, visando adequar a técnica cromatográfica às diversas situações encontradas.

Para os géis microrreticulados (estrutura homogênea) o intervalo de fracionamento é determinado pelas propriedades durante o entumescimento que, por sua vez, depende da maior ou de menor quantidade de matriz. Variando o conteúdo da matriz de 50 % para 5 % (p/v) em água, o limite de exclusão varia para a massa molecular, entre (1.000 a 500.000) Da. Os géis macrorreticulados (estrutura heterogênea) podem ser produzidos com a mesma quantidade de matriz mas exibem propriedades variáveis devido à sua composição estrutural (ALTGELT, 1968; RAHMS, 1993).

2.3.4.2. Tipos de géis

Os diferentes tipos de géis empregados na CEM variam de acordo com o material e a forma de fabricação, e o limite de exclusão molecular (LEM). Dentre os principais tipos de géis, destacam-se os de dextrana (Shepadex®), os de poliacrilamida (Bio-Gel®) que foram os primeiros a serem estudados, os de agar e agarose (Sheparose®, Gelarose®, Bio-gele® Sagarav®), Shepacril®, Sheparoce® CL e os rígidos do tipo divinilbenzeno (Shodex®) (IRVINE, 1997; FISCHER, 1974).

Os géis de dextrana são polímeros de anidroglicose produzidos pela fermentação da sacarose por diferentes cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, são artificialmente tratados com epícloridrina (agente de cruzamento ou de reticulagem). Como os poros dos géis são formados pelo intercruzamento das moléculas constituintes, quanto maior a percentagem do agente de cruzamento menor o tamanho do poro. Os géis de Shephadex® apresentam elevado teor de hidroxilas, forte caráter hidrofílico, elevada turgescência em água ou em soluções aquosas e são estáveis entre pH 2 e 11. O limite de exclusão de massa molecular localiza-se entre (700 a 800.000) Da, mas são susceptíveis a ataques fúngicos quando hidratados (COLLINS et al., 1997).

Os géis de dextrana, como o Shepadex® G-25, podem ser úteis na dessalinização ou na remoção de compostos de baixa massa molecular de soluções contendo proteínas (COLLINS et al., 1997; PHARMACIA BIOTECH, 1999).

Segundo FISCHER (1974) o gel Shepadex® G-25 também é usado quando for necessário mudar o tampão inicial (que contém certa biomolécula a purificar) antes de uma etapa de concentração ou de liofilização, para evitar problemas de corrosão no equipamento ou eliminar substâncias estranhas à biomolécula. A Tabela 2.4 mostra algumas características físicas e operacionais de diferentes tipos de géis. A seleção do tamanho da partícula é determinada pelo tipo de separação.

2.3.5. Parâmetros avaliados na CEM

2.3.5.1. O gel

O gel adequado para a CEM deve apresentar características específicas, tais como: ser quimicamente inerte e estável, apresentar baixo teor de grupos iônicos, ter uniformidade de tamanho e de distribuição de partículas e possuir elevada rigidez mecânica para não ser deformado pelas forças causadas pelo escoamento do líquido através da coluna. Segundo COLLINS et al. (1997), as partículas pequenas levam a melhor resolução e eficiência na separação, mas a resistência ao escoamento é maior em uma coluna com partículas pequenas. No entanto, deve-se considerar que o aumento do tamanho das partículas resulta em espalhamento do pico. Portanto, deve-se associar as melhores condições de escoamento à menor resistência e estabelecer as condições mais adequadas. De maneira geral, os géis são fabricados na forma esférica para facilitar o escoamento.

Tabela 2.4 Principais géis usadas na CEM

Gel	LEM (proteínas)	Tamanh o partícul a (μm)	NºPrat os teórico s N/m^2	Estabil i-dade ao pH	Vazão máxima (cm^3/h)
Sephacryl S-100 HR®	1×10^3 - 100×10^3	25-75	>9000	2-11	20-39
Sephacryl S-200 HR®	5×10^3 - 250×10^3	25-75	>9000	2-11	20-39
Sephacryl S-300 HR®	10×10^3 - $x 1.5 \times 10^6$	25-75	>9000	2-11	24-48
Sephacryl S-400 HR®	$x 10^3$ - $x 10^6$	25-75	>9000	2-11	33-63
Sephacryl S-500 HR®	N.D.	25-75	>9000	2-11	24-48
Sepharose CL- 6B®	10×10^3 - 4×10^6	40-165	N.D.	3-13	30
Sepharose CL- 4B®	60×10^3 - 20×10^6	40-165	N.D.	3-13	26
Sepharose CL- 2B®	70×10^3 - 40×10^6	60-200	N.D.	3-13	15
Sepharose 6B®	10×10^3 - 4×10^6	45-165	N.D.	4-9	14
Sepharose 4B®	60×10^3 - 20×10^6	45-165	N.D.	4-9	11.5
Sepharose 2B®	70×10^3 - 40×10^6	60-200	N.D.	4-9	10
Sephadex G-10®	- 700	2-3	N.D.	2-13	2-5
Sephadex G-25®	1×10^3 - 5×10^3	4-6	N.D.	2-13	2-5
Sephadex G-50®	1.5×10^3 - 30×10^3	9-11	N.D.	2-10	2-5

	10^3				
Sephadex G-100®	$4 \times 10^3 - 150 \times 10^3$	15-20	N.D.	2-10	2-5
Sephadex G-200®	$5 \times 10^3 - 600 \times 10^3$	30-40	N.D.	2-10	2-5
Fonte: Garcia et al. (2000)		N.D.= não definido			

2.3.5.2 Volume e viscosidade da amostra

No uso da CEM para fracionamento de compostos, para que seja alcançada uma boa resolução, a quantidade de amostra injetada na coluna deve ser pequena em relação ao volume da mesma. Sugere-se injetar um volume de amostra entre (1 a 5)% do volume total da coluna. Na Figura 2.5, pode-se visualizar a influência do volume de injeção de uma amostra de solução de proteína sobre a resolução em uma coluna operando com uma vazão de 6 mL/min de fase móvel (PHARMACIA BIOTECH, 1999). Já no emprego da CEM para separações de grupos este volume pode ser aumentado até cerca de 30%, do volume total da coluna, desde que não haja diluição excessiva da amostra.

A viscosidade é um importante parâmetro físico que auxilia na caracterização das propriedades de escoamento de uma solução. Vários fatores tais como: a temperatura, a pressão, o tempo e a estrutura molecular podem afetar a viscosidade. Altas viscosidades causam instabilidade, escoamento irregular e alteram a separação dos picos dos solutos que compõem a mistura, reduzindo o desempenho da coluna (LIANG, 2000; BROYLES 1998). Já uma amostra com baixa viscosidade tende a levar à obtenção de uma boa resolução.

Como a viscosidade depende de forças interativas existentes entre as moléculas e estas forças estão relacionadas com as distâncias entre as moléculas, um aumento na pressão poderá acarretar uma elevação da viscosidade (LIANG, 2000). Para JAMES e MORRIS (1964), a viscosidade da amostra influencia a eficiência da separação cromatográfica dos solutos uma vez que quanto maior a viscosidade, maior a resistência ao fluxo na coluna. Os

autores recomendam usar soluções com viscosidades inferiores a 5 cP nas análises cromatográficas visando obter maiores eficiências.

Segundo CASTELLS (1997), na CEM, o aumento da viscosidade da amostra injetada na coluna diminuiu a resolução dos picos cromatográficos. Em muitos casos, na cromatografia em nível analítico, uma elevada viscosidade da amostra aumenta extremamente o tempo de análise. O mesmo acontece na cromatografia preparativa: maiores concentrações de soluto e maiores volumes injetados no sistema produzem fragmentação dentro das bandas, e migração do soluto em diferentes velocidades (CASTELLS et al., 1997; BROYLES et al., 1998).

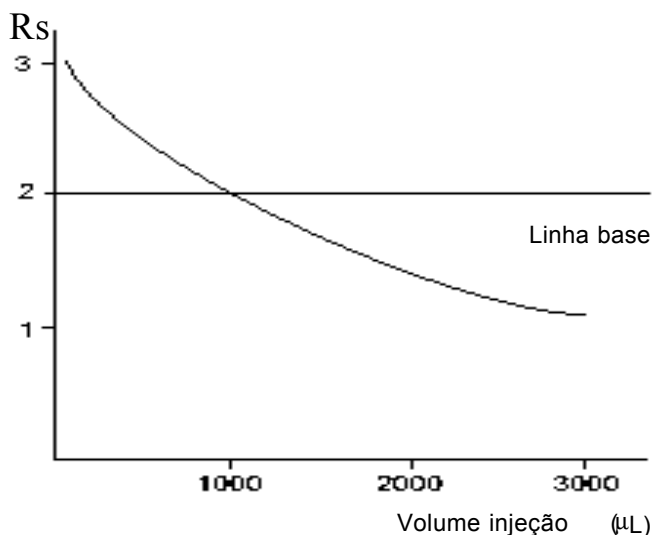


Figura 2.5 Influência do volume de injeção sobre a resolução (PHARMACIA BIOTECH, 1999)

2.3.5.3. Vazão da fase móvel

Em alguns trabalhos de pesquisa, foi observado que a resolução decresce com o aumento da vazão da fase móvel (LEVISON et al., 1996; RICKER e SANDOVAL, 1996). Na Figura 2.6, pode-se observar este comportamento da vazão da fase móvel sobre a resolução no processo de dessalinização de proteínas, usando-se 500 µL de amostra. De acordo com a PHARMACIA BIOTECH (1999), a vazão de 2 mL/min foi adequada para a separação de

proteínas em colunas de laboratório (HR 10/10), no entanto, com o aumento da vazão até 10 mL/min não foi verificado uma diminuição dramática da resolução.

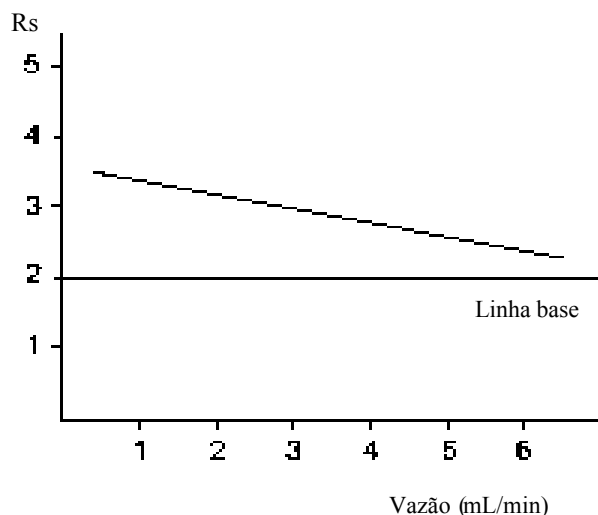


Figura 2.6 Influência da vazão da fase móvel sobre a resolução (PHARMACIA BIOTECH, 1999).

2.3.5.4. Empacotamento da coluna

O empacotamento da coluna é um fator importante, pois afeta a qualidade da separação do soluto. A homogeneidade ou não do empacotamento de uma coluna pode ser verificada por meio do escoamento, através do leito, de uma solução aquosa de azul de dextrana (2 mg/mL). O movimento da região de cor azul a ser observado deverá ser uniforme no caso de uma coluna empacotada de forma homogênea. Um exame da transmitância de luz ao longo da coluna permite detectar falhas, como bolhas de ar, dentre outras (COLLINS et al., 1997).

2.3.5.5. Produtividade

De acordo com RAHMS (1993), a produtividade (P) é definida por:

$$P = \frac{m}{v \cdot t} \quad (4)$$

em que m é a massa da substância a separar, v é o volume do leito da coluna e t é o tempo do processo de separação.

Assim, é possível avaliar para um determinado comprimento de coluna (ou volume de leito) se a produtividade aumentará para um volume de injeção fixo, com a elevação da concentração do soluto ou com o aumento da vazão em uma dada resolução cromatográfica.

2.4. Sistemas aquosos bifásicos (SAB)

O uso de SAB para a purificação de proteínas é conhecida há mais de 30 anos. Os SAB são sistemas constituídos por duas fases, imiscíveis, que promovem a separação de produtos provenientes ou não da biotecnologia. Estes tipos de sistemas resultam da incompatibilidade, em soluções, de dois polímeros, por exemplo PEG e dextrana, ou entre um polímero e um sal apropriado, como PEG e fosfato de potássio (COIMBRA, 1995).

De acordo com ALBERTSSON (1986), o mecanismo de separação dos SAB é ainda desconhecido, embora diversos modelos tenham sido descritos na literatura com bons resultados para alguns dos sistemas avaliados. Normalmente, as várias interações (pontes de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas) como também forças adicionais mais fracas influenciam na separação.

Entre as vantagens do emprego de SAB incluem a simplicidade de operação, um ambiente moderado que dá rendimentos altos de atividade biológica e uma aproximação rápida do equilíbrio (HUDDLESTON et al., 1994).

Adicionalmente, a presença do polímero PEG em alimentos é permitida em muitos países, e enquadra-se na legislação para aplicação em produtos alimentícios e farmacêuticos. O mesmo pode ser dito para alguns tipos de sais de citrato, de fosfato e de sulfato (KULA et al., 1982; GUAN et al., 1992).

O uso de SAB também apresentou vantagens consideráveis quando aplicado a biosseparações em escala industrial (HUSTEDT et al., 1985). Em tais

sistemas a alta concentração de água (65 a 90)% favorece a estabilidade das proteínas durante a separação, quando comparados com sistemas tradicionais compostos com solventes orgânicos (LI et al., 1997).

O coeficiente de partição de biocompostos pode ser definido como:

$$K = \frac{C_1}{C_2} = \exp\left(\frac{LM}{kT}\right) \quad (5)$$

em que C_1 e C_2 representam as concentrações da molécula de interesse em cada uma das fases, L é um fator que depende de propriedades físico-químicas da molécula, M é a massa molecular, T é a temperatura absoluta e k é a constante de Boltzman.

Existem efeitos adicionais que levam a outras definições do coeficiente de partição; tendo por base o tamanho da substância, a carga de superfície hidrofóbica e os efeitos de conformação (BROOKS et al., 1994). É importante considerar o mecanismo de partição em SAB como uma relação de equilíbrio, entre as concentrações das moléculas de soluto em ambas fases (VEIDE et al., 1988).

De acordo com ZUÑIGA (2000), o SAB compostos por 18% (p/p) de PEG 1500 + 18% (p/p) FFP + 64 % água, foi o que melhor particionou as proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do soro de queijo,. Assim, este SAB foi usado para a condução dos experimentos neste trabalho.

2.5. Modelagem matemática aplicada à CEM

No desenvolvimento de processos cromatográficos em grande escala, é importante não somente obter um bom sistema de separação, mas também reduzir o custo operacional e aumentar a confiabilidade do processo.

O estudo experimental em cromatografia preparativa usando soluções concentradas de solutos biológicos é um processo complexo e dispendioso. Assim, a modelagem surge como uma etapa importante no processo de

separação pois possibilita o aumento de escala, a otimização e o controle do processo. O uso da simulação computacional reduz substancialmente o número de experimentos, diminuindo os custos e o tempo de obtenção dos resultados (SUBRAMANIAN, 1998).

Segundo LUYBEN (1989), os modelos matemáticos são empregados na engenharia para a pesquisa, o desenvolvimento e a determinação de mecanismos e de parâmetros necessários em um processo, em nível de laboratório ou de planta piloto. São usados também na otimização e no controle das diferentes condições de operação de um processo, ao mesmo tempo em que auxiliam nos cálculos da ampliação da escala do processo.

2.5.1. Modelagem da coluna cromatográfica

Segundo SUBRAMANIAN (1998), no desenvolvimento de modelos matemáticos, torna-se necessário fazer algumas suposições para reduzir a complexidade do modelo, focalizando os efeitos físicos e fenomenológicos mais importantes. As considerações não são aplicáveis em todos os casos, razão pela qual devem ser tratadas com prudência. Na modelagem da coluna cromatográfica, admite-se, geralmente, que todos os componentes tenham coeficiente de atividade unitário sendo as não-idealidades desprezadas.

Na solução do modelo matemático para CEM, supõe-se (ZHIGUO et al., 1998):

- a. Coluna isotérmica.
- b. Não existência de interação entre os solutos.
- c. Coeficientes de transferência de massa e difusão constantes.
- d. Empacotamento da coluna composto por partículas de forma esférica e de tamanho uniforme.
- e. Porosidade do leito constante ao longo da coluna.
- f. Difusão na direção radial na coluna inexistente.

