

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**Influência da Temperatura, Grau de Expansão e Altura do Leito sobre a
Recuperação e Purificação da Alfa-Lactalbumina a partir do Soro de Leite
Bovino em Leito Expandido de Resina Hidrofóbica.**

**Autora: Líbia de Sousa Conrado Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana**

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia
Química.**

**Campinas - São Paulo
Novembro – 2003**

INIDADE	8
CHAMADA	T/UNICAMP
	024
EX	
OMBO BC/	60995
ROC.	16-22-04
C	☐
D	☒
REÇO	11-02
DATA	25-22-04
CPD	

16 10 333527

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

OL4i

Oliveira, Líbia de Sousa Conrado

Influência da temperatura, grau de expansão e altura do leite sobre a recuperação e purificação de alfa-lactalbumina a partir do soro de leite bovino em leite expandido de resina hidrofóbica / Líbia de Sousa Conrado Oliveira.--Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Cesar Costapinto Santana.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Soro do leite. 2. Leite Proteínas. 3. Proteínas - purificação. 4. análise cromatográfica. I. Santana, Cesar Costapinto II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Tese de Doutorado

Influência da Temperatura, Grau de Expansão e Altura do Leito sobre a Recuperação e Purificação da Alfa-Lactalbumina, a partir do Soro de Leite Bovino, em Leito Expandido de Resinas Hidrofóbicas, defendida por Líbia de Sousa Conrado Oliveira e aprovada em 14 de Novembro de 2003 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof.Dr. Cesar Costapinto Santana (Orientador)
Universidade Estadual de Campinas - FEQ



Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato Silva
Universidade Federal de Campina Grande - DEQ



Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes
Universidade Estadual de Maringá - DEQ



Prof. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Universidade Estadual de Campinas - FEA



Prof. Dr. Everson Alves Miranda
Universidade Estadual de Campinas - FEQ

200420815

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química, defendida pela M. Sc. Líbia de Sousa Conrado Oliveira e aprovada pela banca examinadora em Novembro de 2003.

A handwritten signature in black ink, reading "César Costapinto Santana", written over a horizontal line.

Prof. Dr. César Costapinto Santana

Dedico com amor

A minha mãe Alci, as minhas irmãs Sandra e Eliane, aos meus irmãos Aldo, Saulo, Juninho (*in memorian*) e Giancarlo

Ao meu marido Pedro, ao meu filho Pedro Henrique e a minha filha Ana Luisa

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

Ao professor César Santana pela orientação e paciência que demonstrou durante toda a execução desse trabalho.

Aos professores do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP pelos ensinamentos durante o doutorado e, em especial ao Professor, Dr. Everson Miranda pela confiança profissional e auxílio prestado.

Aos meus amigos de laboratório Adriano, Carla, Chrissana, Elaine, Eduardo, Fábio, Isa, José Antônio, Marcos, Mariza, Mirela, Oselys, Sandra, Sérgio, Salah, Sindélia, Victor e Vinicius.

Aos meus amigos e amigas irmãs (os), companheiras (os), anjos.... Cristiane e Paulo, Elaine, Elba e Saulo, Elcimar e Consuelo, Eliane e Eudésio, Flávio e Gorete, Gabriel e Graça, Josy e Nagel, Joelma, Luciana, Maria Helena, Odelsia e Luciano, Osvaldo e Cássia, Sevé e Biba, Wilma e Pedro.

Ao técnico Gilson, do laboratório do Departamento de Processos Biotecnológico (FEQ-UNICAMP) e, a técnica Elizângela, do Laboratório de Determinação de Propriedades Físicas (FEA-UNICAMP).

Ao Prof. Dr. Lauro Kubota, do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UNICAMP, pelo empréstimo e orientação de como utilizar o eletrodo de íon seletivo.

Ao Programa PICD da CAPES por ter concedido a bolsa de doutorado.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

“O sertanejo é, antes de tudo, um forte.”
Euclydes da Cunha

RESUMO

Neste trabalho são estudados os efeitos da temperatura, grau de expansão e altura do leito sedimentado sobre: a purificação e recuperação da alfa-lactalbumina, a eficiência da coluna em adsorver todas as proteínas do soro do leite bovino e, o comportamento fluidodinâmico da coluna de leite expandido na presença da solução tampão e do soro de leite bovino. A avaliação da fluidodinâmica foi realizada através da análise quantitativa dos parâmetros Pe , N e ϕ obtidos através da aplicação de um modelo matemático, denominado de PDE. Foi utilizado um planejamento fatorial como ferramenta para verificar o efeito das variáveis estudadas. A alfa-lactalbumina é uma proteína hidrofóbica e que se liga ao íon cálcio. Essa ligação provoca uma mudança conformacional na sua estrutura tornando-a mais hidrofílica. Essa propriedade é explorada estrategicamente no processo de purificação. Para entender o processo de adsorção foram obtidas isotermas de equilíbrio do soro a 34 °C, da alfa-lactalbumina e da beta-lactalbumina, separada e conjuntamente, nas temperaturas de 25 e 30 °C, em tanques agitados. Observou-se que a alfa-lactalbumina adsorve mais fortemente no adsorvente hidrofóbico do que a beta-lactoglobulina. Através do processo de adsorção realizado na coluna de leite expandido obteve-se a alfa-lactalbumina com grau de pureza de até 100%, detectado por análise realizada em HPLC, para uma altura de leito de 15 cm, temperatura de 32 °C e grau de expansão de 2,75. A recuperação dessa proteína foi de aproximadamente 9,5%. Através do ajuste dos dados experimentais, obtidos das curvas de Distribuição dos Tempos de Residência (DTR), ao modelo PDE, encontrou-se valores de Pe , N e ϕ , para a condição em que se obteve o grau de pureza de 100%, iguais a 50, zero e 97%, respectivamente, indicando que ocorreu uma baixa dispersão axial na coluna, que não houve formação de camada estagnada e, como consequência, a fluidização do leito não foi comprometida. A análise estatística dos dados do planejamento experimental aponta que a temperatura e o grau de expansão têm

efeito significativo e positivo sobre a pureza da alfa-lactalbumina e dos parâmetros P_e e ϕ , que apenas a temperatura possui efeito significativo e negativo sobre a recuperação, e que o grau de expansão e a temperatura têm efeitos negativos sobre o parâmetro N .

ABSTRACT

In the present work, the effect of temperature, degree of expansion and sedimented bed high on purification and recovery of alpha-lactalbumin, on column efficiency in adsorbing all the bovine whey proteins and the fluidodynamic behaviour of expanded column bed in presence of buffer solution and bovine whey, are studied. The fluidodynamic evaluation was performed by quantitative analysis of Pe , N and ϕ parameters which were obtained by using the PDE mathematical model. An experimental factorial design was used as a tool to verify the multivariable affect. Alpha-lactalbumin is a hydrophobic protein and gets bonded with calcium ion. This bonding results in a conformational change of its structure making it more hydrophilic. This property is strategically explored for the process of purification to understand the adsorption process, the equilibrium isotherm of bovine whey for alpha-lactalbumin and for beta-lactoglobulin at 34 °C, and for alpha-lactalbumin and for beta-lactoglobulin, separately and together, at 25 and 34 °C, were obtained using well stirred tanks. It was observed that alpha-lactalbumin adsorbs more strongly on the hydrophobic adsorbent than the beta-lactoglobulin. Alpha-lactalbumin having 100% purity, detected by HPLC analysis, was obtained by the adsorption process, using an expanded bed column of 15 cm bed high, with 2,75 degree of expansion at 30 °C. The protein recovery was approximately 9,5%. The values of parameters Pe , N and ϕ formed were 50, zero and 97% respectively, which were obtained from the PDE model of the Residence Time Distribution (RTD) curves, thus indicating that in the column, low axial dispersion occurs and there is no formation of a stagnant layer and, consequently, the bed fluidization is not affected. Statistical analysis of the experimental design data points shows that the temperature and degree of expansion have significant and positive effect on the purity of the alpha-lactalbumin and for the parameters Pe and ϕ , only temperature affects significantly and negatively the protein recovery and that the degree of expansion and temperature have negative effects on the parameter N .