2.5.1.1. Estrutura do modelo

O modelo geral é baseado nos princípios de conservação de massa e, para CEM, considera a existência de dispersão axial na fase líquida, de transferência de massa no filme entre as fases e de difusão do soluto dentro dos poros das partículas que formam o leito na coluna (ZHIGUO et al., 1998; KABÁTEK et al., 1997; GOTO e Mc COY, 2000; DALVIE et al., 1990; ALTENNHÖNER et al., 1997).

a. Balanço de massa no líquido extra-partícula

Segundo SUBRAMANIAN (1998), deve-se supor que há uma rápida difusão de soluto no interior da partícula, uma rápida transferência de massa no fluido externo à partícula e, ainda, que cada partícula é um sistema concentrado. O modelo de transferência de massa, neste caso, é dado por :

$$\varepsilon_b A dz \frac{\partial C_{b,i}}{\partial t} = \varepsilon_b A (j_{c,i}|_z - j_{c,i}|_{z+dz}) + \varepsilon_b A (j_{e,i}|_z - j_{e,i}|_{z+dz}) - \omega A dz j_{i,i} \quad (6)$$

em que o termo da esquerda representa o acúmulo de massa; o primeiro termo do lado direito, é o termo convectivo; o segundo é o dispersivo e o terceiro representa a transferência de massa no filme. $C_{b,i}$ é a concentração na fase líquida, ε_b é a porosidade do leito, A é a área da seção transversal da coluna e ω é a área superficial da partícula por unidade de volume. Como as partículas são consideradas esféricas com raio R , ω é dado por:

$$\omega = \frac{3(1 - \varepsilon_b)}{R} \quad (7)$$

Dividindo a eq. (6) por (Adz) e expandindo $j_{c,i}|_{z+dz}$ e $j_{e,i}|_{z+dz}$ em séries de Taylor, para dz tendendo a zero:

$$\varepsilon_b \frac{\partial c_{b,i}}{\partial t} = -\varepsilon_b \frac{\partial j_{c,i}}{\partial z} - \varepsilon_b \frac{\partial j_{e,i}}{\partial z} - \omega j_{f,i} \quad (8)$$

Os termos de escoamento da eq. (8) podem ser descritos como se segue.

Termo convectivo

A fase líquida é alimentada na coluna com uma velocidade efetiva no interior da partícula igual a v_m (m/s), onde $v_m = Q/(A\hat{a}_b)$, em que A (m²) é a área da seção transversal da coluna e Q é a vazão (m³/s). O escoamento convectivo ($j_{c,i}$) do componente i é (SUBRAMANIAN, 1998):

$$j_{c,i} = v_m C_{b,i} \quad (9)$$

Termo dispersivo

Segundo BIRD et al. (1960), o escoamento do fluido pelo leito empacotado gera uma série de comportamentos complexos, de modo que a influência da mistura retroativa (“back-mixing”) e dos volumes mortos são incorporados na dispersão. Os efeitos dispersivos são observados sobre todas as espécies. Assim, analogamente à lei de Fick para difusão:

$$j_{e,i} = -D_b \frac{\partial C_{b,i}}{\partial z} \quad (10)$$

em que J_{ei} é o fluxo referente à dispersão, ∂z é a variação na linha axial e D_p é o coeficiente de dispersão.

b. Transferência de massa no filme

Os modelos mais utilizados consideram que o escoamento difusivo no filme estagnado é quase estacionário, o que significa que o acúmulo de massa na película é desprezível. Para cada componente, este escoamento é determinado pelo coeficiente de transferência de massa $k_{f,i}$ e pela diferença de concentração do composto entre o seio da fase líquida e a fase líquida nos poros na superfície da partícula. É representado por (SUBRAMANIAN, 1998):

$$j_{f,i}(z,t) = k_{f,i}(C_{b,i} - C_{p,i}) \quad (11)$$

em que $j_{f,i}$ é o fluxo de transferência de massa no filme, e $C_{p,i}$ é a concentração do soluto na partícula.

c. Balanço de massa na partícula

A difusão do soluto pode ser estimada usando o balanço de massa na partícula. Uma distribuição na direção radial no interior dos poros da partícula é definida por (SUBRAMANIAN, 1998):

$$dV \left(\epsilon_p \frac{\partial c_{p,i}}{\partial t} + (1 - \epsilon_p) \frac{\partial c_{A,i}}{\partial t} \right) = -\epsilon_p \left(A \Big|_{r+dr} j_{d,i} \Big|_{r+dr} - A \Big|_r j_{d,i} \Big|_r \right) \quad (12)$$

em que o termo do lado direito da equação representa a difusão radial do soluto e o termo à esquerda representa o acúmulo da massa na fase fluida no interior do partícula ($\partial c_{p,i}$) e na superfície dos poros devido à adsorção ($\partial c_{A,i}$). ϵ_p representa a porosidade da partícula. Na CEM a adsorção é inexistente e, portanto, $\partial c_{A,i} = 0$ (ZHIGUO et al., 1998).

2.5.2. Formulação do modelo matemático

A formulação do modelo matemático está fundamentada nos balanços de massa do soluto no líquido fora e dentro da partícula (ZHIGUO et al., 1998).

As Eqs. (13) e (14) são baseadas nas eqs. (6) e (12):

$$-D_b \frac{\partial^2 C_b}{\partial Z^2} + v \frac{\partial C_b}{\partial Z} + \frac{\partial C_b}{\partial t} + \frac{3Km(1-\epsilon_b)(C_b - C_{p,R=R_p})}{\epsilon_b R_p} = 0 \quad (13)$$

$$\frac{\partial C_p}{\partial t} = D_p \left(\frac{\partial^2 C_p}{\partial R^2} + \frac{2\partial C_p}{R\partial R} \right) \quad (14)$$

As condições iniciais para as eqs (13) e (14) são:

$$t = 0 \quad \Rightarrow \quad C_b = C_b(0, R, Z), \quad C_p = C_p(0, R, Z) \quad (15)$$

$$Z = 0 \quad \Rightarrow \quad \frac{\partial C_b}{\partial Z} = \frac{v}{D_b} [C_b - C_f(t)] \quad (16)$$

$$Z = L \quad \Rightarrow \quad \frac{\partial C_b}{\partial Z} = 0 \quad (17)$$

$$R = 0 \quad \Rightarrow \quad \frac{\partial C_p}{\partial R} = 0 \quad (18)$$

$$R = R_p \quad \Rightarrow \quad \frac{\partial C_p}{\partial R} = \frac{K_m}{\epsilon_p^a D_b} (C_b - C_{p,R=R_p}) \quad (19)$$

Definindo-se os seguintes termos adimensionais:

$$z = Z/L \quad \tau = \frac{vt}{L} \quad r = \frac{R}{R_p} \quad c_b = \frac{C_b}{C_0} \quad c_p = \frac{C_p}{C_0}$$

$$Pe = \frac{vL}{D_b} \quad Bi = \frac{K_m R_p}{\varepsilon_p^a D_p} \quad \eta = \frac{\varepsilon_p^a D_p L}{(R_p^2 v)} \quad \xi = \frac{3 Bi \eta (1 - \varepsilon_b)}{\varepsilon_b}$$

Em que C_0 é concentração inicial do soluto, R_p é o raio da partícula, R é a coordenada radial da partícula, L é o comprimento de coluna, K_m é o coeficiente de transferência de massa, Pe é o número de Peclet, η é um número adimensional, Bi é o número de Biot e ξ uma constante (adimensional). As formas adimensionais das eqs. (13) e (14) para a fase líquida e para a partícula são, respectivamente:

$$-\frac{1}{Pe} \frac{\partial^2 c_b}{\partial z^2} + \frac{\partial c_b}{\partial \tau} + \frac{\partial c_b}{\partial z} + \xi(c_b - c_{p,r=1}) = 0 \quad (20)$$

$$\frac{\partial c_p}{\partial \tau} = \frac{\eta}{\varepsilon_p^a} \left(\frac{\partial^2 c_p}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_p}{\partial r} \right) \quad (21)$$

Com as condições iniciais e de contorno:

$$\tau = 0 \Rightarrow c_b = c_b(0, r, z) \quad c_p = c_p(0, r, z) \quad (22)$$

$$z = 0 \Rightarrow \frac{\partial c_b}{\partial z} = Pe [c_b - C_f(\tau)], \text{ Onde: } C_f(\tau) = \begin{cases} 1 \Rightarrow 0 \leq \tau \leq \tau_{inj} \\ 0 \Rightarrow \tau > \tau_{inj} \end{cases} \quad (23)$$

em que τ_{inj} é o tempo adimensional para injeção de amostra.

$$z = 1 \quad \Rightarrow \quad \frac{\partial c_b}{\partial z} = 0 \quad (24)$$

$$r = 0 \quad \Rightarrow \quad \frac{\partial c_p}{\partial r} = 0 \quad (25)$$

$$r = 1 \quad \Rightarrow \quad \frac{\partial c_p}{\partial r} = Bi (c_b - c_{p,r=1}) \quad (26)$$

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Processos de Separação (LPS) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

3.1. Escolha do sistema de trabalho

O sistema de trabalho foi aquele composto por 18% (p/p) PEG 1500 e 18% (p/p) fosfato de potássio (FFP), o qual apresentou bons resultados na separação de α -la e β -lg, segundo os resultados de ZUÑIGA (2000). A seleção da concentração de isolado protéico de soro de queijo em pó (IPS) para emprego no sistema de trabalho foi feita com base na viscosidade de cada uma das fases.

3.1.1. Preparo dos sistemas de fases

Os sistemas aquosos bifásicos foram preparados a partir de soluções estoques de PEG 1500 (50% p/p) e FFP (30% p/p; pH 7). Para o preparo das soluções-estoque de sal a 30%, foram adicionadas quantidades de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4), na proporção de 1:1,82 para

que fosse atingido o pH 7. O sistema, na concentração desejada 18% (p/p) PEG 1500 + 18% (p/p) FFP, foi formado por exemplo, adicionando-se em um tubo de ensaio 3,6 g da solução-estoque de PEG, 6 g de solução-estoque de FFP (30% p/p, pH 7) e água, até completar 10 g. Em seguida, os tubos foram agitados durante 60 minutos e deixados em repouso, por 12 horas, para a separação das fases. Neste trabalho, foram empregados 500 g de sistema.

O isolado protéico de soro (Davisco Foods, USA) foi dissolvido na fase salina, gerando soluções com concentrações de (5, 10 e 15)% p/p. Em seguida, a solução foi filtrada e misturada com a fase polimérica e agitada, por 2 horas, em um agitador magnético. O sistema foi então transferido para um funil de separação, permanecendo em repouso, por 12 horas, até atingir o estado de equilíbrio. Após este intervalo de tempo, foram utilizadas alíquotas das fases superior e inferior para a avaliação da viscosidade.

3.1.2. Viscosidade

A viscosidade foi determinada em reômetro de esferas descendentes (Rheo Viscosímetro KD 2.1; Haake), a 25 °C, para cada uma das fases do SAB, nas diferentes concentrações de IPS. O reômetro foi primeiramente calibrado com uma solução padrão para fluidos Newtonianos de viscosidade conhecida na temperatura de estudo.

3.1.3. Densidade

As densidades das fases foram determinadas através de um picnômetro de 25 cm³, mantendo-se a temperatura a 25⁰C. O picnômetro foi primeiramente calibrado com água destilada na temperatura de estudo.

3.2. Coeficiente de partição das proteínas

O coeficiente de partição foi determinado após a incorporação de 10% (p/p) de IPS ao SAB de 18% (p/p) PEG 1500 + 18% (p/p) FFP (pH 7).

A solução foi agitada por duas horas, em um agitador magnético. A seguir, foi transferido para um funil de separação, onde permaneceu em repouso por 12 horas, até atingir o estado de equilíbrio. Após este intervalo de tempo, foram utilizadas alíquotas das fases superior e inferior, para a quantificação da concentração das proteínas por cromatografia líquida em fase reversa (HPLC-RP). O coeficiente de partição (K) foi definido como a razão entre a concentração de α -la ou β -lg na fase rica em PEG (C_T) e a concentração da mesma proteína na fase rica em sal (C_B), sendo calculado através da eq. (5).

3.3. Determinação das condições operacionais para purificação das proteínas nas fases

A escolha das condições operacionais ótimas da CEM para purificação das proteínas das fases polimérica e salina foi feita com base na resolução da separação dos componentes, e na produtividade do processo de purificação.

3.3.1. Preparo do gel e empacotamento da coluna HR 10/10

O gel Shepadex® G-25 foi hidratado em uma solução de NaCl 0,1 M (fase móvel). Foi usado excesso de volume de fase móvel (50 mL) em um bquer de 100 mL. A mistura foi agitada, esporadicamente e levemente, com bastão de vidro, durante 4 horas, à temperatura ambiente. Então, procedeu-se à remoção das partículas pequenas por elutrição. A desaeração da suspensão glica foi feita em Ultra-som (Branson) e o gel empacotado na coluna HR 10/10 (10 mm de diâmetro x 100 mm de comprimento, Pharmacia Biotech). O empacotamento foi feito transferindo, de uma única vez, o volume total do gel hidratado. Para tanto, foram utilizados um adaptador de empacotamento HR 10 (Pharmacia Biotech), uma

bomba peristáltica P-1 (Pharmacia Biotech) e a mesma fase móvel usada na hidratação do gel, em uma vazão de 6 mL/min. A coluna empregada no experimento pode ser vista na Figura 3.1.

Os dois tipos de géis testados foram o Shepadex® G-25 superfino e Shepadex® G-25 médio. As faixas de diâmetros de partículas e o LEM foram, respectivamente, de (10 a 40) μm e 5.000 Da para o gel superfino, e de (50-150) μm e 5.000 Da para o gel médio.



Figura 3.1 Coluna HR 10/10 empacotada com Shepadex® G-25

3.3.2. Purificação das proteínas presentes nas fases

A purificação das proteínas das fases salina e polimérica foi feita em escala semi-preparativa, em equipamento adequado para o trabalho de cromatografia preparativa (ÄKTA *Purifier* 10/100, Pharmacia Biotech). Foram testadas diferentes vazões da fase móvel (água deionizada): (0,2, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0) mL/min. Os volumes das amostras injetadas foram de (0,3, 0,5, 1,0 e 1,5) mL. A injeção das amostras foi feita em duplicata usando um dispositivo de injeção (“*superloop*”) de 150 mL. A fase polimérica foi diluída na proporção 2:1 (água : amostra) antes da injeção, devido à alta viscosidade apresentada.

O eluente foi monitorado por absorção de UV a 280 nm. A coluna HR 10/10 (Pharmacia Biotech) suportou a pressão máxima de 1 MPa. As amostras foram coletadas em intervalos regulares de volume, com um coletor de frações (Frac-

900, Pharmacia Biotech). A figura 3.2 apresenta um diagrama esquemático do processo experimental.

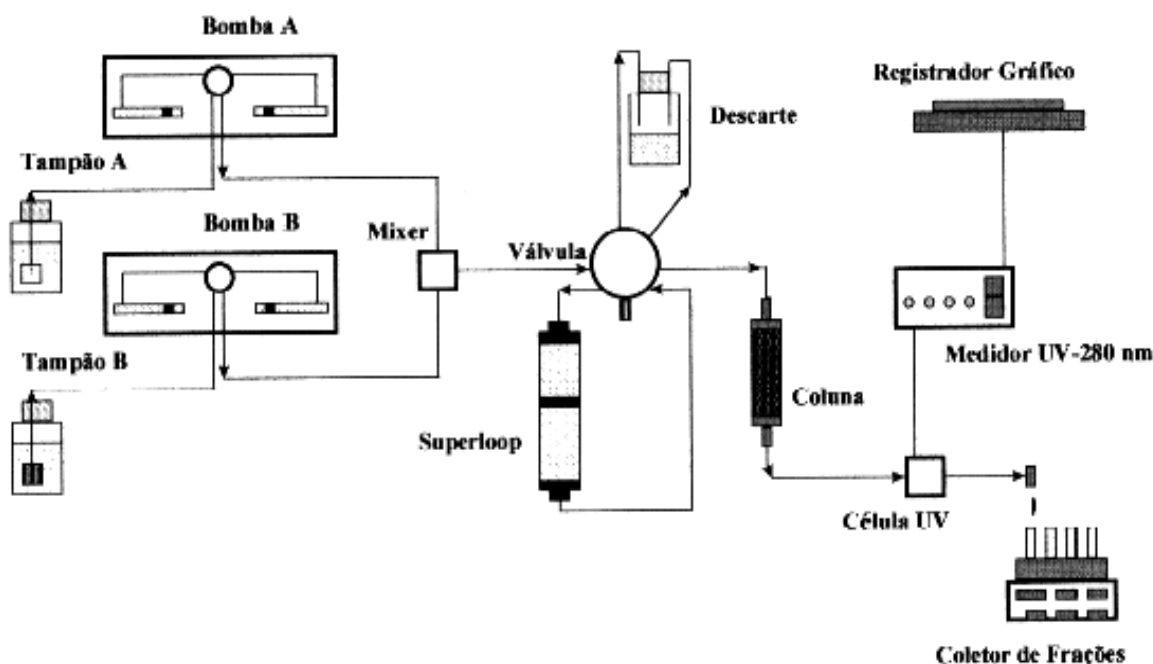


Figura 3.2 Esquema básico utilizado no processo de purificação das proteínas das fases (PEREIRA,1999)

3.3.3. Determinação da resolução

A resolução na separação dos componentes foi determinada por absorção de UV a 280 nm, a partir de (FISCHER, 1974):

$$R_s = 2 \times \frac{(V_{R2} - V_{R1})}{(W_{H1} + W_{H2})} ; (VR2 > VR1) \quad (27)$$

em que:

V_{R1} : Volume Retenção do pico 1

V_{R2} : Volume Retenção do pico 2

W_{H1} : Largura do pico 1

W_{H2} : Largura do pico 2

3.3.4. Determinação da produtividade do processo

A produtividade foi calculada usando a eq. (4) que relaciona a quantidade da proteína (α -la ou β -lg) presente na fase polimérica ou na salina, pelo produto (volume do leite empacotado na coluna x tempo do processo de separação). O tempo de separação foi determinado como o quociente entre a vazão da fase móvel e o volume de amostra injetada. Os gráficos de produtividade foram construídos em função da vazão para cada volume de injeção.