NOMENCLATURA

- C_i - concentração inicial de proteína expressa em massa por volume ($M.L^{-3}$)
- C_f - concentração final de proteína ($M.L^{-3}$)
- D_{ax} - coeficiente de dispersão axial ($L^2 .t^{-1}$)
- d - diâmetro da partícula (L)
- D - diâmetro da coluna (L)
- DTR- Distribuição do Tempo de Residência
- E_0 - Distribuição do Tempo de Residência Normalizado
- E_f - Eficiência da coluna em adsorver as proteínas do soro de leite
- G_{exp} - grau de expansão
- K_d - constante de dissociação de equilíbrio do processo de adsorção ($M.L^{-3}$)
- L - comprimento da coluna
- MD- modelo clássico da dispersão
- m - momento da distribuição
- n - parâmetro de Richardson e Zaki determinado experimentalmente
- n_M - valor médio do parâmetro de Richardson e Zaki obtido através dos dados experimentais
- n_{ts} - parâmetro de Richardson e Zaki determinado teoricamente levando-se em consideração o número de Reynolds terminal
- N - parâmetro que indica o grau de interação entre o adsorvente e os componentes presentes na fase líquida
- P - pressão de equilíbrio
- P_s - pressão de saturação
- PDE- modelo matemático que prevê a formação de camada estagnada entre a fase líquida e o adsorvente
- Pe - número de Peclet (adimensional)
- pI - ponto isoelétrico (adimensional)
- P_z - pureza da alfa-lactalbumina
- q - quantidade de soluto, em massa, adsorvido em condições de equilíbrio sobre o adsorvente, expresso por unidade de massa ou volume

qm- quantidade máxima de soluto adsorvido sobre o adsorvente expresso por unidade de massa ou volume.

qs- quantidade máxima de soluto adsorvido sobre o adsorvente expresso por unidade de massa ou volume previsto pelo modelo de Langmuir modificado

Re_{tM} - valor médio do número de Reynolds calculado através do valor médio da velocidade terminal (adimensional)

Re_{tS} - número de Reynolds obtido a partir da velocidade terminal determinada através da equação de Stokes (adimensional)

SDS-PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio.

t- tempo

$\bar{t}$ - tempo de residência médio

v- velocidade linear expresso em unidade de comprimento por tempo

V_s - volume do tanque

v_t - velocidade terminal determinada experimentalmente ($L.t^{-1}$)

v_{tN} - valor médio dos dados experimentais da velocidade terminal ($L.t^{-1}$)

v_{tS} - velocidade terminal determinada através da equação de Stokes ($L.t^{-1}$)

α -La alfa-lactalbumina

β -Lg beta-lactoglobulina

ε_0 - porosidade do leito

ϕ - parâmetro que indica o comprometimento da fluidização devido à formação de camada estagnada.

θ - tempo adimensional

μ_1, μ_2 - momentos normalizado da Distribuição do Tempo de Residência

μ - viscosidade do líquido ($M. L. t^{-1}$)

ρ - densidade do líquido ($M. L^{-3}$)

ρ_s - densidade do sólido ($M. L^{-3}$)

τ - tempo de residência médio

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
NOMENCLATURA	xiii
Capítulo 1- Introdução	1
1.1. Proteínas do Soro do Leite Bovino: Composição, Propriedades e Funções	1
1.2. Leito Expandido: Uma Tecnologia para Recuperar Biomoléculas	3
1.3. Objetivo	4
1.4. Relevância e Justificativa	5
Capítulo 2- Revisão da Literatura	10
2.1. Recuperação de Proteínas do Soro de Leite	
2.1.1. Alfa-Lactalbumina uma Metaloproteína de Alto Valor Nutricional	10
2.2. Purificação de Proteínas por Adsorção	16
2.2.1 Isotermas de Adsorção e Curvas de Rupturas	17
2.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica	22
2.4. Leito Expandido	25
2.4.1. Determinação do Comportamento Fluidodinâmico do Leito Expandido	27
2.4.1.1 Modelo Clássico da Dispersão (MD)	31
2.4.1.2. Modelo PDE	32
2.5. Planejamento Experimental	35
Capítulo 3- Materiais e Métodos	37
3.1. Materiais	40
3.2. Metodologia	41
3.2.1- Determinação das Propriedades Físicas	41
3.2.2. Experimentos Realizados em Tanques Agitados	43
3.2.3. Experimentos Realizados na Coluna	47
3.3. Apresentação do Programa Computacional	54
3.4. Planejamento Experimental	55

Capítulo 4- Resultados e Discussões	57
4.1. Determinação das Condições Preliminares de Adsorção e Eluição da Alfa-Lactalbumina a Partir do Soro de Leite Bovino	58
4.2. Isotermas de Adsorção	60
4.3 Comportamento Fluidodinâmico do Leite Expandido na Coluna	66
SP-25	
4.3.1. Determinação dos Parâmetros de Richardson e Zaki	67
4.3.2. Análise da Distribuição do Tempo de Residência	69
4.3.2.1. Análise da DTR pelo Modelo PDE	71
4.4. Estudo Comparativo entre a Adsorção do Leite Fixo e Leite Expandido	78
4.5. Análise das Curvas de Rupturas e da Determinação da Recuperação e Pureza da Alfa-Lactalbumina a Partir do Soro do Leite Bovino	79
4.5.1. Curvas de Rupturas Obtidas para o Soro do Leite Bovino	80
4.5.2. Recuperação e Purificação da Alfa-Lactalbumina	89
4.6. Otimização do Processo de Adsorção do Soro do Leite Bovino	95
4.6.1. Resultado e Análise do Planejamento Fatorial Completo Linear	95
4.6.2. Análise do Planejamento Fatorial Completo Quadrático	99
4.6.3. Análise dos Efeitos	100
4.6.4. Análise da Regressão dos Modelos Estatísticos	103
Capítulo 5- Conclusão	113
Capítulo 6- Sugestões Para os Próximos Trabalhos	116
Capítulo 7- Referências Bibliográficas	117
Apêndice I- Programa Computacional	127
Apêndice II- Tabelas dos Balanços de Massa para Alfa-Lactalbumina	130
Apêndice III- Tabelas Estatísticas do Planejamento Experimental Fatorial	133

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Proteínas do Soro de Leite Bovino: Composição, Propriedades e Funções

O soro de leite (lactosoro), um produto biológico do rejeito da indústria de laticínios, obtido após a coagulação da caseína em pH 4,6 e temperatura de 20 °C, é possuidor de grande concentração de componentes particulares do leite (peptídios, aminoácidos, lactose, ácido láctico, proteínas, pequenos fragmentos de caseínas, resíduos de gordura do leite e sais minerais).

Em 1987, a produção mundial do soro de queijo foi estimada em cerca de 96 milhões de toneladas, que contêm 0,6 milhões de toneladas de proteína do soro (Sienkiewicz and Ridel, 1994). Estas proteínas, uma vez separadas e purificadas, mantendo suas características funcionais e conformacionais, podem ser utilizadas nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

Na indústria de alimentos, exploram-se as propriedades funcionais das proteínas (tais como absorção e ligação de água, gelatinização, elasticidade) na produção de alimentos como carnes, linguiças e queijos. No tocante à saúde, estas proteínas têm a propriedade de elevar o nível de glutadiona em vários órgãos e no sangue. A elevação da concentração de glutadiona está relacionada com a ativação do sistema imunológico, tanto celular como humoral, podendo resultar em benefícios para pacientes com as seguintes doenças: doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson), arteriosclerose, imunodeficiências, doenças infecciosas e câncer (Brink, 1996, Jacobucci et al., 2001).

As proteínas que se apresentam em maior quantidade no soro de queijo do leite bovino são: beta-lactoglobulina, alfa-lactalbumina, albumina e as imunoglobulinas. A Tabela 1.1 apresenta as composições médias e propriedades de algumas proteínas do soro de queijo do leite bovino.

Tabela 1.1- Composição do soro de queijo do leite bovino (McKenzie, 1970).

Proteína	Concentração (g.L ⁻¹)	Massa Molecular (kDa)	pI
β-lactoglobulina	3,0 a 4,0	18,4	5,2
α-lactalbumina	1,5	14,2	4,7 a 5,1
soralbumina	0,3 a 0,6	69,0	4,9
IgG, IgA, IgM	0,6 a 0,9	150 a 900	5,9 a 7,3

A beta-lactoglobulina (β-Lg) e a alfa-lactalbumina (α-La) são as proteínas encontradas em maior abundância no soro de queijo, com concentrações de aproximadamente 50% e 20%, respectivamente, do total de proteínas do soro.

Segundo McKenzie (1970), a beta-lactoglobulina possui uma hidrofobicidade média de aproximadamente 1075 kcal/resíduo e a alfa-lactalbumina 1020 kcal/resíduo, e são as proteínas que apresentam maior hidrofobicidade entre todas as proteínas presentes no soro do leite bovino. A alfa-lactalbumina liga-se a alguns íons, inclusive o íon cálcio (Ca²⁺), sendo, portanto, caracterizada como uma proteína metálica (Hiraoka et al., 1980). A ligação com o íon cálcio diminui a sua hidrofobicidade, segundo Lindahl e Vogel (1984).

Devido à grande variedade de seus aminoácidos (entre eles a cisteína, triptofano e a metionina), a beta-lactoglobulina e a alfa-lactalbumina têm um grande valor nutricional, principalmente esta última, por possuir uma quantidade significativa de triptofano. A alfa-lactalbumina tem-se mostrado uma modificadora da atividade da enzima galactosiltransferase. Já a função fisiológica da beta-lactoglobulina ainda não está bem estabelecida.

1.2. Leito Expandido: Uma Tecnologia para Recuperar Biomoléculas

Grande parte dos esquemas utilizados para a purificação de proteínas engloba diversas operações unitárias no processo de Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB). Tal fato pode ocasionar baixo rendimento da proteína desejada e aumento de custos. A busca de solução para este problema tem incentivado o desenvolvimento de técnicas que simplifiquem e diminuam o número de operações utilizadas na purificação de biomoléculas.

Na década de 90, a adsorção em leito expandido surgiu como uma alternativa para a purificação de biomoléculas em um meio líquido que contenha partículas em suspensão (células, fragmentos de células, e resíduos sólidos em geral). A adsorção em leito expandido apresenta a vantagem de combinar duas unidades operacionais, concentração e remoção de materiais particulados, evitando um maior tempo de processamento associado à centrifugação e à filtração (Hjorth, 1995).

O desenvolvimento do leito fluidizado estável (leito expandido), com características cromatográficas similares às do leito fixo, foi realizado por Draeger e Chase. A porosidade do leito expandido, que é maior do que a do leito fixo, permite que partículas da suspensão passem através da coluna enquanto a proteína desejada é retida por adsorção.

Chase e Draeger (1992) purificaram imunoglobulina G policlonal humana usando adsorventes de afinidade, proteína A imobilizada em Sepharose Fast Flow, indicando que a adsorção do leito expandido é similar ao do leito fixo, quando a mesma quantidade de adsorvente é usada.

Para que seja mantida uma expansão estável do leito, mesmo a velocidades elevadas, são necessários adsorventes que possuam uma densidade específica apropriada. A partir de 1993, a Pharmacia Biotech, Suécia, introduziu no mercado novos tipos de adsorventes cromatográficos para adsorção em leito

expandido. Estes adsorventes possuem em sua matriz um núcleo de quartzo inerte que providencia tal densidade.

No leite expandido a circulação e mistura das partículas de adsorventes são mínimas e o fluxo do líquido através do leite expandido mostra ter características de fluxo tubular. O ciclo de operação por adsorção em leite expandido alterna etapas de fluidização estável e sedimentação do leite; combinam-se as propriedades hidrodinâmicas do leite fluidizado com as propriedades cromatográficas do leite fixo.

1.2. Objetivo

Esta pesquisa teve como objetivo o estudo do comportamento da adsorção, recuperação e purificação da alfa-lactalbumina do soro de leite bovino por cromatografia de interações hidrofóbicas em leite expandido. Estuda a influência dos parâmetros físicos, altura de leite sedimentado, grau de expansão e temperatura, sobre o processo de separação dessa proteína em leite expandido contendo uma resina hidrofóbica.

Para o alcance desse objetivo, este trabalho de pesquisa foi dividido em três etapas:

- a) Obtenção de isotermas de equilíbrio: da alfa-lactalbumina (85 % de pureza) e beta-lactoglobulina (80% de pureza), separadamente, em resina hidrofóbica nas temperaturas de 25 e 30 °C aplicando-se o modelo de Langmuir; de adsorção binária dessas proteínas na resina, nas temperaturas de 25 e 30 °C, e da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina a partir do soro de leite bovino na temperatura de 34 °C. Deve-se ressaltar que foram realizados estudos prévios para definir os tampões e as condições da adsorção e eluição para alfa-lactalbumina.
- b) Conhecendo-se o comportamento da adsorção da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina separadamente, em uma mistura binária e no soro do leite bovino, determinou-se às curvas de rupturas e eluição das proteínas do soro de leite em leite fixo e leite expandido. As curvas de rupturas do soro do leite

bovino foram obtidas em diferentes alturas de leito sedimentado, temperaturas e graus de expansão. O estudo dos efeitos das combinações dessas variáveis, objetivando verificar a interação das mesmas sobre a adsorção da alfa-lactalbumina e o comportamento fluidodinâmico do leito, foi realizado através de um planejamento experimental fatorial utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta. As variáveis respostas avaliadas foram pureza e recuperação da proteína alfa-lactalbumina, eficiência da coluna em adsorver todas as proteínas do soro de leite e, parâmetros que estão relacionados com o comportamento fluidodinâmico do leito, como por exemplo, o número de Péclet.

- c) Uma vez que a adsorção foi realizada em leito expandido, estudou-se o comportamento fluidodinâmico do leito, com a solução tampão e com o soro do leite bovino. Esse estudo foi dividido em duas partes. A primeira parte consistiu na aplicação da equação de Richardson-Zaki, na presença do tampão de equilíbrio, para a determinação dos parâmetros n e v_t , que indicam o regime de fluxo do escoamento do fluido e fornece a velocidade terminal experimental de equilíbrio das partículas de adsorvente, respectivamente. Na segunda parte foram obtidas, através da aplicação da técnica de estímulo e resposta, curvas de Distribuição do Tempo de Residência (DTR) dos elementos de fluidos que escoam na coluna. A curva de distribuição foi obtida com a solução tampão e com o soro de leite bovino, objetivando a determinação de parâmetros físicos, através da aplicação de um modelo matemático que prevê, além da dispersão axial, troca de matéria entre uma camada dinâmica e uma camada estagnada. Esses parâmetros são as variáveis respostas, citadas no item b, em que se baseia a análise do comportamento fluidodinâmico do leito.

1.3. Relevância e Justificativa

A relevância e justificativa para o desenvolvimento desse projeto de pesquisa concentraram-se na seguinte idéia: escolher um rejeito industrial, rico em proteínas; selecionar para recuperar e purificar, dentre as proteínas desse rejeito, a que se destacasse como uma proteína com características nutricionais e

farmacêuticas importantes para o desenvolvimento humano; traçar uma estratégia de purificação viável e seletiva para a proteína de interesse.