3.4. Análise das frações obtidas na purificação das fases

3.4.1. Análise e quantificação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina

As proteínas α -la e β -lg contidas nas frações coletadas foram quantificadas simultaneamente por CLAE, nas seguintes condições de **trabalho (ZUÑIGA, 2000)**:

- Coluna de fase reversa: CLC ODS-C18 de 250 mm x 4,6 mm (Shimadzu).
- Coluna de guarda: CLCG-ODS de 10 mm x 4 mm (Shimadzu).
- Vazão da fase móvel: 1 mL/min
- Temperatura: 40°C
- Detector: feixe de diodos (SPD-M10AVP- Shimadzu)
- Volume de injeção: 20 μ L
- Comprimento de onda: 210 nm
- Fase móvel: (A) acetonitrila, (B) NaCl 0,15 M, pH 2,5

O gradiente foi programado da seguinte forma:

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

3.4.2. Elaboração da curva de calibração

As curvas de calibração para a α -la e β -lg foram construídas a partir de soluções das proteínas puras em concentrações na faixa de (0,02 a 3,5) mg/mL. As soluções de proteínas foram preparadas empregando-se a fase móvel A (NaCl 0,15 M, pH 2,5). O pH da solução protéica da fase móvel foi ajustado usando-se uma solução concentrada de HCl.

3.5. Modelagem matemática da CEM

3.5.1. Determinação da porosidade do leito (ϵ_b)

A porosidade do leito (ϵ_b) depende somente do tamanho das partículas e da técnica do empacotamento. O valor de ϵ_b foi calculado avaliando-se o tempo de exclusão (t_d) de uma molécula de azul de dextrana (2.00000 Da) do leito.

O valor de ϵ_b foi mantido constante em todas as condições de trabalho da coluna, sendo usada em seu cálculo a eq. (28) (GERBERDING e BYERS, 1998; ALTENNHÖNER et al., 1997):

$$\epsilon_b = \frac{t_d 4Q}{\pi d^2 L} \quad (28)$$

em que a vazão da fase móvel (Q) foi de 4 mL/min, o comprimento da coluna (L) foi de 10 cm e o diâmetro da coluna (d) foi de 1 cm.

3.5.2. Determinação da porosidade da partícula (ϵ_p)

Para obter a porosidade da partícula (ϵ_p) é necessário avaliar o tempo de retenção para que uma molécula seja capaz de penetrar nos poros da partícula do leito. É necessário, também, que a massa molecular desta substância esteja dentro da faixa de operação do gel. No cálculo de ϵ_p , foi utilizado o tempo de

retenção (t_0) de uma molécula de acetona na coluna. A eq. empregada foi (ZHIGUO et al., 1998):

$$\varepsilon_p = \frac{(1 - \frac{t_d}{t_0})}{(1 - \varepsilon_b)} \varepsilon_b \quad (29)$$

3.5.3. Determinação da porosidade acessível da partícula para o soluto (ε_a^p)

A porosidade acessível da partícula representa a fração de volume acessível do macroporo para um soluto em particular. Este parâmetro foi determinado para cada um dos componentes do sistema: proteínas da fase polimérica, proteínas da fase salina, PEG e FFP, de acordo com a eq. (30) (ZHIGUO et al., 1998). Os tempos de retenção (t_R) das moléculas foram obtidos a partir das vazões usadas na separação de cada uma delas (4 mL/min e 2 mL/min para as fases polimérica e salina, respectivamente).

$$\varepsilon_a^p = \frac{(1 - \frac{t_d}{t_R})}{(1 - \varepsilon_b)} \varepsilon_b \quad (30)$$

3.5.4 Solução numérica do modelo

O modelo matemático da CEM dado pelas eqs. (20) e (21) juntamente com as respectivas condições iniciais e de contorno, eqs. (22), (23), (24), (25) e (26) foram reduzidos a um sistema de equações algébricas, usando-se o método implícito de diferenças finitas centradas no espaço e um passo à frente no tempo.

Este sistema de eqs. diferenciais e algébricas foi resolvido simultaneamente, utilizando-se o método de Gauss-Seidel (CONCEIÇÃO et al., 1987).

Os valores ótimos dos parâmetros Pe , Bi e η foram obtidos por meio da aplicação de regressão não-linear usando o método de programação quadrática sucessiva. Esses dois procedimentos foram implementados em um programa em linguagem FORTRAN, e os dados usados para a solução do modelo foram originados dos resultados obtidos a partir do item 3.3.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos experimentalmente serão analisados e discutidos a seguir.

4.1. Seleção do sistema de trabalho

A seleção do sistema de trabalho foi feita avaliando-se a viscosidade das fases dos SAB contendo diferentes concentrações de soro e, portanto, de proteínas.

4.1.1. Avaliação das viscosidades nas fases dos SAB

As viscosidades das fases superior e inferior dos sistemas compostos por 18 % (p/p) PEG 1500 + 18% (p/p) FFP + IPS foram determinadas em concentrações de (5%, 10% e 15%) de IPS. Os resultados são apresentados na Figura 4.1.

Pode-se observar que as viscosidade das fases polimérica e salina aumentaram com a elevação da concentração de soro no sistema. A viscosidade da fase polimérica foi maior do que a da fase salina, apresentando valores superiores a 24 cP, e inferiores a 8 cP respectivamente. Estes dados estão dentro das faixas obtidas por ZUÑIGA (2000) e COIMBRA (1995) para SAB compostos por PEG + FFP.

No caso de SAB puro, isto é, sem adição de IPS, as viscosidades das fases foram de 24 cP e 4 cP para as fases polimérica e salina, respectivamente.

Sistemas contendo 15 % de IPS apresentaram viscosidades superiores a 30 cP, o que mostra que a viscosidade tem uma relação diretamente proporcional com o aumento da concentração de IPS no sistema. Já, COIMBRA (1995) verificou para SAB compostos por PEG 1500 e FFP que as fases exibiam um comportamento newtoniano, mostrando uma proporcionalidade direta entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação.

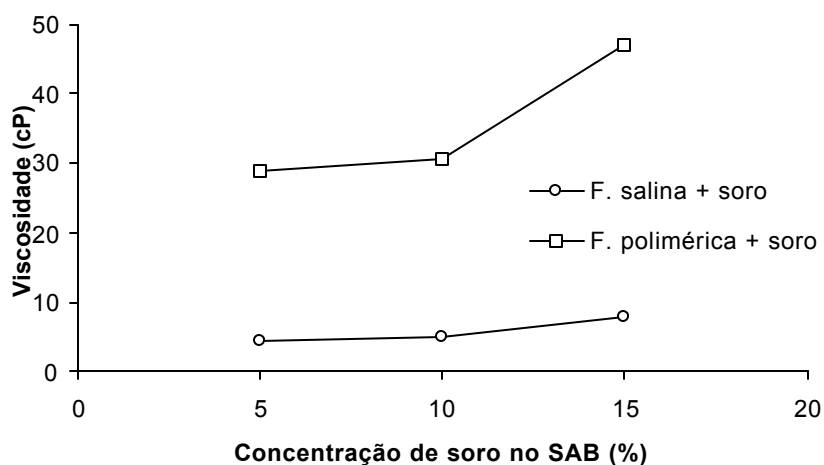


Figura 4.1 Viscosidades das fases dos SAB.

A viscosidade da fase salina para o SAB contendo 10 % de IPS foi menor do que o limite superior recomendado (menor que 5 cP) e, portanto, apropriada à conclusão deste trabalho experimental; mas, devido à elevada viscosidade da fase polimérica, foram necessários testes de várias diluições para a adequação desta propriedade ao limite de 5 cP sugerido por JAMES e MORRIS (1964).

Da Figura 4.2, depreende-se que, a partir da diluição de um volume da fase polimérica para dois volumes de água (1:2) podem ser obtidas viscosidades inferiores a 5 cP. Na abcissa da Figura 4.2, o título do eixo, diluição da fase polimérica significa número de volume de água para um volume de fase polimérica.

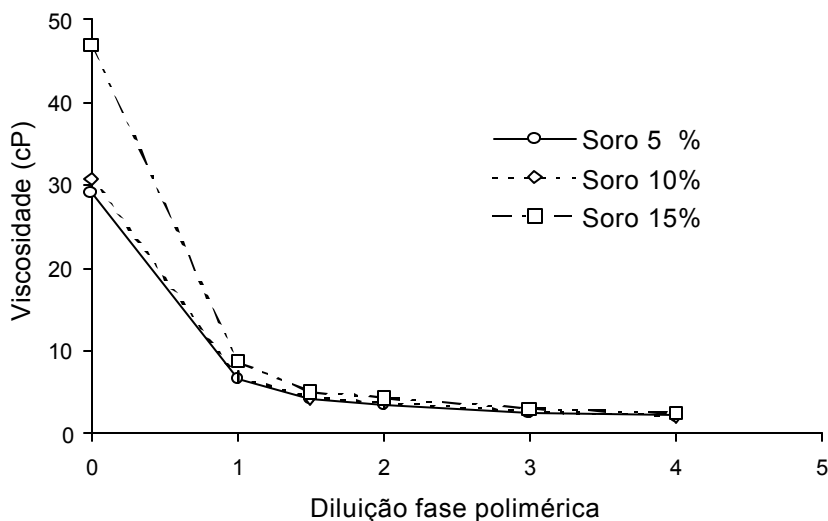


Figura 4.2 Diluição da fase polimérica do SAB.

Assim, a concentração de soro escolhida para desenvolver este trabalho foi a de 10%, pois resultou em uma fase polimérica com viscosidade igual a 3,69 cP (após a diluição 1:2) e uma fase salina com viscosidade igual a 4,91 cP.

Os valores de densidade correspondentes para as fases polimérica e salina foram de 1098 kg/m³ e 1253 kg/m³, respectivamente. Estas propriedades físicas das fases garantiram o adequado desenvolvimento do processo cromatográfico por CEM operando com SAB contendo 10% de soro de queijo.

4.1.2. Coeficiente de Partição

Os valores dos coeficientes de partição da α -la e β -lg no SAB pré-selecionado são apresentados na Tabela 4.1. Praticamente, toda a β -lg permanece na fase salina (K_β menor que 1), e a α -la é transferida em grande parte para a fase polimérica exibindo um valor de K_α maior que 1. Esses valores de K indicam a viabilidade da separação destas proteínas por extração líquido-líquido com SAB compostos por PEG e FFP, tal como concluíram CHENG (1996), COIMBRA (1995) e ZUÑIGA (2000).

Os dados obtidos para K_α e K_β encontrados nesta pesquisa foram próximos aos de ZUÑIGA (2000), que trabalhou com SAB compostos por 18% (p/p) PEG 1500 + 18% (p/p) FFP contendo as proteínas puras.

Tabela 4.1- Coeficiente de partição para α -la e β -lg no sistema formado por 18% (p/p) PEG 1500 + 18% (p/p) FFP + 10% (p/p) IPS

Proteína	K
α -lactoalbumina	12,614
β -lactoglobulina	0,063

4.2. Determinação das condições operacionais para CEM

Na cromatografia preparativa é fundamental o controle adequado da vazão do eluente, dos volumes de injeção e das concentrações das amostras para uma separação adequada dos componentes, sendo que, na CEM, as condições operacionais podem ser expressas em função da resolução cromatográfica, que é uma medida da separação dos componentes da amostra (LOUGH et al., 1996; BROYLES, 1998).

Assim, a determinação das condições operacionais ótimas para a purificação das proteínas das fases polimérica e salina foi feita com base na resolução da separação dos componentes e na produtividade do processo de purificação.

A R_s foi determinada pela eq. (1), na qual o fator de capacidade depende dos tempos de retenção dos componentes da solução. O fator de seletividade varia com o tamanho da partícula do gel de empacotamento da coluna, com a faixa de massa molecular da amostra e com o volume de poros da partícula. O número de pratos teóricos, N , pode ser aumentado pelo decréscimo da vazão, pela diminuição do volume da amostra ou pelo aumento do tamanho da coluna.

As Figuras 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6 apresentam o efeito da variação do volume de amostra injetado sobre a R_s para diferentes vazões de fase móvel e para os dois

tipos de géis testados (Shepadex® G-25, médio e superfino) nas fases salina e polimérica.

4.2.1 - Influência do volume da amostra sobre a resolução

De acordo com as Figuras 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6 para ambas as fases, salina e polimérica, a resolução diminuiu com o aumento do volume de amostra no processo. Este comportamento foi, provavelmente, originado pelo decréscimo nos valores de α e k' que afetam a resolução cromatográfica, como descrito pela eq. (1). Segundo RICKER e SANDOVAL (1996), ao aumentar o volume de injeção da amostra, esta tende a ocupar completamente o volume livre da coluna produzindo alterações na sua dispersão axial e radial e, provavelmente, na R_s .

Valores de R_s abaixo de 0,5 foram atingidos com o uso de volumes de amostra de 1,5 mL. De acordo com FELIPE e LAW (1997), que fracionaram as proteínas de soro de queijo por CEM, o aumento na injeção do volume de amostra produziu um decréscimo na resolução das frações das proteínas separadas (α -la, β -lg, imunoglobulinas e albumina de soro juntamente com a lactoferrina).

Em estudos feitos na separação de macromoléculas biológicas usando CEM, a eficiência da separação foi afetada tanto pelo volume de amostra quanto pelo aumento da concentração de amostra, mas deve-se considerar que R_s é independente da concentração até que a amostra se torne muito viscosa (FALLOW et al., 1993; RICKER e SANDOVAL, 1996).

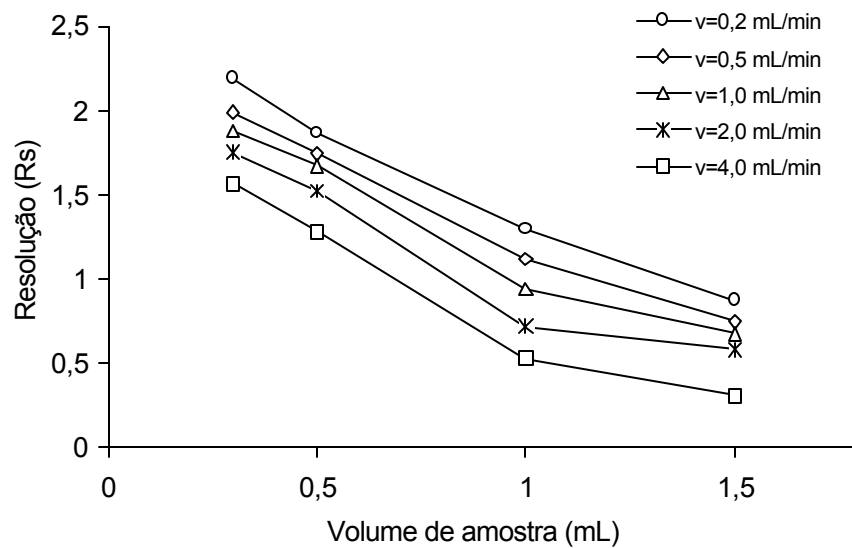


Figura 4.3 Influência do volume de amostra sobre a Rs da fase polimérica para diferentes relações de vazão (Shepadex® G-25, médio).

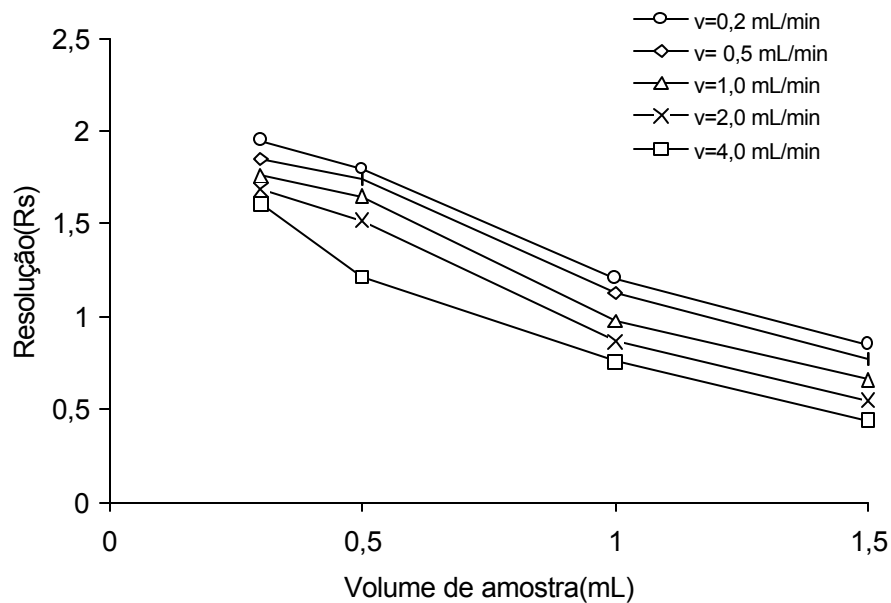


Figura 4.4 Influência do volume de amostra sobre a Rs da fase salina para diferentes relações de vazão (Shepadex® G-25, médio).