O texto a seguir descreve a relevância e a justificativa da escolha do rejeito industrial ter sido o soro de leite bovino, como também a opção da escolha da proteína recair sobre a alfa-lactalbumina e o método de adsorção empregado ser a cromatografia por interações hidrofóbicas em leito expandido.

Em muitos países, os rejeitos industriais são descartados sem tratamento prévio adequado poluindo o meio ambiente. Grande parte deles possui substâncias de valor de mercado, fato que desperta o interesse por parte de companhias e indústrias na recuperação dessas substâncias. A indústria de laticínios tem como um de seus rejeitos o soro de leite, possuidor de componentes que desempenham funções fisiológicas e bioquímicas. Parte dele é utilizado pela própria indústria de laticínios ou de alimentos e o restante é descartado. Com os recentes avanços na tecnologia de separação, cada vez mais a purificação de proteínas do soro de leite tem sido objeto de pesquisas. Entre todas as proteínas presentes no soro de leite bovino a alfa lactalbumina é a que apresenta o maior coeficiente de eficiência protéica, aproximadamente 3,8; superando inclusive o da caseína e da proteína de soja, segundo Sgarbiere (1987). Heine et al. (1991) estudaram a importância da alfa-lactalbumina na nutrição infantil e recomendam o uso dessa proteína, proveniente do leite bovino, na dieta de crianças desnutridas chamando a atenção para o aumento do valor agregado dessa proteína quando ligada ao íon Ca^{2+} . Purificá-la significa ter uma proteína com alto valor nutricional, aplicá-la na dieta de crianças desnutridas significa diminuir o risco de morte por desnutrição e, se ligada ao cálcio, tem-se um ganho na “batalha” contra a descalcificação óssea.

No entanto ao traçar estratégias de purificação de proteínas, a escolha dos métodos (tais como precipitação, extração, centrifugação, filtração, e/ou adsorção, etc) deve-se considerar os efeitos que as mesmas podem causar sobre as propriedades físico-químicas e funcionais das proteínas após purificação.

Advém desta constatação o interesse crescente pelo desenvolvimento de métodos novos para obter proteínas puras do soro de leite em grande escala.

Na literatura encontram-se, como métodos mais usuais para obtenção da alfa-lactalbumina, a precipitação e a cromatografia de troca iônica. A precipitação acarreta problemas como desnaturação, baixo rendimento e baixa pureza. A cromatografia de troca iônica atua mais como uma etapa concentradora das proteínas do soro do leite. Nesse trabalho, ao se escolher o método de purificação utilizando a adsorção, aplicando a cromatografia preparativa por interações hidrofóbicas, contemplou-se na estratégia de purificação, mais especificamente na etapa de eluição, a obtenção da alfa-lactalbumina ligada ao íon Ca^{2+} . A escolha da estratégia foi baseada em dois pontos relevantes. A ligação proteína- Ca^{+2} promove uma mudança conformacional na estrutura da alfa-lactalbumina tornando-a mais hidrofílica, esse efeito facilita a dessorção seletiva dessa proteína na resina hidrofóbica (em relação às demais proteínas do soro do leite bovino adsorvidas). O segundo ponto relevante é que essa ligação estabiliza a estrutura terciária da mesma torna-a mais resistente às condições desnaturante, segundo Challand e Rosemeyer (1974). Essa estabilidade da estrutura terciária torna-a mais resistente à desnaturação quando submetida a temperaturas elevadas (aproximadamente 100 °C).

A adsorção realizada em leito fixo é ainda o método cromatográfico mais utilizado na recuperação e purificação de proteínas do soro de leite bovino. James (1994) e Carrere (1993), que recuperaram proteínas do soro de leite bovino em resina usando a adsorção por troca iônica, em coluna de leito fixo e coluna de leito fluidizado, respectivamente, chamam a atenção para o fato de que o lactosoro por ser um produto biológico complexo, provoca a colmatagem do leito se tratamentos prévios como a filtração e a centrifugação, não forem realizados. O aumento nas operações unitárias em qualquer processo separativo eleva os custos do processo industrial, o que economicamente não é desejável. Diante desse fato deve-se procurar alternativas econômicas para obter um produto de alto valor agregado com menor custo.

Surge então como alternativa o uso do leite expandido para purificar biomoléculas oriundas de meios complexos. O leite expandido, que tem como característica principal uma maior porosidade de leite quando comparado com o leite fixo, permite a separação de proteínas de líquidos que contêm partículas sólidas em suspensão. Em função dessa característica física evita-se a colmatagem do leite, além de possibilitar que as etapas de clarificação (centrifugação e filtração) ocorram paralelamente com a etapa de captura das proteínas, mantendo praticamente as mesmas características fluidodinâmicas de um leite fixo. Portanto, recuperar e purificar proteínas em leite expandido é um processo de separação alternativo para purificar biomoléculas.

Foi citado, em parágrafos anteriores, como item relevante desse trabalho, a escolha de uma estratégia de purificação seletiva para a proteína de interesse (mantendo suas propriedades físico-químicas e funcionais). Para o alcance desse objetivo é importante observar o efeito e as interações que variáveis tais como temperatura, altura do leite sedimentado e grau de expansão, têm-se sobre a adsorção das proteínas em leite expandido de resina hidrofóbica. A literatura comumente não investiga os efeitos e as interações, conjuntamente, dessas multivariáveis na adsorção, principalmente, nos ensaios realizados em coluna de leite fixo ou expandido, com matérias-primas complexas, entre elas o soro do leite bovino. Comumente são realizados ensaios fixando-se uma variável e verificando o efeito que uma outra pode ocasionar sobre uma variável resposta, como por exemplo, pureza da proteína. A importância da obtenção de dados, com todas as possíveis combinações das principais variáveis físicas e químicas, relevantes na obtenção das curvas de rupturas e na fluidodinâmica permitem determinar parâmetros importantes para a otimização do processo, ferramenta útil para melhor compreensão do sistema de adsorção. Através do conhecimento das melhores condições do processo pode-se obter o aumento de escala da operação unitária utilizada. Através dos estudos desenvolvidos nesse trabalho, encontram-se disponíveis dados físico-químicos e fluidodinâmicos necessários para se realizar um aumento de escala para a obtenção da alfa-lactalbumina a partir do soro de leite bovino em leite expandido de resina hidrofóbica.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

O presente capítulo apresenta uma revisão da literatura sobre os métodos mais usuais para recuperação das proteínas do soro do leite bovino, entre elas a alfa-lactalbumina, as principais características físico-químicas e funcionais dessa proteína. Também são apresentados uma breve fundamentação teórica sobre a operação unitária adsorção e o método cromatográfico que utiliza as interações hidrofóbicas para purificação de proteínas por serem as técnicas utilizadas nesse trabalho. Uma vez que a configuração de leite expandido foi o modo operacional adotado para recuperar e purificar a proteína é apresentada uma revisão de como o desenvolvimento da adsorção é realizado na coluna, principalmente, no que concerne a fluidodinâmica do leite expandido.

2.1. Recuperação de Proteínas do Soro de Leite

Os métodos mais usados para recuperação de proteínas do soro de leite são precipitação, ultrafiltração e cromatografia. A precipitação e a ultrafiltração atuam mais como uma etapa de concentração do que propriamente de purificação. A precipitação, por usar altas concentrações de sais como agente precipitante, desnatura as proteínas e por isto não é utilizado para obtenção de proteínas do soro de leite bovino em grande escala. A precipitação com sal foi o método pioneiro para obtenção da beta-lactoglobulina (Ascharffernburg e Drewry, 1957) e da alfa-lactalbumina (Ascharffernburg, 1968). A ultrafiltração é ainda uma operação unitária bastante utilizada na produção de concentrados protéicos de soro do leite bovino. Atualmente, encontra-se disponível para fins comerciais concentrados protéicos do soro do leite bovino obtidos através de um conjunto de operações como a ultrafiltração, a microfiltração e a troca iônica conseguindo, segundo os fabricante, obter um produto, com a mínima quantidade de lactose e

gordura, contendo proteínas solúveis do leite. No entanto, a cromatografia é um método muito utilizado para concentrar e purificar proteínas do soro de leite.