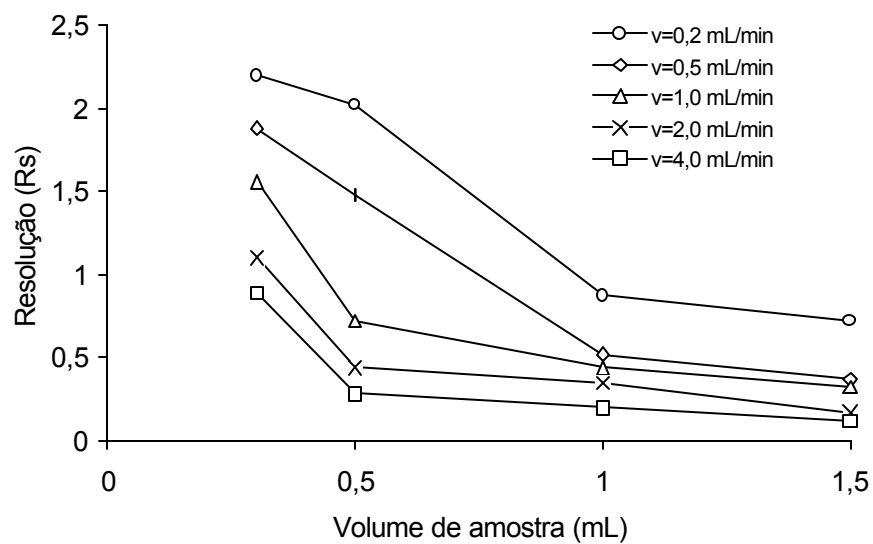


Figura 4.5 Influência do volume de amostra sobre a Rs da fase polimérica para diferentes relações de vazão (Shepadex® G-25, superfino).

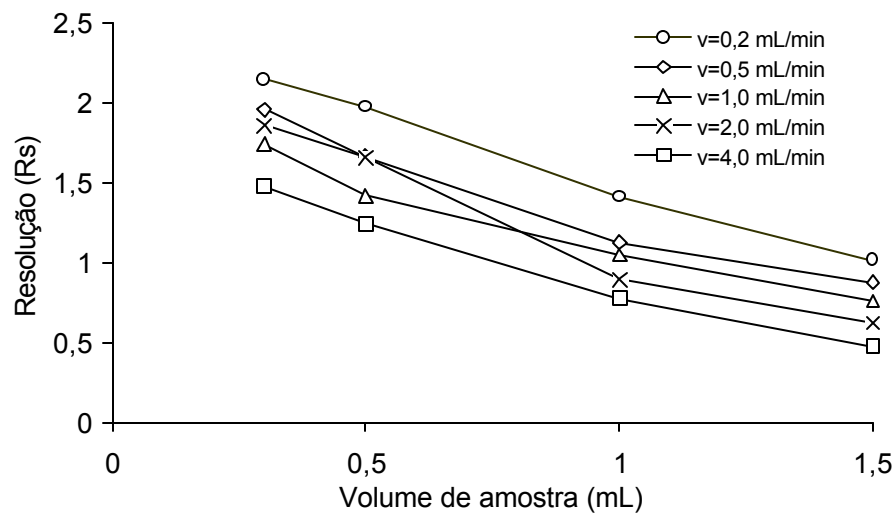


Figura 4.6 Influência do volume de amostra sobre a Rs da fase salina para diferentes relações de vazão (Shepadex® G-25, superfino).

4.2.2. Influência da vazão da fase móvel sobre a resolução

Nas Figuras 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6, observa-se uma relação inversa entre a resolução e a vazão da fase móvel; ou seja, quanto maior a vazão, menor a resolução. Provavelmente, o aumento da vazão fez com que ocorresse uma saída conjunta dos componentes (com baixo grau de separação); isto é, houve uma sobreposição na saída dos componentes durante a eluição, reduzindo N , R_s e, conseqüentemente, a eficiência do processo.

Estes resultados estão de acordo com os dados apresentados por LEVISON et al. (1996) que, estudando a influência da vazão da fase móvel na separação das proteínas do ovo por CEM, concluíram que existe uma relação inversamente proporcional entre a vazão e a resolução cromatográfica. Também RICKER e SANDOVAL (1996), ao estudarem a separação de macromoléculas usando CEM, observaram que baixas vazões e pequenos volumes de amostras levaram a condições de separação ótimas e a uma boa resolução cromatográfica.

No presente trabalho, somente para a fase salina e com gel superfino (Figura 4.6), foram observados, para volumes de amostra inferiores a 0,5 mL, menores resoluções ao diminuir a vazão da fase móvel de (2 para 1) mL/min.

O uso de altas vazões também é limitado pelas elevadas pressões que originam no interior da coluna. A elevação da vazão da fase móvel pode aumentar a pressão no interior da coluna (LEVISON et al., 1999) e este aumento pode dificultar o escoamento dos componentes durante a eluição levando a uma sobreposição na saída dos componentes com conseqüente diminuição da R_s e eficiência do processo.

Como as biomoléculas da amostra se difundem dentro e fora dos poros da partícula, esta difusão resulta em picos cujas bases aumentam com a elevação da vazão. Por tanto, quando existem moléculas de diferentes tamanhos na amostra, é recomendável usar vazões que garantam as mínimas condições de resolução na separação, de forma a manter a eficiência do processo (RICKER e SANDOVAL, 1996).

4.2.3. Influência do tamanho da partícula sobre a resolução

Os valores de R_s estão intimamente relacionados com o volume da amostra e com a vazão da fase móvel, tanto para o gel Shepadex® G-25 médio quanto para o superfino, como visto nas Figuras 4.3 a 4.6.

Durante os experimentos, a coluna empacotada com o gel Shepadex® G-25 médio permitiu um melhor controle da pressão no processo de purificação, comparada àquela empacotada com Shepadex® G-25 superfino; uma vez que o tamanho da partícula superfina é muito menor. Conforme relatado por HUPE e LAUER (1981), as restrições ao emprego de partículas pequenas estão associadas aos problemas práticos de aumento da pressão de trabalho na coluna.

Em termos de resolução, como apresentado nas Figuras 4.4 e 4.6, o gel Shepadex® G-25 superfino ofereceu uma melhor separação na fase salina, embora o uso deste tamanho de partícula (ou de uma vazão muito alta) possa elevar as pressões internas. Por outro lado, a utilização de baixas vazões, com este tamanho de partícula, aumentou o tempo de processamento e reduziu a produtividade do mesmo. Já com o gel Shepadex® G-25 médio, foi possível usar uma pressão adequada facultando o emprego de vazões mais elevadas (até 4 mL/min) com redução do tempo de processamento.

Na fase polimérica, como observado nas Figuras 4.3 e 4.5, para um mesmo volume de amostra a R_s diminuiu com o aumento da vazão, com ambas resinas.

É importante considerar a influência do tamanho da partícula sobre a pressão da fase móvel no suporte sólido, pois existe uma relação inversa entre a vazão do eluente e o tamanho das partículas no leito da coluna (PHARMACIA BIOTECH, 1998).

Assim, o uso do gel Shepadex® G-25 superfino é recomendável para separações em nível analítico, onde são usadas baixas vazões e pequenas quantidades de amostras. Deve-se notar que baixas vazões levam a pequenas pressões no interior da coluna.

4.2.4. Determinação da produtividade do processo

A produtividade do processo foi calculada de acordo com RAHMS (1993), pela eq. (4), como sendo a quantidade de produto purificado por unidade de tempo e por unidade de volume de leite, ou seja: $\text{mg de proteína} \times (\text{mL do leite})^{-1} \times \text{h}^{-1}$. As concentrações das proteínas α -la e β -lg foram determinadas, por CLAE- fase reversa (CLAE-FR), nas fases polimérica e salina. O tempo de processo foi considerado como uma função da vazão da fase móvel, uma vez que o volume do leite da coluna foi mantido constante (7,85 mL). As curvas de produtividade em função da vazão para diferentes volumes de injeção e para cada uma das fases são mostradas nas Figuras 4.7 e 4.8. Observa-se um aumento da produtividade com a elevação da vazão e do volume da amostra. Analisando o processo cromatográfico em escala preparativa, FALLOW et al. (1993) também relataram o aumento da produtividade com a elevação da vazão da fase móvel.

Na cromatografia preparativa, deve-se considerar o efeito da vazão tanto sobre a produtividade, quanto sobre a resolução. Em geral, a resolução pode ser melhorada reduzindo o tamanho da partícula.

O volume de amostra também é uma variável importante no cálculo da produtividade e deve ser otimizado de acordo com a resolução (HUPE e LAUER, 1981).

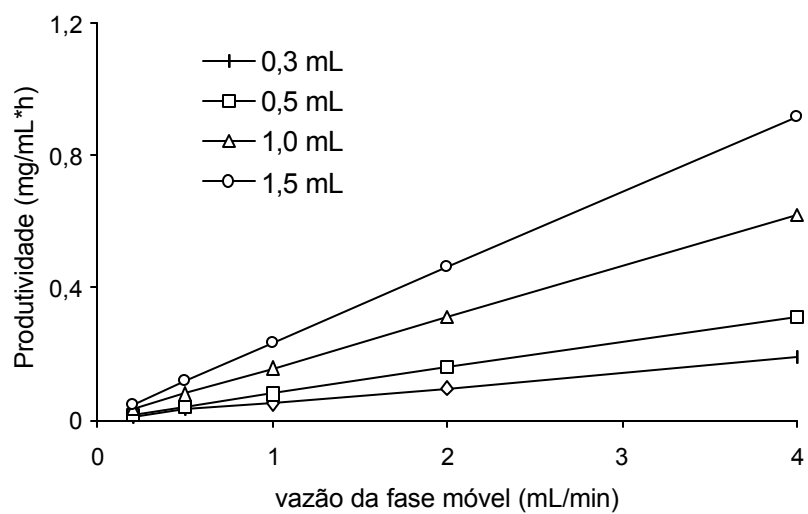


Figura 4.7 Produtividade do processo na fase polimérica.

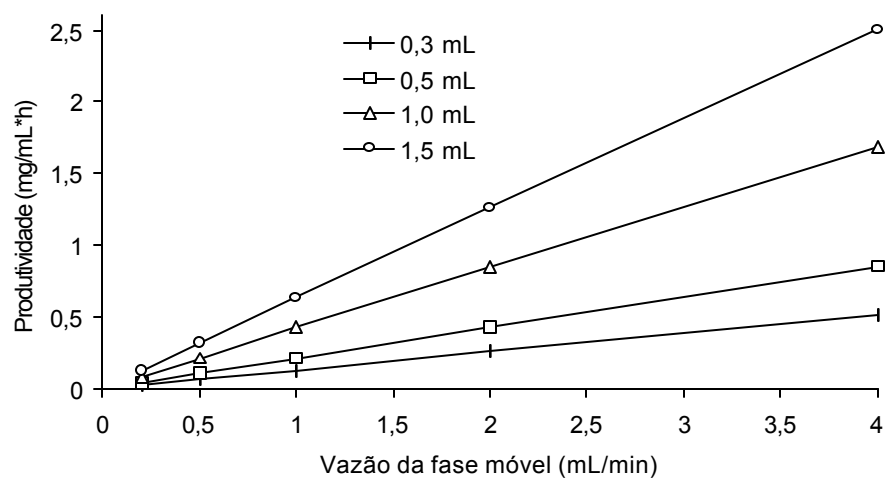


Figura 4.8 Produtividade do processo na fase salina.

4.2.5. Determinação das condições operacionais ótimas para CEM

Como apresentado anteriormente nas Figuras 4.3 a 4.6, as resoluções obtidas a partir dos experimentos foram determinadas para as fases salina e polimérica, em diferentes vazões, volumes de amostras e dois tamanhos de partículas do gel. Foram, então, selecionados os volumes de amostras e as vazões para cada tipo de matriz que levaram a resoluções iguais ou superiores a 1,25. Segundo SNYDER et al. (1988), este valor de 1,25 garante uma porcentagem de separação de 99,5 %. Nestas condições foram avaliadas as produtividades, cujos resultados foram mostrados nas Figuras 4.7 e 4.8. Assim, condições pré-estabelecidas para operação da CEM foram definidas, conforme observado na Tabela 4.2. Os respectivos cromatogramas para cada uma destas condições estão representados nas Figuras 4.9, 4.10, 4.11 e 4.12. Nota-se que para o sal (FFP) foi usado o eixo da condutividade elétrica (mS/cm) conforme as Figuras 4.9 e 4.11.

Tabela 4.2 - Condições de operações para CEM pré-selecionadas

Condições	Vazão (mL/min)	Volume (mL)	Matriz	Amostra
C1	2,0	0,5	G-25 (médio)	F. salina
C2	4,0	0,5	G-25 (médio)	F. polimérica
C3	0,5	0,5	G-25 (superfino)	F. polimérica
C4	2,0	0,5	G-25 (superfino)	F. salina

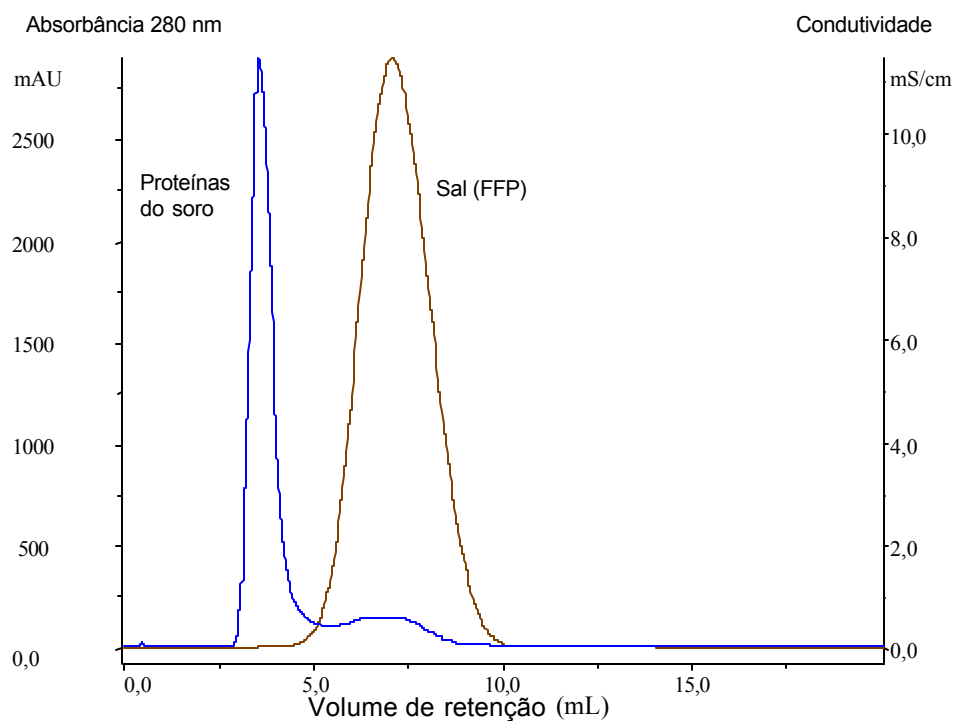


Figura 4.9 Eluição das proteínas do soro de queijo e de FFP, na fase salina; condição C1.

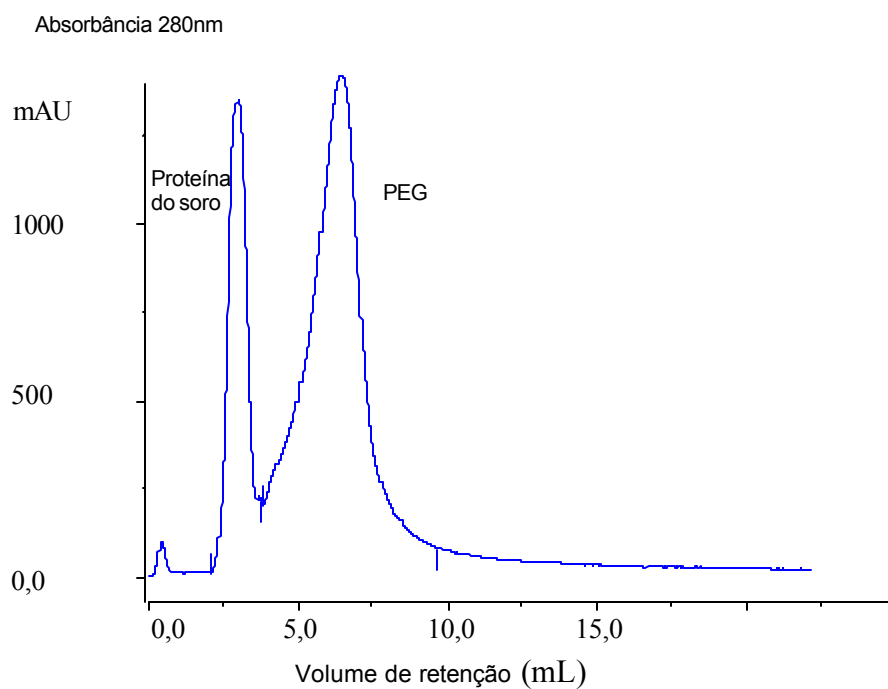


Figura 4.10 Eluição das proteínas do soro de queijo e do PEG, na fase polimérica; condição C2.