O método cromatográfico mais utilizado para purificação das proteínas do lactosoro é o que usa resinas trocadoras de íons, explorando a característica anfotérica das proteínas em adquirirem cargas positivas ou negativas dependendo do pH do meio. Este método é também usado para a manufatura de concentrado de proteínas do soro, no qual a concentração de proteínas pode ser maior e igual a 90%, sendo a beta-lactoglobulina e a alfa-lactalbumina as duas proteínas que aparecem em maior quantidade neste concentrado (Morr e Ha, 1993). Barker et al. (1986) obtiveram concentrados de proteínas a partir do soro de leite em resinas trocadoras de íons, Shefarosil QMA. Utilizando esse método foi necessário um tratamento prévio de clarificação para a retirada de resíduos de caseína evitando assim a colmatagem da coluna.

Até o final da década de 80 havia por parte dos pesquisadores muito mais uma busca de tecnologia para obtenção de concentrados protéicos, a partir do soro de leite bovino, do que a purificação específica de uma determinada proteína. O conhecimento mais específico da funcionalidade das proteínas do soro do leite bovino, entre elas a alfa-lactalbumina, por apresentar alto valor nutritivo, induziu os pesquisadores a também obter estratégias de purificação de proteínas advindas do soro do leite bovino com alto grau de pureza e não apenas a produção de concentrados protéicos. Devido a essa tendência, na década de 90 surgiram trabalhos que apresentam um conjunto de etapas e operações, que tendo como objetivo principal, isolar as proteínas do soro do leite, dedicaram-se mais as determinações das condições operacionais (pH, força iônica e tipos de resinas) que pudessem isolar as diversas proteínas, bem como, trabalhos que apresentam estudos de adsorção binária de proteínas do soro de leite bovino, objetivando verificar os mecanismos envolvidos na co-adsorção das proteínas. O conhecimento desses mecanismos permitiram montar uma melhor estratégia de purificação para a proteína de interesse.

Carrere (1993) estudou a adsorção da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina em leite fluidizado e James (1994) a adsorção da lactoferrina e lactoperoxidase, em leite fixo. Esses autores usaram resinas trocadoras de íons, no entanto, com ênfase na obtenção, em tanque agitado, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio da adsorção binária dessas proteínas com o intuito de modelar e simular o comportamento das mesmas na coluna trocadora de íons.

Como exemplo de trabalhos que pesquisam estratégias de purificação de proteínas do soro pode-se citar o de Yoshida (1990), Ortin et al. (1992), Bramaud et al. (1997), Hahn et al. (1998) e Ye et al. (2000). Yoshida (1990) separou as proteínas do soro de leite em cinco frações por filtração em gel usando Sephacryl S-200. A fração 4 possuía a beta-lactoglobulina na forma dimérica, a qual foi separada em duas variantes por cromatografia de troca iônica. A fração 5 foi submetida também a uma cromatografia de troca iônica da qual obteve-se a alfa-lactalbumina, a beta-lactoglobulina, a albumina e uma proteína não identificada. A partir desse concentrado protéico a pureza da alfa-lactalbumina foi aumentada através do método de Aschaffenburg (1968). Devido às inúmeras etapas necessárias para isolar com elevado grau de pureza a alfa-lactalbumina o rendimento no processo foi considerado baixo pelos próprios autores. Ortin et al. (1992) apresentaram como objetivo principal do trabalho o estudo do comportamento da distribuição das proteínas do soro do leite bovino alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina em um sistema aquoso bifásico composto por 7% em massa de Dextrana T-500 e 5% em massa de polietileno glicol 600. O polietileno glicol possuía um ligante hidrofóbico (palmitato) e a afinidade dessas proteínas por esse ligante se dá através de interações hidrofóbicas. Os autores separaram a alfa-lactalbumina da beta-lactoglobulina através da adição do íon Ca^{2+} ao meio. É interessante observar que o íon cálcio já era utilizado como parte da estratégia de purificação da alfa-lactalbumina, mesmo sem ser a cromatografia por adsorção a operação unitária utilizada. Braumad et al. (1997) separa a alfa-lactalbumina das demais proteínas do soro do leite bovino através da precipitação da mesma, em pH 4,2, próximo ao do seu ponto isoelétrico, na presença de citrato (sequestrante do íon cálcio). A adição do citrato favorecia a precipitação da alfa-lactalbumina na temperatura de 35 °C. É interessante observar que esses autores

isolaram a alfa-lactalbumina através da precipitação próximo ao seu ponto isoelétrico a partir de um concentrado protéico obtido inicialmente pelo processo de ultrafiltração do soro de leite bovino. O trabalho de Hahn et al. (1998) apresenta métodos de fracionamento de proteínas do soro de leite bovino em várias resinas trocadoras de íons (S-HyperD-F, S-Sepharose FF, Fractogel EMD SO_3^- 650 (S) e Macro-Prep High S Suport). O principal objetivo do trabalho foi verificar o desempenho das diversas resinas quanto à resistência mecânica e capacidade de ligação em diferentes condições operacionais como pH, tampão de eluição e velocidade de fluxo. Ye et al. (2000) descreve um método rápido para isolar proteínas do soro do queijo bovino sobre resinas trocadoras de íons. A alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina foram adsorvidas conjuntamente sobre a resina quaternário aminoetil-Toyopearl; a separação da alfa-lactalbumina da beta-lactoglobulina ocorreu devido as diferentes condições de eluição usadas no processo de separação. Um fato relevante nesse trabalho é o de mostrar que, além do uso de adsorventes seletivos, as condições impostas na etapa de eluição são importantes na estratégia de purificação de proteína. A resina catiônica sulfopropil-Toyopearl foi utilizada para separar a lactoferrina e a lactoperoxidase.

A partir do ano 2000, os trabalhos relativos à purificação de proteínas do soro de leite bovino seguiram a mesma tendência da década de 90, no entanto, há uma forte retomada na produção de concentrados protéicos através da ultrafiltração. Nessa década, nota-se basicamente dois fatos diferenciais interessantes frente à ainda marcante busca de novas estratégias de purificação e à retomada da obtenção de concentrados protéicos via ultrafiltração, é que a obtenção de diferentes proteínas do soro de leite leva a busca de melhor entender o comportamento individual das mesmas quando ocorrem mudanças conformacionais na sua estrutura. Pode-se citar como exemplos os trabalhos de Boye e Alli (2000), Hong et al. (2002) e Noyelle e Van Dael (2002); os dois primeiros trabalhos estudam a mudança conformacional das proteínas do soro de leite bovino como consequência de tratamentos térmicos e o segundo devido à ligação da proteína alfa-lactalbumina com vários íons metálicos. Essa preocupação em investigar tal comportamento das proteínas é justificada pela

importância funcional e organoléptica que essas proteínas oferecem aos alimentos uma vez que as mesmas são utilizadas como ingredientes na indústria alimentícia (Foegeding et al., 2002). Bertrand-Harb et al. (2003) monitoraram a evolução da concentração e modificação estrutural da alfa-lactalbumina e da beta-lactoglobulina durante a fermentação de iogurte; esses autores creditam a essas proteínas as mesmas características anteriormente citadas sendo, portanto, de suma importância à manutenção das mesmas nesse alimento tido como probiótico e necessário ao desenvolvimento nutricional da humanidade. O diferencial relativo à obtenção de concentrados via ultrafiltração é a preocupação, por parte dos pesquisadores, em não somente obtê-los, mas comprovar cientificamente a importância desse concentrado na dieta alimentar (Jacobucci et al., 2001). Segundo Low et al. (2003), o soro do leite bovino contém proteínas conhecidas como imunomoduladoras (beta-lactoglobulina, alfa-lactalbumina, lactoperoxidase e lactoferrina) e que estão presentes nos concentrados protéicos, em concentrações diferentes.