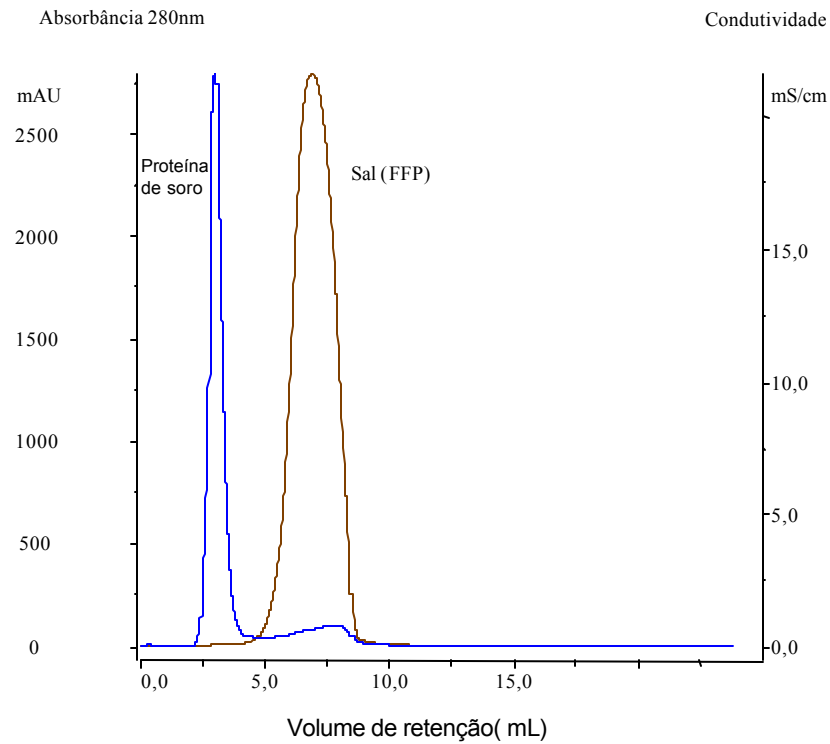


Figura 4.11 Eluição das proteína do soro de queijo e de FFP, na fase salina; condição C3.

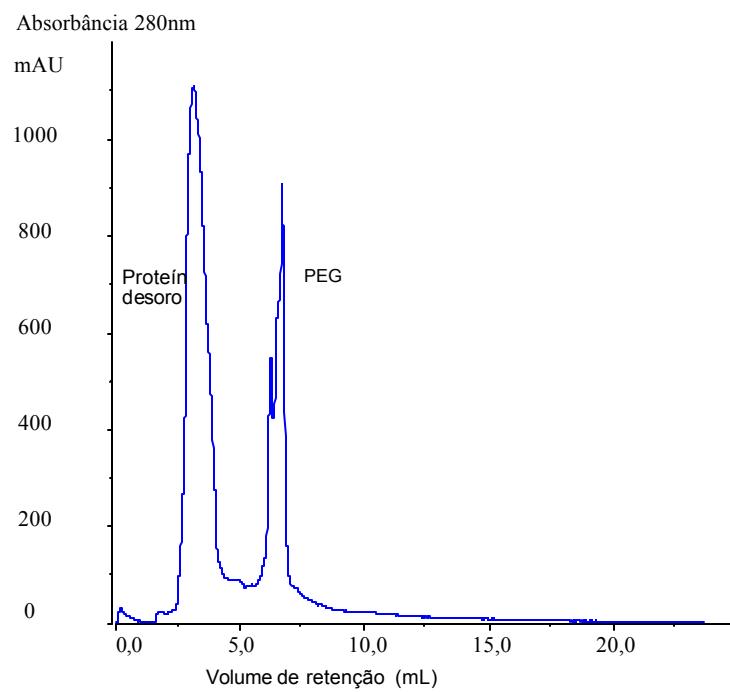


Figura 4.12 Eluição das proteína do soro de queijo e de PEG, na fase polimérica; condição C4.

Na avaliação das condições pré-selecionadas para o processo, foram usados os dados de produtividade e de resolução que estão apresentados na Tabela 4.3. Pode-se observar que C1 e C2, nas fases salina e polimérica, respectivamente, levaram às melhores condições de processo em termos de produtividade. Relacionado ao grau de separação, C3 e C4 apresentam os valores mais elevados devido ao menor tamanho da partícula do leito (Shepadex® G-25 superfino). Esta matriz apresenta uma maior resolução na fase polimérica, mas uma baixa produtividade que é muito inferior à obtida pela matriz composta por Shepadex® G-25 médio.

Este trabalho estabeleceu as condições C1 e C2 como ótimas para a purificação das proteínas do soro de queijo das fases dos SAB.

Deve-se ressaltar que é importante considerar tanto pureza dos compostos isolados quanto a separação por unidade de tempo (ou produtividade do processo) para que sejam asseguradas condições de operações satisfatórias em níveis econômicos ótimos (HUPE e LAUER, 1981; GERBERDING e BYERS, 1998).

Tabela 4.3 - Determinação das condições ótimas de operação

Condições	Resolução	Produtividade	% Separação
C1	1,525	0,4317	99,7
C2	1,285	0,3128	99,5
C3	1,486	0,0390	99,6
C4	1,662	0,4317	99,8

4.3. Análises das frações obtidas na purificação das fases

A Figura 4.13 apresenta um cromatograma do isolado protéico de soro de queijo em pó (Davisco Foods, USA) usado na preparação dos SAB.

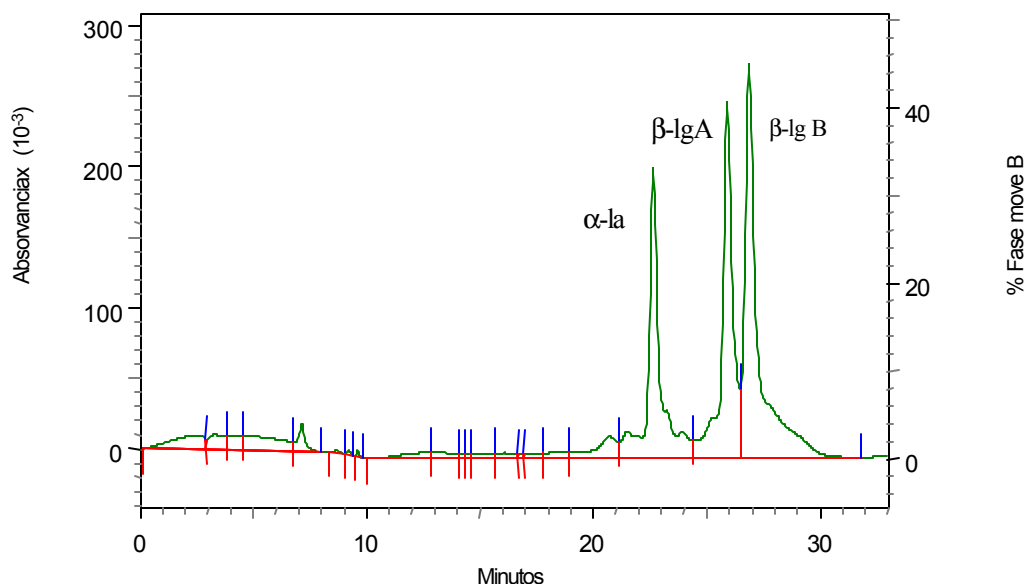


Figura 4.13 Cromatograma de isolado protéico de soro de queijo.

Para quantificar a concentração de α -la e β -lg, nas frações coletadas, foi necessário construir as curvas de calibração das proteínas puras, que são apresentadas nas Figuras 4.14 e 4.15. Para tanto, foram utilizados os dados obtidos da relação da área dos picos em função da concentração de proteínas puras (ZUÑIGA, 2000).

As curvas das Figuras 4.14 e 4.15 foram determinadas por análise de regressão linear dos dados baseados na dispersão dos resíduos e no valor do coeficiente de determinação. Esta metodologia apresentou uma boa eficiência na separação dos picos assim como um tempo de análise relativamente curto igual a 35 minutos. Os coeficientes de correlação foram elevados para ambas curvas, da α -la ($R^2 = 0,999$) e da β -lg ($R^2 = 0,989$).

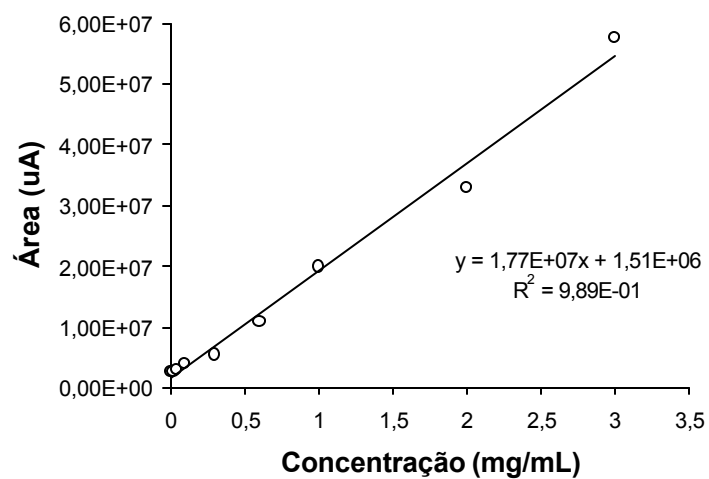


Figura 4.14 Curva de calibração para β -lactoglobulina.

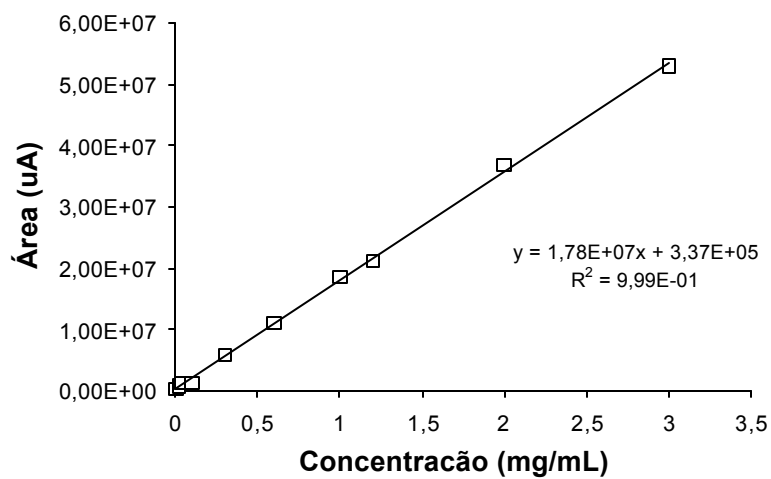


Figura 4.15 Curva de calibração para α -lactoalbumina.

Nas condições selecionadas, C1 e C2, foram coletadas amostras de 5 mL de volume de eluição, para posterior análise de α -la e β -lg por CLAE-FR. Na Tabela 4.4, são apresentadas as concentrações de α -la e β -lg das frações coletadas. Nas Figuras 4.16 e 4.17, pode-se observar a adequabilidade do processo através do grau de separação e da concentração das proteínas nas frações coletadas de cada fase. É possível, assim, observar a presença de baixíssimas concentrações de β -lg na fase polimérica e de α -la na fase salina.

Os valores das concentrações das frações, apresentados na Tabela 4.4, foram baixos uma vez que as amostras foram diluídas em água durante o processo de purificação.

De acordo com os resultados dos cromatogramas das Figuras 4.9, 4.10, 4.16, e 4.17, o uso da CEM assegurou um elevado grau de separação das proteínas do soro de outros constituintes dos SAB, ou seja, do PEG e do sal.

Tabela 4.4 - Concentração das frações coletadas

Fase coletada	C α (mg/mL)	C β (mg/mL)
Fase polimérica	0,22858	0,00457
Fase Salina	0,00536	0,21354

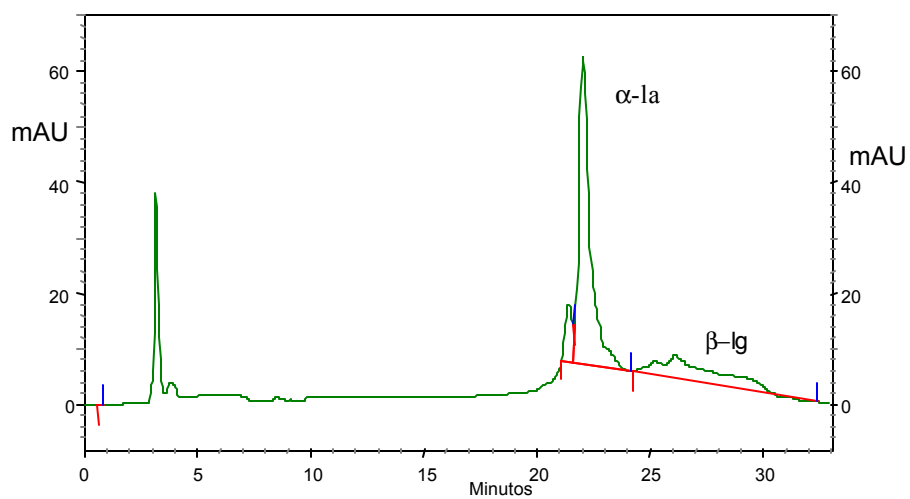


Figura 4.16 Análise da fração coletada da fase polimérica.

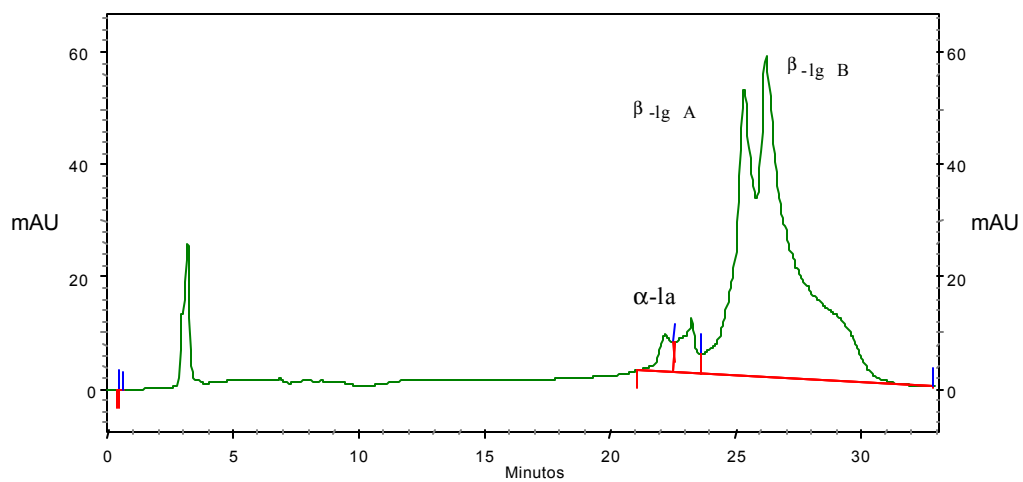


Figura 4.17 Análise da fração coletada da fase salina.

4.4. Modelagem matemática da CEM

4.4.1. Determinação dos parâmetros físicos do modelo

Os valores dos parâmetros ε_b , ε_p e ε_a^p , usados na solução do modelo, estão apresentados na Tabela 4.5 e foram calculados de acordo com os itens 3.5.1, 3.5.2 e 3.5.3.

Tabela 4.5 – Parâmetros físicos usados no modelo

Soluto	ε_p	ε_b	ε_a^p
Proteína fase salina	0,74776	0,40234	0,089476
Proteína fase polimérica	0,74776	0,40234	0,170431
Sal (FFP)	0,74776	0,40234	0,830851
PEG	0,74776	0,40234	0,707280

Os valores de ε_b e ε_p foram calculados utilizando as eqs. (28) e (29), respectivamente. Na Tabela 4.5, pode-se observar que o valor de ε_b permanece constante para todos os solutos, já que este parâmetro é dependente somente do tamanho da partícula do gel da coluna e do procedimento para empacotamento da mesma. ε_p também permanece constante porque é uma função direta de ε_b (ALTENNHÖNER, 1997; ZHIGUO, 1998).

Para cada uma das macromoléculas do processo, os valores de ε_a^p foram calculados pela eq. (30). As proteínas apresentaram baixos valores de ε_a^p , pois, devido à sua elevada massa molecular, são totalmente excluídas do volume dos poros das partículas (dependendo do LEM do gel), o que está de acordo com o princípio de separação envolvido na CEM. Por outro lado, o sal e o PEG, por possuírem baixas massas moleculares, penetram nos poros das partículas. Este é o motivo pelo qual os valores de ε_a^p são elevados.

4.4.2. Cálculo dos parâmetros de transferência de massa

Os parâmetros de transferência de massa foram calculados para as condições de vazão e de volume de injeção de amostra selecionadas no item 4.2.5, 2 mL/min e 0,5 mL para a fase salina e 4 mL/min e 0,5 mL para a fase polimérica.

Os parâmetros de transferência de massa foram obtidos por modelagem, conforme visto no item 3.5.2 e estão apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Parâmetros de transferência de massa preditos

Soluto	Pe	Bi	η
Proteína fase salina	1850	100	0,0500
Proteína fase polimérica	1350	2000	0,0053
Sal (FFP)	4000	7,669	7,5325
PEG	38,60	104,50	332,60

O valor de Pe está diretamente relacionado com o coeficiente de dispersão axial (D_b). D_b é dependente tanto da difusão molecular quanto da mistura retroativa. Os diversos solutos envolvidos neste trabalho possuem diferentes valores de difusão molecular e, conseqüentemente, diferentes números de Pe . Adicionalmente, as diferenças em Pe são também decorrentes das variações nas condições operacionais para as fases, principalmente, a da vazão que exerce maior influência sobre Pe (GUIOCHON et al., 1994).