2.1.1. Alfa-lactalbumina uma Metaloproteína de Alto Valor Nutricional

A alfa-lactalbumina tem como principal função participar da síntese da lactose nas glândulas mamárias. Essa proteína atua como uma subunidade reguladora da galactosiltransferase favorecendo preferencialmente a reação sobre a glucose, e induzindo a síntese de lactose, em oposição a outros polissacarídeos que podem ser sintetizados por essa enzima. Após a síntese da lactose a alfa-lactalbumina é dissociada da galactosiltransferase e, juntamente com outras componentes do leite, é transportada até a superfície das células epiteliais mamárias e conseqüentemente é descarregada no lúmen alveolar.

O interesse em separar a alfa-lactalbumina a partir do soro do leite bovino com elevado grau de pureza surgiu, principalmente, devido à mesma possuir alto valor nutritivo e ter a característica de ligar-se a diversos íons entre eles o cálcio, cobalto, magnésio e zinco. A função da alfa-lactalbumina em sintetizar a lactose é comum tanto nos seres humanos quanto na raça bovina. Segundo Heine et al. (1990), esta enzima nestas espécies possui estruturas similares e essa

característica faz com que essa proteína minimize as propriedades antigênicas encontradas em outras proteínas do soro do leite bovino. A alfa-lactalbumina possui uma alta concentração de aminoácidos essenciais (triptofano, fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, cisteína, lisina e valina) perfazendo 63,2% do total de aminoácidos presentes na proteína. Comparando com a caseína, as proteínas totais presentes no leite e as proteínas do soro do leite bovino, esses aminoácidos essenciais perfazem um total de 51,4%, 52,5% e 58,8%, respectivamente, de todos os aminoácidos presentes nas fontes protéicas citadas. Segundo Heine et al. (1990), o mais importante é que a alfa-lactalbumina tem uma alta concentração de lisina e cisteína e, particularmente, alta concentração de triptofano, porém, a baixa concentração de cisteína e triptofano presente no leite bovino é que faz com que haja uma dificuldade em projetar uma formulação de leite originária dessa fonte, adequadamente balanceada para aplicação em crianças desnutridas ou recém nascidas. A alta concentração da alfa-lactalbumina no leite humano é a maior responsável pela presença dos aminoácidos essenciais no mesmo.

Uma propriedade física interessante da alfa-lactalbumina é a capacidade da mesma ligar-se a íons, entre eles, o íon cálcio. A partir da década de 80, pesquisas realizadas com relação à ligação desta proteína com Ca^{2+} foram intensificadas. Segundo Hirokal et al. (1980), Kronam (1981), Murakami et al. (1981) e Ikeguchi et al. (1986), esta ligação provoca uma mudança conformacional na estrutura da proteína. A alfa-lactalbumina é uma proteína que se torna mais estável ao calor na presença do íon cálcio, devido ao cálcio formar ligações iônicas intermoleculares que tornam a molécula resistente ao desdobramento térmico. Hendrix et al. (2000) realizaram um estudo calorimétrico sobre a influência da concentração do íon cálcio sobre a estabilidade da alfa-lactalbumina bovina e comprovaram que o aumento da concentração do íon cálcio até 10 mM na solução contendo a proteína, faz com que ocorra uma maior estabilidade na estrutura da proteína sendo necessário um aumento na temperatura do processo para que a desnaturação ocorra. Para Rao e Brew (1989), o sítio de ligação desta proteína com o íon cálcio consiste de um grupo que possui uma grande

quantidade de resíduos de aspartil e que está espacialmente separado, na estrutura da proteína, do grupo que proporciona a atividade funcional da mesma.

Segundo Lindahl e Vogel (1984), abaixo do pH 4,0 o Ca^{2+} dissocia-se da proteína promovendo-a a apoproteína. Tem sido demonstrado que a descalcificação da alfa-lactalbumina expõe domínios hidrofóbicos. Essa característica foi observada por esses autores através do estudo da ligação desta proteína em resinas com ligantes hidrofóbicos como a Phenyl-Sepharose. Estes domínios hidrofóbicos tornam-se menos acessíveis à medida que o íon cálcio liga-se a proteína. Haezebrouck et al. (1992) estudaram as interações hidrofóbicas da alfa-lactalbumina do soro de leite de eqüinos através das mesmas técnicas acima mencionadas, chegando às mesmas conclusões, ou seja, a alfa-lactalbumina torna-se hidrofílica à medida que liga-se ao íon cálcio.

A partir de tais comprovações, tem-se desenvolvido técnicas para purificar a alfa-lactalbumina explorando a característica hidrofóbica e hidrofílica da proteína na presença ou ausência do íon cálcio, respectivamente.

2.2. Purificação de Proteínas por Adsorção

Recorre-se cada vez mais à Engenharia Química para que processos desenvolvidos em laboratórios de biotecnologia possam repetir o mesmo sucesso quando do aumento de escala. Para isso torna-se necessário a coleta, conhecimento e o entendimento dos parâmetros fundamentais destes processos e das operações unitárias que as envolvem, como, por exemplo, a separação de proteínas por adsorção.

A adsorção é um fenômeno de superfície em que as moléculas presentes na fase fluida interagem e concentram-se na superfície do sólido. Esta interação física decorre da existência de forças na superfície que atraem e mantêm as moléculas do fluido (adsorbato), da fase líquida, na superfície do sólido (adsorvente).

Os estudos dos fundamentos da adsorção dividem-se em duas categorias: o estudo do equilíbrio, que revela o rendimento ou a capacidade máxima de adsorção de moléculas ou biomoléculas sobre a superfície de um sólido, e o estudo da cinética ou dinâmica do processo de adsorção que informa o tempo que se leva para adsorver uma determinada quantidade de moléculas na matriz sólida. Através destes estudos básicos de adsorção e das coletas dos dados experimentais, com o objetivo de determinar parâmetros inerentes ao processo, podem ser desenvolvidos e testados modelos matemáticos que descrevem a adsorção e dessorção de moléculas de proteínas.

A cromatografia por adsorção é um método amplamente utilizado na purificação de proteínas. O termo cromatografia é definido como um método físico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases. Todas as técnicas cromatográficas possuem uma fase móvel e uma fase estacionária. A fase estacionária é constituída por um suporte sólido escolhido para reter o componente que se deseja separar. A fase móvel é aquela que arrasta os componentes da amostra à medida que percorre a fase estacionária.

Os processos cromatográficos mais utilizados para adsorção de proteínas são a troca iônica, interações hidrofóbicas, afinidade e pseudoafinidade. O adsorvente é constituído de uma matriz composta de material inorgânico, polímeros orgânico sintético ou polissacarídeos. A característica da matriz determina as propriedades cromatográficas da mesma (estabilidade química e resistência mecânica). A matriz sólida possui grupos funcionais ligados e distribuídos na sua superfície conferindo ao adsorvente as características de processo cromatográfico acima citados.

2.2.1. Isotermas de Adsorção e Curvas de Rupturas

A isoterma de equilíbrio descreve a adsorção entre a quantidade de adsorbato e a concentração de soluto que permanece em solução com o adsorvente à temperatura constante. Após o contato entre o sólido e o líquido, que

pode ocorrer em experimentos realizados em tanques agitados ou em colunas, a capacidade de adsorção do adsorvente pode ser determinada.