η está relacionado com o coeficiente de difusão no interior dos macroporos (D_p). Como D_p depende da difusividade molecular do soluto, as proteínas apresentaram baixos valores de η por serem eluídas antes do sal e do PEG.

Bi está relacionado diretamente com o coeficiente de transferência de massa no filme (K_m) e inversamente com o coeficiente de difusão no interior dos macroporos (D_p). O coeficiente de transferência de massa no filme depende das condições hidrodinâmicas e da vazão (GUIOCHON et al. 1994).

4.4.3. Influência dos parâmetros de transferência de massa sobre o espalhamento dos picos no modelo de CEM

Por meio do modelo matemático desenvolvido, avaliou-se o efeito dos parâmetros adimensionais Pe , Bi e η sobre a transferência de massa dos sistemas em estudo. Essa análise de sensibilidade é importante pois permite estabelecer para qual dos parâmetros deve-se ser mais rigoroso na estimativa usando o modelo matemático.

4.4.3.1. Influência do número de Pe

Para avaliar o efeito de Pe sobre a transferência de massa dos quatro solutos em estudo, todos os outros parâmetros foram mantidos constantes. Os perfis de concentração adimensionais foram determinados para Pe iguais a 10, 100, 1.000 e 2.000. Os valores utilizados para os outros parâmetros são mostrados na Tabela 4.7.

Os resultados das simulações são apresentados nas Figuras 4.18, 4.19, 4.20 e 4.21. Nas condições avaliadas, pode-se observar que o aumento em Pe elevou a resolução dos picos para os solutos em estudo. Para Pe maiores ou iguais a 1.000, obteve-se uma mínima influência sobre o espalhamento dos picos cromatográficos. Assim, Pe está inversamente relacionado com o coeficiente de dispersão axial (D_b). Adicionalmente, Pe foi influenciado pela vazão da fase móvel com a qual tem uma relação direta.

Os resultados concordam com os obtidos por ZHIGUO et al. (1998), que relataram um espalhamento insignificante nos picos para Pe superiores a 1.000.

Tabela 4.7 – Valores dos parâmetros usados na simulação numérica

Soluto	i	η	ε_b	ε_p	ε_p^a	τ_{inj}
Sal	10	10	0,40234	0,74776	0,83085	0,16
Proteína (fração salina)	10	10	0,40234	0,74776	0,08947	0,16
PEG	10	10	0,40234	0,74776	0,70728	0,16
Proteína (fração polimérica)	10	10	0,40234	0,74776	0,17043	0,16

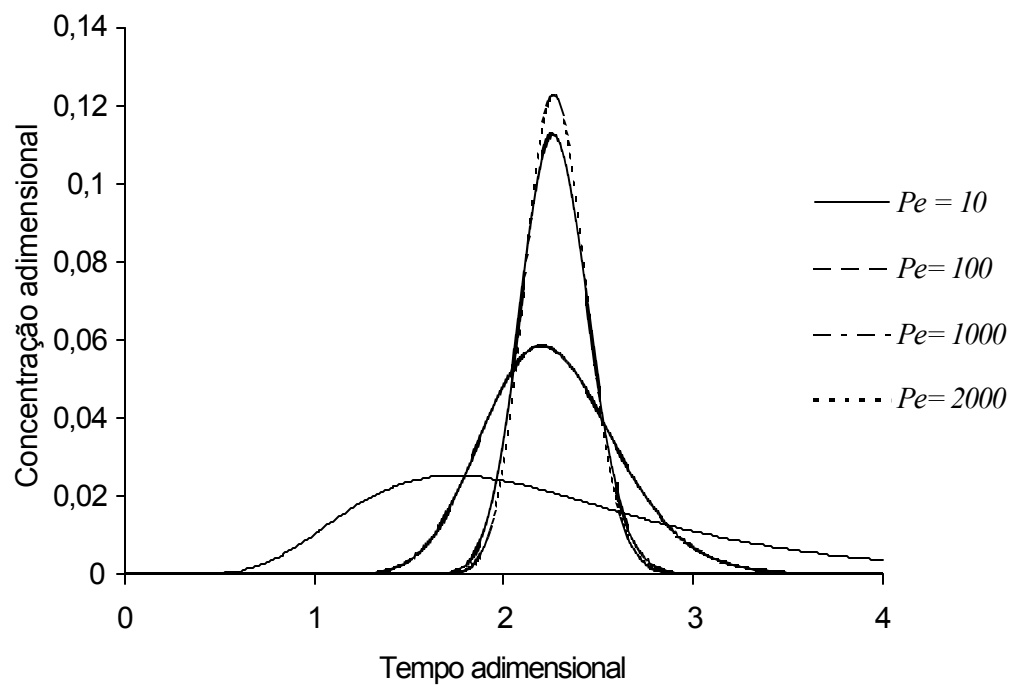


Figura 4.18 Efeito de Pe sobre a eluição do sal (FFP) na fase salina.

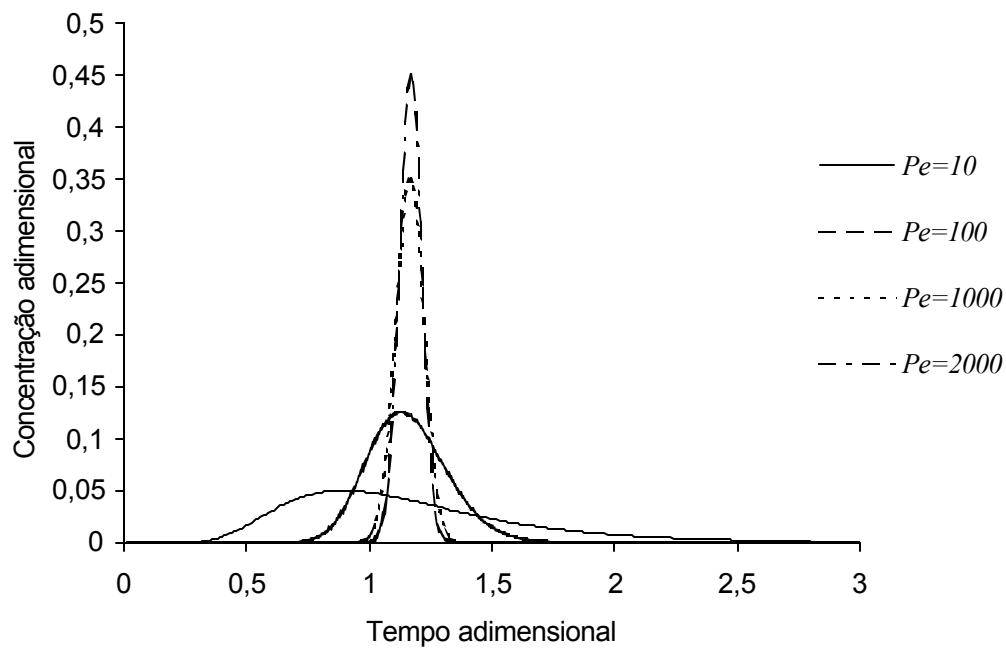


Figura 4.19 Efeito de Pe sobre a eluição da proteína na fase salina.

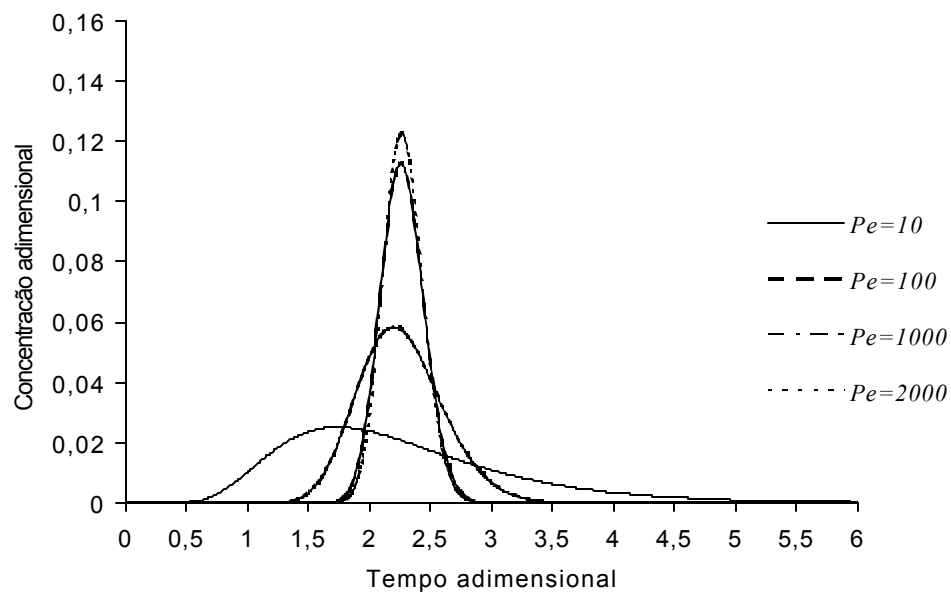


Figura 4.20 Efeito de Pe sobre a eluição do PEG na fase polimérica.

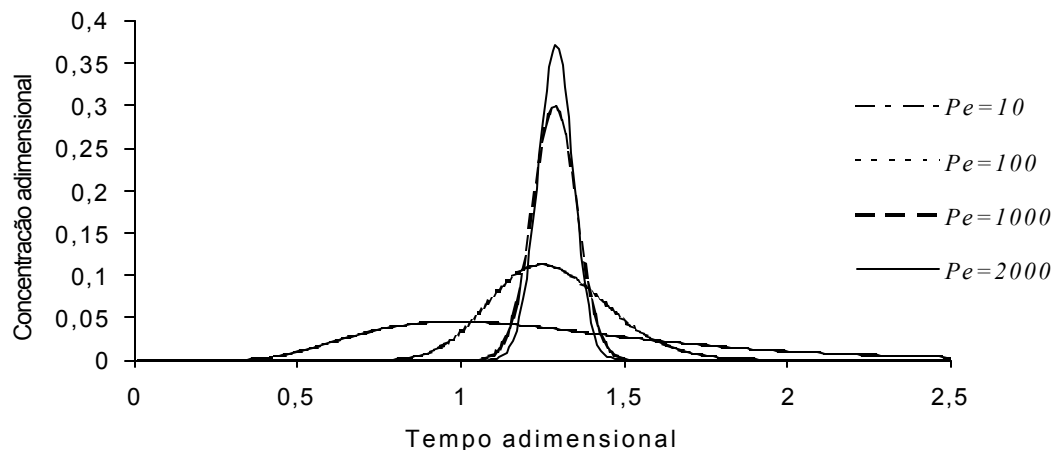


Figura 4.21 Efeito de Pe sobre a eluição da proteína na fase polimérica.

4.4.3.2. Influência do parâmetro Bi

Para avaliar a influência de Bi sobre a transferência de massa dos quatro solutos em estudo, todos os outros parâmetros foram mantidos constantes conforme apresentado na Tabela 4.8. Os perfis de concentração adimensionais foram determinados para Bi iguais a 2, 10, 100 e 200.

Os resultados das simulações são mostrados nas Figuras 4.22, 4.23, 4.24 e 4.25. Depreende-se que o aumento em Bi aumenta a resolução dos picos dos solutos em questão. Em todas as simulações, o perfil de eluição para Bi igual a 200 foi equivalente ao de Bi igual a 100. Para as proteínas, Figuras 4.23 e 4.25, observa-se que a influência de Bi sobre a formação dos picos cromatograficos, dentro das condições estudadas, foi insignificante. Portanto, foi possível deduzir que Bi tem uma relação inversa com o coeficiente de difusividade dentro da partícula (D_p).

As proteínas têm um mínimo valor de D_p com relação ao PEG e o sal pois as mesmas são totalmente excluídas dos poros da partícula.

Tabela 4.8 – Valores dos parâmetros usados na simulação numérica

Soluto	η	ε_b	ε_p	ε_p^a	$\tau_{\eta j}$
Sal	500	10	0,40234	0,74776	0,83085
Proteína (fração salina)	500	10	0,40234	0,74776	0,08947
PEG	500	10	0,40234	0,74776	0,70728
Proteína (fração polimérica)	500	10	0,40234	0,74776	0,17043

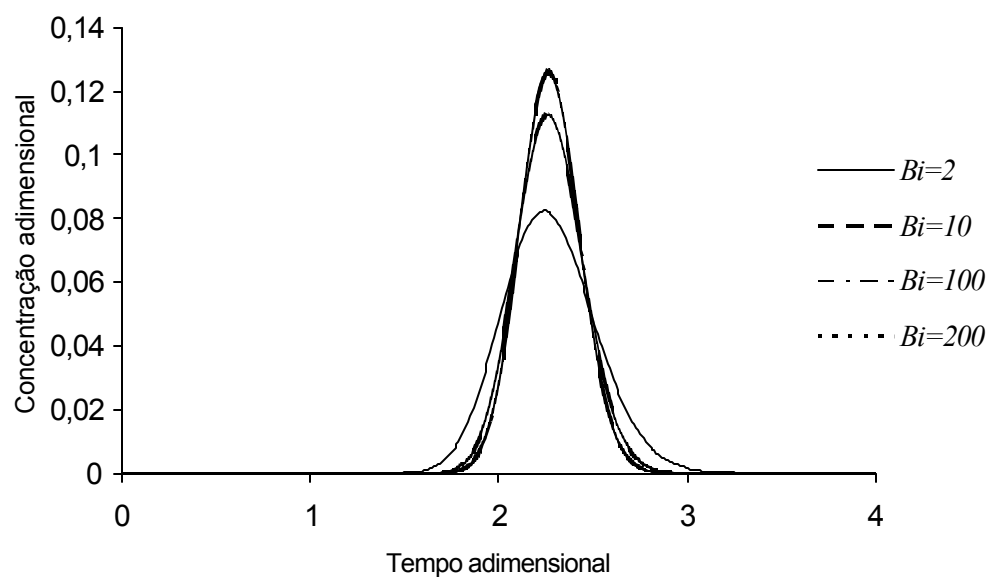


Figura 4.22 Efeito de Bi sobre a eluição do sal na fase salina.

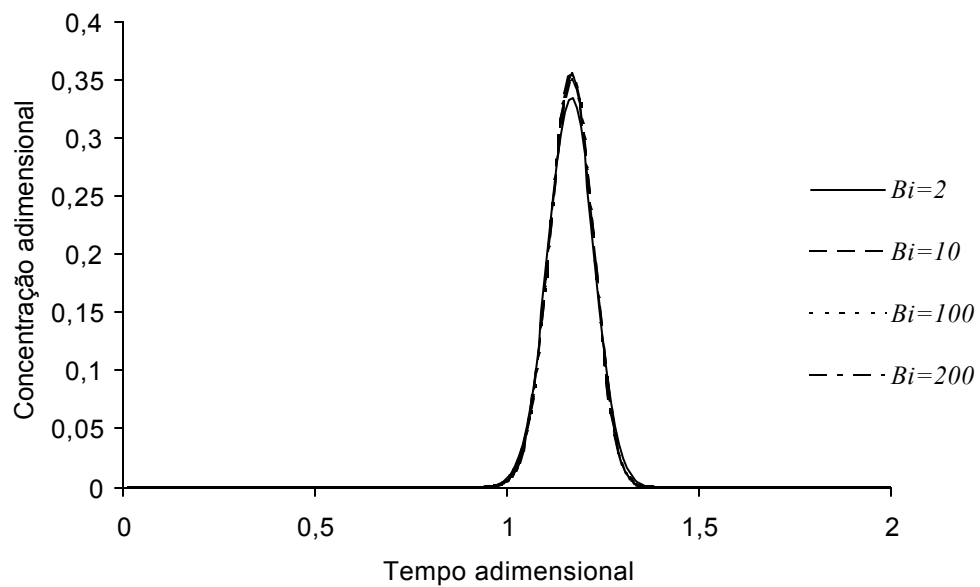


Figura 4.23 Efeito de Bi sobre a eluição das proteínas na fase salina.

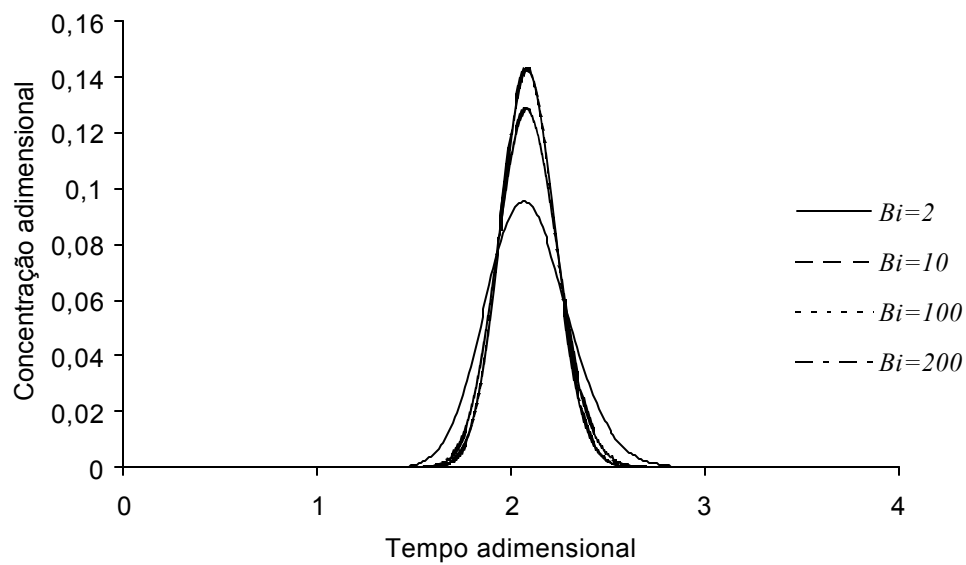


Figura 4.24 Efeito de Bi sobre a eluição do PEG na fase polimérica.

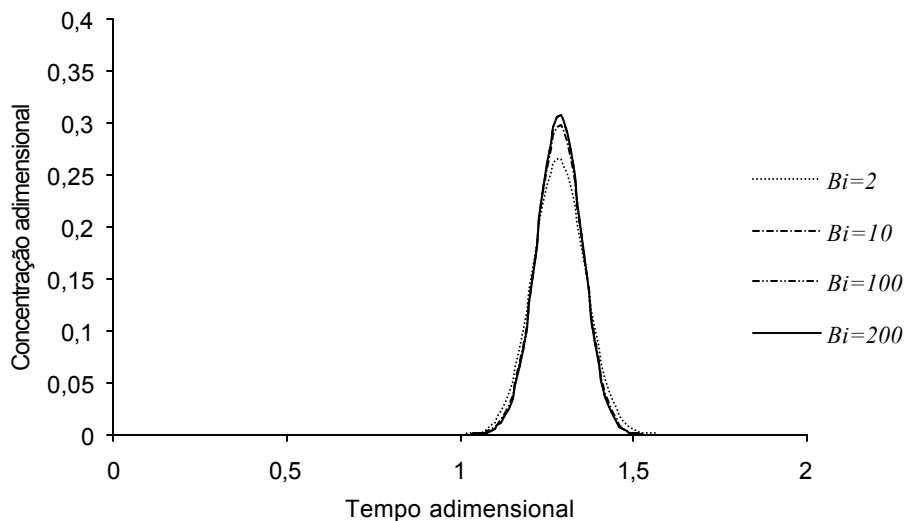


Figura 4.25 Efeito de Bi sobre a eluição da proteína na fase polimérica.

4.4.3.3. Influência do parâmetro η

Para analisar a influência de η sobre a transferência de massa dos quatro solutos em estudo, todos os outros parâmetros foram mantidos constantes conforme mostrado na Tabela 4.9. Os perfis de concentração adimensionais foram determinados para η iguais a 2, 10, 100 e 200.

Os resultados das simulações são apresentados nas Figuras 4.26, 4.27, 4.28 e 4.29. Pode-se observar que o aumento de η elevou a resolução dos picos dos solutos em questão. Nas figuras 4.26 e 4.28, percebe-se que, quando η decresceu, a formação dos picos foi afetada, ocasionando o alargamento das bandas cromatográficas. No entanto, dentro das condições estudadas, esta influência sobre a resolução dos picos das proteínas (Figuras 4.27 e 4.29) foi muito pequena, uma vez que, a partir de η superiores ou iguais a 5, a largura das bandas foi praticamente igual. Estes resultados afirmam os de ZHIGUO et al. (1998), que concluíram que η afeta significativamente a formação dos picos cromatográficos.

Tabela 4.9 – Valores dos parâmetros usados na simulação numérica

Soluto	e	Bi	ε_b	ε_p	ε_p^a	τ_{inj}
Sal	500	10	0,40234	0,74776	0,83085	0,16
Proteína (fração salina)	500	10	0,40234	0,74776	0,08947	0,16
PEG	500	10	0,40234	0,74776	0,70728	0,16
Proteína (fração polimérica)	500	10	0,40234	0,74776	0,17043	0,16

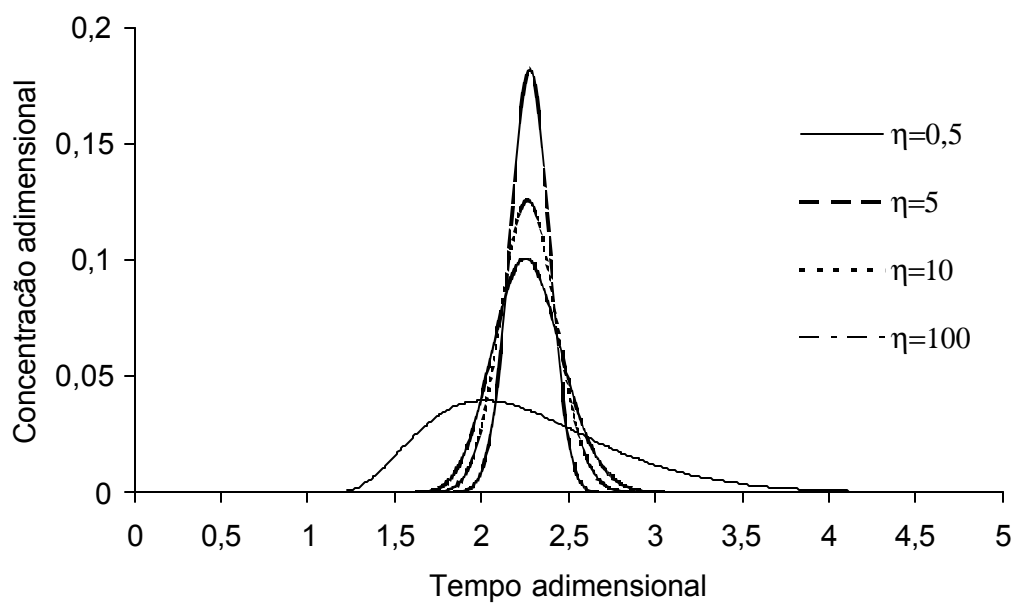


Figura 4.26 Efeito de η sobre a eluição do sal na fase salina.

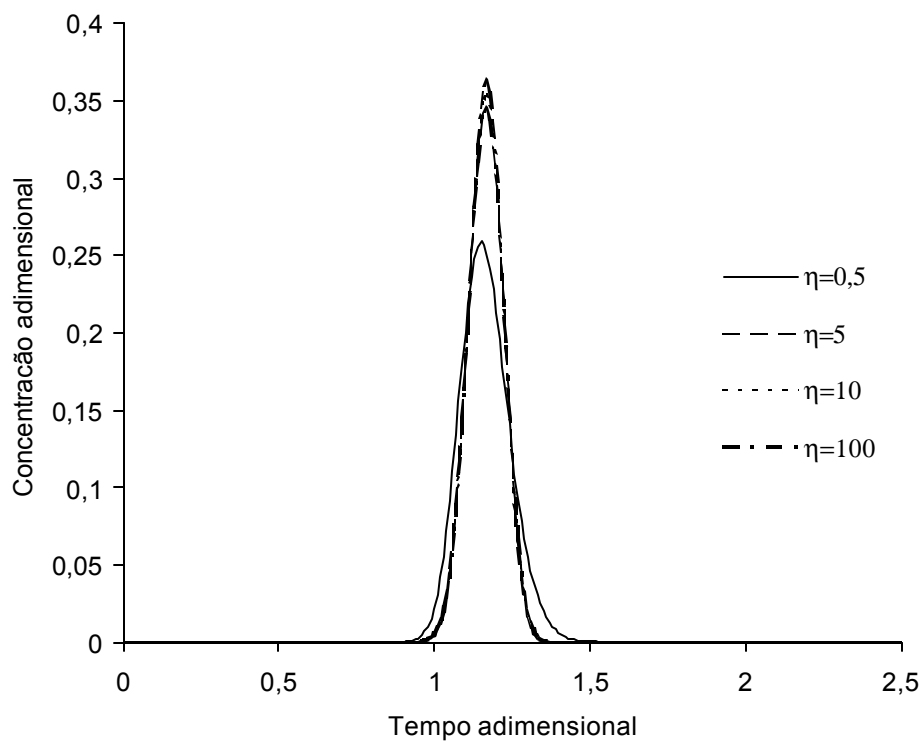


Figura 4.27 Efeito de η sobre a eluição das proteínas na fase salina.

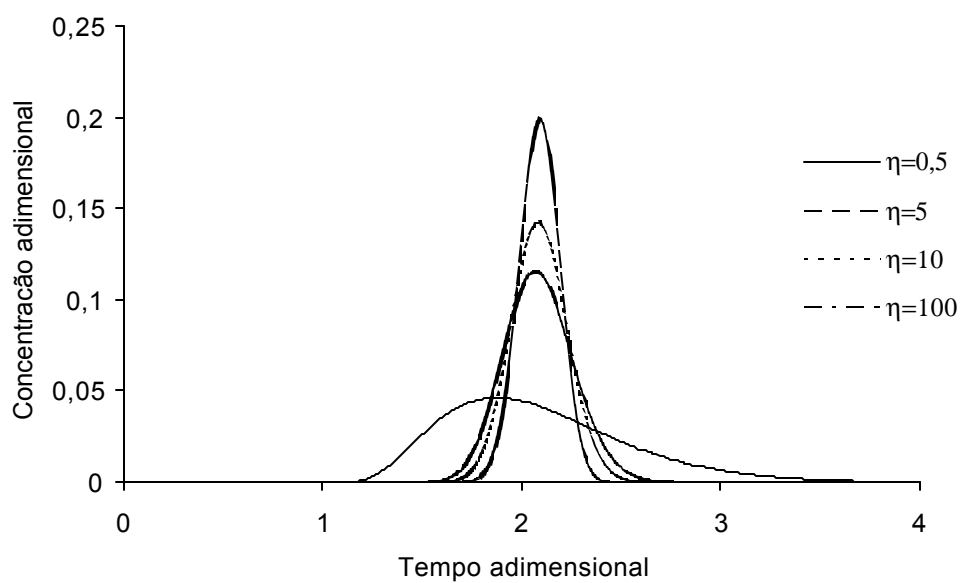


Figura 4.28 Efeito de η sobre a eluição do PEG na fase polimérica.

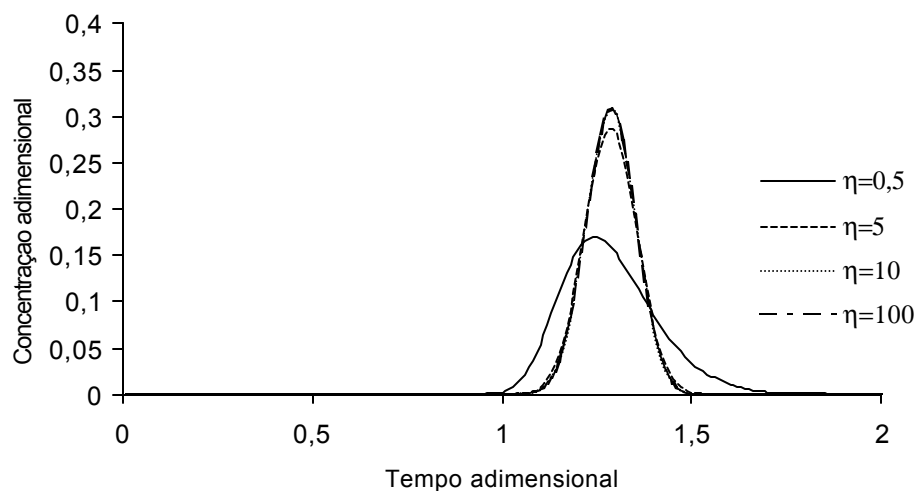


Figura 4.29 Efeito de η sobre a eluição das proteínas na fase polimérica.

4.4.4. Resultado da solução numérica do modelo

O perfil de eluição dos solutos presentes nas fases foi determinado a partir dos parâmetros físicos (Tabela 4.5) e dos parâmetros de transferência de massa (Tabela 4.6).

Por meio do modelo matemático desenvolvido, foi calculada a concentração adimensional dos componentes em função do tempo adimensional. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.30 e 4.31, onde pode-se observar os perfis de eluição para as fases polimérica e salina, respectivamente.

O modelo matemático desenvolvido foi capaz de prever, com boa precisão, os perfis de eluição e os tempos de retenção dos solutos. Em todas as simulações numéricas, o desvio no balanço de massa foi menor que 0,1%.

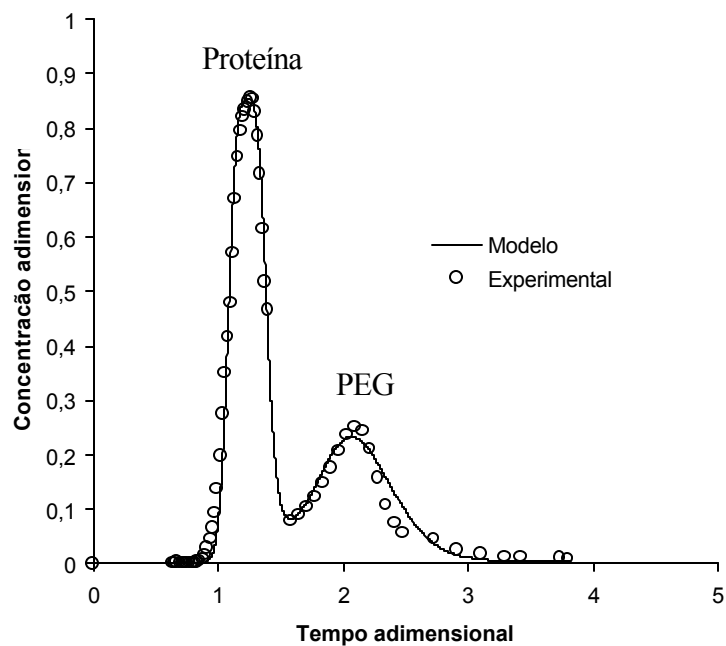


Figura 4.30 Perfil de eluição dos componentes na fase polimérica

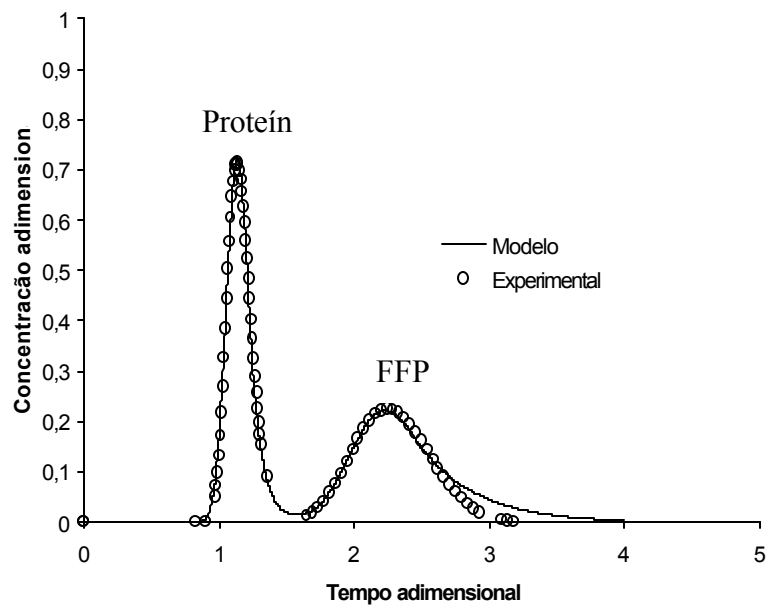


Figura 4.31 Perfil de eluição dos componentes na fase salina

4.4.5. Influência do volume de amostra injetado

Para estudar a influência do volume de amostra injetado sobre a separação das proteínas na coluna utilizada neste trabalho, considerou-se os seguintes valores de volumes de injeção de amostra: 0,1 mL, 0,5 mL, 1 mL e 2 mL que corresponderam às frações de 1,25%, 6,25%, 12,5% e 25% em relação ao volume total da coluna. Os dados empregados para os outros parâmetros são mostrados na Tabela 4.10

As simulações são apresentadas nas Figuras 4.32 e 4.33. Pode-se observar que o aumento no volume de injeção da amostra diminuiu a eficiência do processo de separação; isto é, a resolução na separação dos solutos diminuiu com o aumento do volume de injeção. Este resultado está de acordo com os dados obtidos experimentalmente neste trabalho.

Na técnica de separação de grupos da CEM, recomenda-se usar até 30% do volume total da coluna (FISCHER, 1974), mas nota-se, nas Figuras 4.32 e 4.33, que quanto maior a percentagem de volume injetado, maior a perda de resolução.