Os modelos matemáticos de equilíbrio mais comumente utilizados nos processos de adsorção são: Langmuir, Freundlich e Brauner, Emmett e Teller (BET). Em 1940 foi proposta uma classificação para as isotermas conhecidas. Essa classificação consiste de cinco formas distintas de isotermas como apresentado na Figura 2.1.

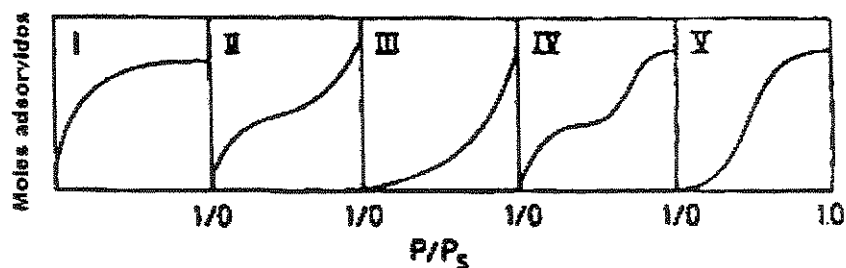


Figura 2.1- Classificação das isotermas. I, II, III, IV, V são os tipos de isotermas segundo Rutheven, 1984. P pressão do gás a ser adsorvido e P_s pressão de saturação do gás.

As isotermas do tipo I representam as características adsorptivas normalmente encontradas em sólidos microporosos onde o limite de saturação corresponde ao total preenchimento dos poros do adsorvente. As isotermas do tipo II e III são normalmente observada em sólidos macroporosos. A isoterma do tipo IV representa a adsorção em multicamadas. A isoterma do tipo V é observada quando ocorrem efeitos de atração sorbato-sorbato (Rutheven, 1984).

A isoterma de adsorção de Langmuir (1916) é amplamente utilizada em sistemas de purificação de proteínas. As hipóteses consideradas para a construção do modelo matemático representativo dessa isoterma de equilíbrio são:

- todos os sítios são energeticamente equivalentes;
- há formação apenas de monocamadas de solutos adsorvidos;

-
- não ocorre interação entre as moléculas adsorvidas com os sítios adjacentes;
 - as moléculas são adsorvidas em um número fixo de sítios definidos.

A equação da isoterma é apresentada a seguir:

$$\frac{q}{q_m} = \frac{C}{K_d + C} \quad (2.1)$$

Onde q é a capacidade da resina em adsorver as proteínas nas condições de equilíbrio, q_m é a capacidade máxima de adsorção e K_d a constante de dissociação.

Em sistemas complexos geralmente adsorve-se sobre a resina mais de um componente. Neste caso, a concentração de um composto no adsorvente depende da concentração de todos os outros presentes na fase líquida. Muitas vezes nos processos adsortivos de multicomponentes ocorre a competitividade entre os mesmos. O modelo de isoterma competitiva de Langmuir em que são adsorvidos dois componentes é apresentada a seguir:

$$q_i = \frac{q_s C_i}{1 + b_1 C_1 + b_2 C_2} \quad (2.2)$$

Onde q é a capacidade que a resina tem em adsorver, individualmente, cada proteína uma vez atingida as condições de equilíbrio, b_1 , b_2 , são as constantes de adsorção para cada componente e, C_1 , C_2 são as concentrações de equilíbrio para os componentes 1 e 2, respectivamente.

Segundo Guiochon (2002), em inúmeros casos de adsorção multicomponente os valores de q_s , encontrado através da aplicação do modelo de isoterma competitiva de Langmuir que melhor ajusta os dados experimentais, são diferentes para os dois componentes. Neste caso, o modelo da isoterma não é termodinamicamente consistente.

A quantidade de produtos obtidos por volume de alimentação injetado, na coluna, fornece a capacidade dinâmica oriunda da adsorção de proteína. A determinação da concentração da solução do efluente, monitorado na saída da coluna de leito fixo ou fluidizado, em função do volume injetado fornece curvas de rupturas (Cruz e Santana, 1996). A capacidade dinâmica é uma função da velocidade linear que atravessa o leito e da cinética de adsorção das proteínas definidas sob as condições de processo (pH, força iônica e temperatura) e das propriedades físicas do fluido (como por exemplo, a viscosidade). Devido aos fenômenos de resistência que ocorrem em processos que envolvem transferência de massa, a capacidade dinâmica, geralmente, decresce com o aumento da velocidade linear e com o aumento da viscosidade. A literatura apresenta trabalhos que analisam o efeito sobre a capacidade dinâmica, principalmente no que diz respeito à velocidade linear, obtendo-se a mesma conclusão, (Hjorth e Kamp 1995; e Finette et al., 1997). São poucos os trabalhos encontrados na literatura que apresentam o efeito da temperatura sobre a capacidade dinâmica em processos adsorptivos. Sendo o efeito da temperatura um fator importante e que deve ser analisado nos fenômenos que envolvem interações hidrofóbicas, é interessante que a capacidade dinâmica de adsorção de proteínas seja também obtida a diversas temperaturas. Um trabalho clássico que avalia tanto os efeitos, em separado, da velocidade linear quanto da temperatura na eficiência da coluna em adsorver proteínas é apresentado por Finette et al. (1997). Os autores concluem que, dependendo da proteína a ser adsorvida, o aumento da temperatura aumenta a capacidade de adsorção da mesma sobre a resina, devido provavelmente, a mudança na orientação/conformação da molécula protéica, ocorrência de agregação da proteína, ou ambos. Se a proteína possui resíduos hidrofóbicos, a elevação da temperatura, expõe esses resíduos aumentando a área superficial hidrofóbica da proteína podendo facilitar a interação entre o adsorvente e a proteína. Esses autores também observaram que o aumento da temperatura pode provocar um aumento na velocidade de adsorção dinâmica (dependendo da proteína a ser adsorvida e do tipo de adsorvente), provavelmente devido a cinética de transferência de massa ocorrer mais rapidamente e, aumentar a difusividade efetiva da proteína diminuindo assim, os efeitos dispersivos durante

a adsorção, na prática, esse efeito é visivelmente percebido no aumento da inclinação da curva de ruptura.

Segundo Chase (1984a) as técnicas de operação diferenciadas pelo modo de operação de injeção de alimentação comumente utilizadas nos processos cromatográficos são:

Método pulso: uma pequena quantidade da amostra de alimentação é injetada na coluna a qual, subsequente, é eluída por técnicas que exploram a diminuição da interação da proteína com o adsorvente. Essa pequena quantidade de amostra injetada na coluna é o principal impasse para a utilização dessa técnica em aplicações macropreparativas.

Método frontal: nesse método a amostra é continuamente alimentada na coluna até que a capacidade máxima do adsorvente seja alcançada nas condições de operação, e que, na saída da coluna, uma vez atingida a capacidade máxima de adsorção, a quantidade de biomolécula que entra é igual à quantidade que sai. A variação da concentração do adsorbato na saída da coluna com o tempo, representa o que anteriormente foi denominada de curva de ruptura (curva de *breakthrough*). Segundo Chase (1984a) é comum interromper a alimentação da solução protéica antes que a capacidade máxima de adsorção seja alcançada.

Em um sistema de adsorção onde o método frontal de injeção da amostra é adotado, o maior desempenho do processo de adsorção é obtido quando a inclinação da curva de ruptura é tão íngreme quanto possível. A Figura 2.2 apresenta o comportamento de duas curvas de rupturas com diferentes inclinações obtidas em uma mesma coluna de leito fixo, porém, em condições operacionais diferentes.