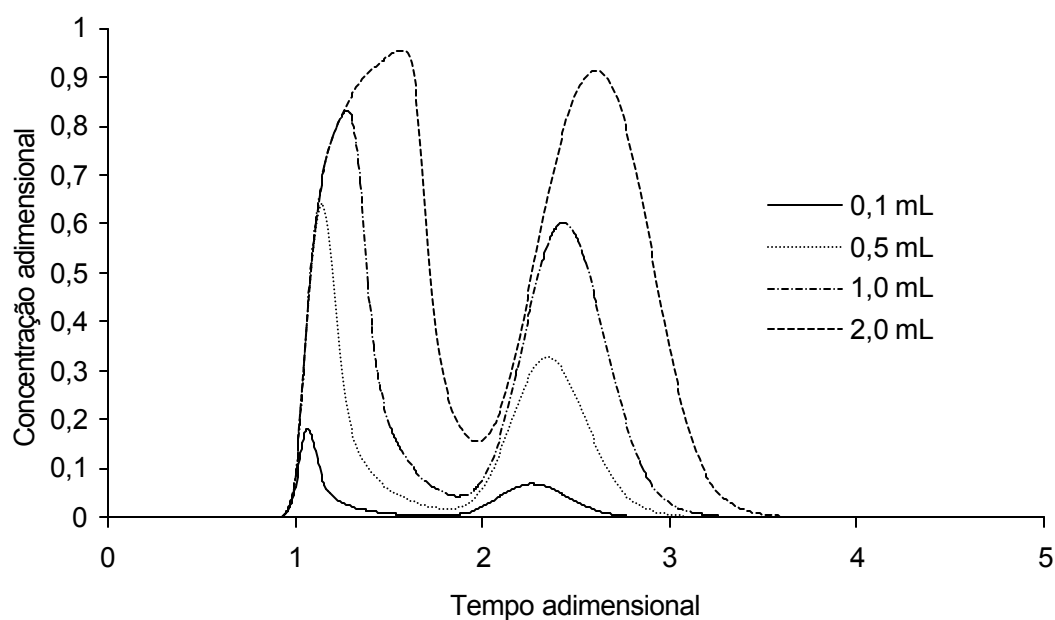
FELIPE e LAW (1997) ao separarem proteínas de soro de queijo, relataram também a perda de resolução com o aumento do volume de injeção na coluna.

Assim, pode-se dizer que a predição das condições de operação da CEM pelo modelo desenvolvido foi adequada.

Segundo ALTENNHÖNER et al. (1997), a simulação cromatográfica torna-se necessária em um processo de produção em grande escala. Os modelos matemáticos descrevem com precisão o comportamento no processo de separação, mas podem ser afetados por erros cometidos na determinação dos parâmetros de operação da coluna usada no processo de separação.

Tabela 4.10 – Valores dos parâmetros usados na simulação numérica

Soluto	eL	$I\ Bi$	η	ε_b	ε_p
Sal	4000	7,669	7,5325	0,40234	0,74776
Proteína (fração salina)	1850	100	0,05	0,40234	0,74776
PEG	38,591	104,467	332,63	0,40234	0,74776
Proteína (fração polimérica)	1350	2000	0,005	0,40234	0,74776



F

figura 4.32 Efeito do volume de injeção da amostra sobre a eluição das proteínas na fase salina.

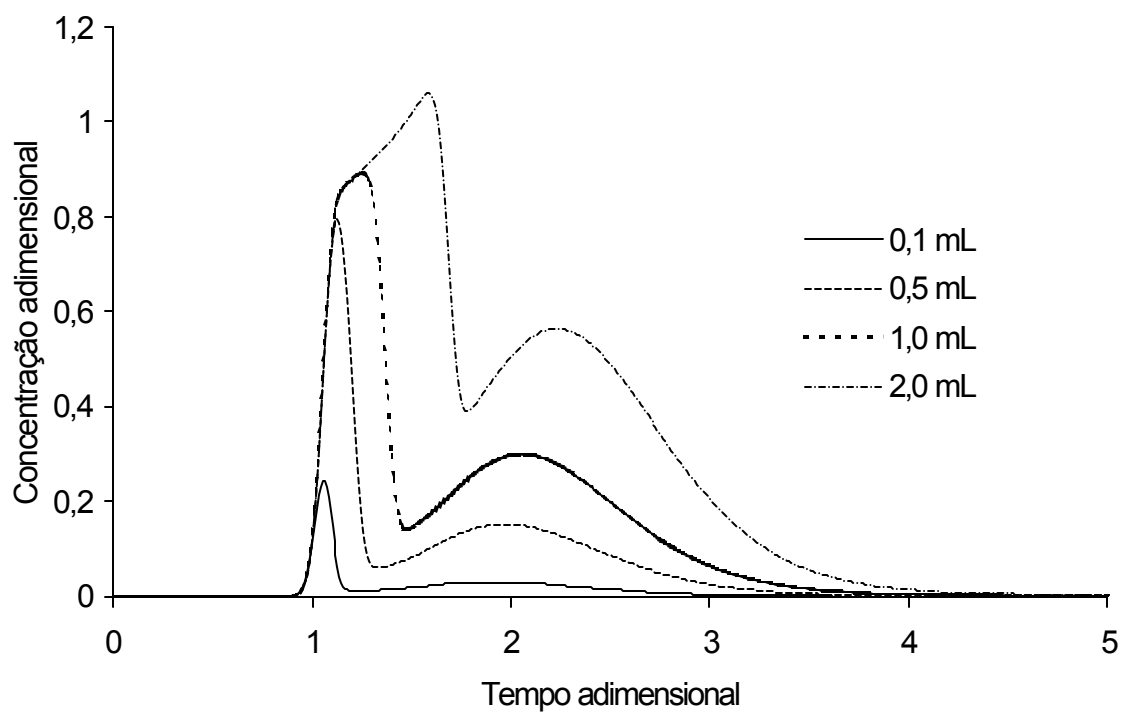


Figura 4.33 Efeito do volume de injeção da amostra sobre a eluição das proteínas na fase polimérica.

5. CONCLUSÕES

- 1 - As proteínas do soro de queijo α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, presentes nas fases polimérica e salina de SAB, foram purificadas satisfatoriamente mediante o uso da CEM. Foram separadas das proteínas as moléculas de FFP e PEG que constituíram as fases do sistema.
- 2 - O emprego de diferentes concentrações de soro de queijo no SAB alteraram as viscosidades das fases. O sistema selecionado para estudo foi composto de 18% (p/p) PEG 1500 + 18% (p/p) FFP (pH 7) + 10% (p/p) de IPS + 54 % (p/p) água.
- 3 - Os parâmetros vazão da fase móvel, volume de amostra e tipo de gel influenciaram na purificação das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina nas fases dos SAB estudados.
- 4 - As condições operacionais ótimas do processo, em termos de pureza e de produtividade foram de 4,0 mL/min de vazão e 0,5 mL de volume de amostra para a fase polimérica e de 2,0 mL/min de vazão e 0,5 mL de volume de amostra para a fase salina.
- 5 - O tipo de gel mais adequado para a separação, foi o Shepadex® G-25 médio.

- 6 - O grau de purificação das proteínas do soro foi de 99,7% e 99,5 % para as fases polimérica e salina, respectivamente.
- 7 - O modelo de transferência de massa usado representou adequadamente os resultados experimentais para CEM.
- 8 - Os parâmetros de transferência de massa P_{eL} e η foram os mais sensíveis na solução do modelo matemático.
- 9 - O modelo matemático empregado levou a uma predição satisfatória tanto para os tempos de retenção das biomoléculas do processo quanto para a perda de resolução, devido ao aumento do volume de injeção de amostra na coluna.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON P. A.** Partition of cell particles and macromolecules. **New york,** John Wiley, p. 346, 1986.
- ASENJO J. A.** Separation processes in biotechnology. **New York, Marcell Dekker** INL, p. 801, 1990.
- ALTGELT K. H.** Gel permeation cromatography. Advances in Chromatography, **New York, Marcell Dekker INL,** p. 8-35, 1968.
- ALTENNHÖNER U, MEURER M., JOCHEN S., HENNER S.T.** Parameter estimation for the simulation of liquid chromatography. Journal of chromatography A, vol 769, p. 59-69, 1997.
- BEREK D.** Coupled liquid chromatographic techniques for the separation of complex polymers. Progress in polymer science, 25, p. 873-908, 2000.
- BROOKS D. E., SHARP K. A., FISHER D.** Theoretical aspects of partitioning in aqueous two-phase systems. In **DENNIS J. KUBEK and ROGER G. HARRISON (Ed.).** Protein Purification Process Engineering, p. 89-114, 1994.
- BROYLES S. B., SHALLIKER R. A., CHERRAK E. D., GUIOCHON G.** Visualization of viscous fingering in chromtographic columns. Journal of chromatography A, vol 882, p. 173-187, 1998.
- BIRD R. B., STEWART W. E., LIGHFOOT E. N.** Transport phenomena. **New York, Jhon Wiley & Sons,** p. 780, 1960.
- CASTELLS R. C., CASTELL C. B., CASTILLO M. A.** Influencia of differences between sample and mobile phase viscosities on the shape of chromatographic elution profiles. Journal of chromatography A, vol 775, p. 73-79, 1997.
- CAYOT P. and LORIENT D.** Food proteins and their applications. Ed. **Srinivasan Damodaran Alain Paraf, Marcel Dekker,** p.226-257, 1997.

- CONCEIÇÃO B. L., BARROSO M.A., FERREIRA C. F., BUNTE M. L., LOURENÇO M. M.** Cálculo numérico (com aplicações). 2 Ed. São Paulo; Editora Harbra Ltda, p. 367. 1987.
- COLLINS C. H., BRAGA G. L., BONATO, P. S.** Introdução a métodos cromatográficos. 7. Ed. Campinas, SP. Editora da UNICAMP, p.279, 1997.
- COIMBRA, J. S. R.** Desempenho de um extrator tipo graesser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos, Campinas, SP: UNICAMP, 1995. Dissertação (Tese Doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 129p, 1995.
- CHEN J. P.** Partitioning and separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in peg/potassium phosphate two phase systems. **Journal Fer. Bioengineering**, v. 73, p. 360, 1996.
- CHIANCONE E. and GATONI M.** Selective removal of β -lactoglobulin directly from cow's milk and preparation of hypoallergenic formulas; a bioaffinity method, **Biochnol. Appl. Biochem**, 18, p. 1-8, 1993.
- DALVIE S. K., GAJIWALA K. S., BALTUS R. E.** Mathematical model of a rotating annular continuous size exclusion chromatograph. **Downstream Processing and Biosseparation.**, American Chemical Society, Washington D.C., p. 269-284, 1990
- FALLOW A., BOOTH R. F. G. and BELL L. D.** Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology-applications of HPLC in biochemistry. **Elsevier, Amsterdam**, p.200, 1993
- FENNEMA.** Química de los alimentos. Zaragoza - España: Editora Acribia, 1095p., 1993.
- FELIPE X. and LAW A. J.R.,** Preparative-scale fractionation of bovine, caprine and ovine whey proteins by gel permeation chromatography. **Journal of Dairy Research** (1997) vol 64, p. 459-464, 1997.
- FISCHER L.,** Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology an introduction to gel chromatography. Elsevier, New York, p.220, 1974.
- GRASELLI M., NAVARRO A. FERNANDEZ H. L., MIRANDA M. V., CAMPERI Y., and CASCONE O.** Que hacer con el suero de queso. **Ciencia Hoy**, v. 43, p. 223-225, 1997.
- GARCIA H. ONEL, MUSTELIER PAVEL, CLAPES SONIA, GARCIA JOSE C.,** Curso teórico práctico: purificación de biomoléculas. **Centro de Investigaciones Biomedicas (CIBIOMED).** La Habana, 2000.

- GERBERDING S. J. and BYERS C. H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. Journal of Chromatography A, vol.808, p.141-151, 1998.**
- GUIOCHON G., S. G. SHIRAZ, A. M. KATTI. Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography. New york. Academic press, p. 731, 1994.**
- GOTO M. and Mc COY. Inverse size-exclusion chromatography for distributed pore and solute sizes. Chemical Engineering Science, v. 55, p. 723-732, 2000.**
- GUAN Y., WU X. Y., TREFFRY T. E., LILLEY T. H. Studies on the Isolation of Penicillin Acylase from Echerichia Coli by aqueous two-phase partitioning. Biotechnology and Bioengineering, v.40, p. 517-524,1992.**
- HUPE K. P. and LAUER H. H. Selection of optimal conditions in preparative liquid chromatography. Journal of Chromatography A, vol. 203, p.41-52, 1981.**
- HUSTEDT H., KRONER K. H., MENGE U., KULA M. R. Partition in aqueous two-phase systems. Trends Biotech, v.3,n.2, p. 139-144, 1985.**
- HUDDLESTON J. G., R. WANG, and A. LYDDIAT. On the use of mild hydrophobic interaction chromatography for "method scouting" protein purification strategies in aqueous two-phase systems: a study using model proteins. Biotechnology and Bioengineering , vol. 44, p 626, 1994**
- IRVINE G. B. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides a review. Analytica Chimica Acta, 352 p.387-397,1997.**
- JAMES A. T. and MORRIS L. J. New biochemical separations. John Wiley & Sons, p.93, 1964.**
- KABÁTEK Z., GAS B. and VOHLÍDAL J. Gel permeation chromatography of polymers degrading randomly in the column theoretical treatment and practical aspects. Journal of Chromatography A, vol. 786, p.209-218, 1997.**
- KULA M.R., KRONER K.H. and HUSTED H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. In: Adv. Biochem. Eng, ed: Fiechter A, Springer Verlag , Berlin ,Vol. 24 p. 73-118, 1982.**
- LEVISON P.R., HOPKINS A. K. and HATHI P. Influence of column design on process scale ion-exchange chromatography, Journal of Chromatography A, vol. 805, p.3-12 , 1999.**
- LEVISON P.R., JONES R. M. H., TOOME D. W., BAGDER S. E., STREATER M., PATHIRANA E. Influence of flow rate on the chromatography**

performance of agarose- and cellulose-based anion-exchange media.
Journal of Chromatography A , vol. 734, p.137-143 , 1996.

LOUGH W. J., WAINER I. W. (Eds). **Chromatography: fundamental principles and practice.** London, p. 276, 1996.

LUYBEN L. W. **Process modeling, simulation and control for chemical engineers.** MCGraw Hill. USA, p. 725, 1989.

LI M., ZHU Q. Z., MEI. **Partitioning of amino acids by aqueous two-phase systems combined with temperature-induced phase formation.**
Biotechnology Progress, v.13, n1, p.105-108, 1997.

LIANG J. Z. **Pressure effect of viscosity for polymer fluids in die flow,**
Polymer, vol 42, p. 3709-3712, 2000.

MCINTOSHI H. GRAEME, PETER J. ROYLE, RICHARD K. LE LEU, GEOFFREY REGESTER, MELISSA JOHNSON, ROSS L. GRINSTED, RACHEL S. KENWARD and GEOFFEREY W. SMITHERS. **Whey proteins as functional Food ingredients?.** Int. Dairy Journal, n. 8, p. 425-434, 1998.

MORR C. and HÁ E. W. **Whey protein concentrates and Isolates processing and functional properties critical reviews.** In **food Science and Nutrition.** Columbus, v.33, n. 6, p.431-476, 1993.

NIELSEN SUZANNE S. (Ed) **Food Analysis,** Aspen publishers, Inc Maryland, p.630, 1998.

MÄKINEN-KILJUNEN S. and PALOUSUO T. A. **Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of Bovine β -Lactoglobulin in Infant Feeding Formulas and in human milk.** Clin. Exp. Allergy, v. 47, p.347-352, 1992.

PEREIRA M. J. A. **Adsorção de beta-galactosidase de *Scopulariopsis sp.* em resina trocadora de ions objetivando a purificação e a ampliação de escala,** Campinas,SP: UNICAMP, 1995. **Dissertação (Tese Doutorado) Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 138 p, 1999.**

PHARMACIA BIOTECH. **Desalting and buffer exchange with Sephadex G-25,** Sweden, p.1-5,1998.

PHARMACIA BIOTECH. **Fast desalting column HR 10/10.** Sweden, p.1-4,1999.

RAHMS I LUND (Editor), **Gel filtration, principles and methods,Sweden, p.67, 1993.**

RICKER R. D. and SANDOVAL L. A., Fast, reproducible size-exclusion chromatography of biological macromolecules. Journal of Chromatography A, vol. 743 p. 43-50, 1996.

SMITHERS G. W., BALLARD F. J., COPELAND A D., DE SILVA K. J., DIONYSINS D. A., FRANCIS G. L., GORRARD C., GRIEVE P. A., MELNTOSH G. H., MICHELL I. R., PEARCE R. J. and REGESTER G. O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. Journal of dairy Science, 79, 1454-1459, 1996.

SNYDER R. LLOYD, GLAJCH J. L, and KIRKLAND J. J. Practical HPLC Method Development. USA. Wiley, p. 260, 1988.

SUBRAMANIAN G. (Ed) Bioseparation and bioprocessing. Vol. I ,Germany, Whyley-Vich, p 473, 1998.

VEIDE A. T., LINDBACK S. and O ENFORS. Enzyme Microb. Technol In MARCO RITO PALOMARES, MIGUEL HERNANDEZ. influence of system and process parameters on partitioning of cheese whey proteins in aqueous two phase systems. J. Chromatogr. A, vol 81, p. 711, 1988.

WIT J. N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. Journal of Dairy Science, v.81, p.597-608, 1998.

YOST R. W.; ETTRE L. S. and CONLON R. D. Introducción a la cromatografia líquida pratica. Perkin Elmer, 1980, p.567.

ZUÑIGA A. D. G. Sistemas aquosos polietilenoglicol-sal: separacao de α - lactoalbumina e β -lactoglobulina do soro de queijo e hidrodinamica em um extrator graesser. Viçosa: UFV, p 77. Dissertação (Mestrado em Ciencia e Tecnologia de alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2000.

ZHIGUO L., YESONG G. and TINGYUE G. Mathematical modeling and scale-up of size-exclusion chromatography, Biochemical Engineering Journal, vol 2 p. 145-155, 1998.