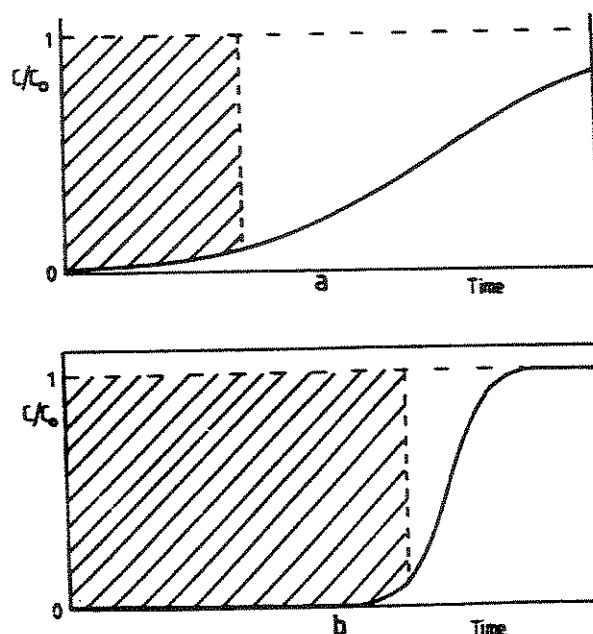


Figura 2.2- Influência da inclinação da curva de ruptura sobre o desempenho da adsorção: (a) menor inclinação, baixa eficiência, (b) maior inclinação, alta eficiência. Onde C_0 é a concentração inicial da substância a ser adsorvida e C a concentração dessa substância com o tempo.

Segundo Chase (1984b) a eficiência da coluna de adsorção é definida como:

$$\text{Eficiência} = \frac{\text{quantidade de adsorbato retido no leito} \times 100}{\text{quantidade de adsorbato aplicado ao leito}} \quad (2.3)$$

e atribuindo o valor de ruptura igual a 10% da relação $\left(\frac{C}{C_0}\right)$ verifica-se que a eficiência é maior quando opera-se o leito a baixa velocidade de fluxo, altas concentrações de adsorbato, maior quantidade de adsorvente e menor densidade de ligante.

2.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica

Nos últimos anos pesquisadores têm estudado e explorado as características hidrofóbicas das biomoléculas e o potencial da cromatografia de

interação hidrofóbica para separá-las e purificá-las, principalmente de meios complexos (Lindahl e Vogel, 1984; Noppe et al., 2000; Queiroz et al., 2001). Portanto, as teorias que têm sido propostas para explicar os mecanismos que estão envolvidos na cromatografia de interação hidrofóbica são essencialmente baseadas nas teorias derivadas para as interações entre um soluto hidrofóbico e a água.

A interação entre dois ou mais componentes hidrofóbicos em solução aquosa ocorre espontaneamente e é principalmente determinada pela mudança positiva da entropia do sistema aquoso ($\Delta S > 0$) que resulta em um valor negativo para a energia livre ($\Delta G < 0$), segundo a Equação 2.4, expressando que o fenômeno é termodinamicamente favorável.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.4)$$

O aumento da temperatura muda a variação da entalpia e da entropia envolvidos nas interações hidrofóbicas. No entanto, um tratamento teórico da influência da temperatura nas interações hidrofóbicas, é bastante complexo, mas pode-se concluir que as forças de interações hidrofóbicas devem aumentar com o aumento da temperatura (Janson e Rydén, 1998).

A hidrofobicidade das proteínas está baseada na hidrofobicidade dos aminoácidos. Os aminoácidos hidrofóbicos têm a tendência de se concentrarem na superfície interna das proteínas globulares e os hidrofílicos na superfície externa. A hidrofobicidade das proteínas é baseada na soma da hidrofobicidade dos aminoácidos.

Existem vários métodos usados para estimar a hidrofobicidade dos aminoácidos. Duas delas são explicadas a seguir. A primeira é baseada nas medidas diretas da solubilidade individual dos aminoácidos em soluções aquosas e solventes orgânicos. A segunda é baseada na inspeção empírica do conhecimento da estrutura da proteína, sendo a escala amostral da

hidrofobicidade construída baseada, por exemplo, na fração de aminoácidos que estão no interior da proteína, nos diferentes aminoácidos que a proteína apresenta na sua estrutura, ou na acessibilidade do solvente nas vizinhanças dos diferentes tipos dos resíduos de aminoácidos (Janson e Rydén, 1998).

A Tabela 2.1 apresenta a comparação das duas escalas de hidrofobicidade, a primeira baseada na solubilidade do aminoácido e a segunda sobre a fração de aminoácidos situados no interior da proteína (valor médio obtido de 20 aminoácidos de estrutura conhecida).

A alfa lactalbumina é uma proteína que apresenta na sua estrutura uma grande quantidade de triptofano, um dos aminoácidos que independente da abordagem I ou II apresenta acentuado valor de hidrofobicidade. A cisteína, que também se apresenta em grande quantidade na alfa-lactalbumina, apesar de estar posicionada na escala I abaixo de outros aminoácidos, possui um valor considerável de hidrofobicidade sendo maior do que o apresentado pela abordagem II, e estando nesse segundo caso, melhor posicionada.

Tabela 2.1- Escala da hidrofobicidade de aminoácidos.

Escala I (kcal/mol)		Escala II (kcal/mol)	
Trp	3,77	Phe	0,87
Ile	3,15	Trp	0,86
Phe	2,87	Cys	0,83
Pro	2,77	Ile	0,79
Tyr	2,67	Leu	0,77
Leu	2,17	Met	0,76
Val	1,87	Val	0,72
Met	1,67	His	0,70
Lys	1,64	Tyr	0,64
Cys	1,52	Ala	0,52
Ala	0,87	Ser	0,49
His	0,87	Arg	0,49
Arg	0,85	Asn	0,42
Glu	0,67	Gly	0,41
Asp	0,66	Thr	0,38
Gly	0,10	Glu	0,38
Asn	0,09	Asp	0,37
Ser	0,07	Pro	0,35
Thr	0,07	Gln	0,35
Gln	0,00	Lys	0,31

* Fonte: Janson e Rydér (1998).

Dois fatores importantes que afetam a interação entre a proteína e o adsorvente num processo cromatográfico por interação hidrofóbica são as características da fase estacionária e da fase móvel. Com relação à fase estacionária as mesmas diferem entre si principalmente pela natureza dos ligantes imobilizados na matriz sólida. Os ligantes mais usados na cromatografia de interação hidrofóbica são os alcanos de cadeia linear com ou sem o grupo amino terminal. Segundo Queiroz et al. (2001) o fenil e outros compostos aromáticos são também usados como ligante, apresentando bons resultados devido à mistura de interações hidrofóbicas e aromáticas π - π . A fase móvel deve ter características tais como tipo e concentração de sal, pH e temperatura que favoreçam a interação da proteína, presente na fase líquida, com o adsorvente. No caso da adsorção da alfa-lactalbumina, advinda do leite bovino, em resinas hidrofóbicas é imprescindível a presença de um agente quelante na fase móvel (tampão de adsorção) uma vez que na presença do íon Ca^{2+} (íon abundante no soro e no leite bovino) essa proteína apresenta-se na forma hidrofílica (Noppe et al., 2000).

2.4. Leito Expandido

Em meados do século XX, os processos que utilizavam a fluidização sólido-líquido, vinham sendo empregados em muitas áreas de química industrial como, por exemplo, no tratamento de águas residuárias, através do processo de adsorção por troca iônica. Segundo Gopal et al. (1993), a partir da década de sessenta, essa técnica começou a ser utilizada sem muito sucesso em processos biotecnológicos, devido às limitações de propriedades físicas, como a pequena diferença de densidade entre a partícula sólida empregada como adsorvente e o líquido, e a complexidade inerente aos fluidos usados em processos biotecnológicos.

Apesar dos problemas acima citados, quanto à utilização do leito fluidizado para a purificação de biomoléculas entre elas proteínas, o mesmo continuou sendo utilizado devido ao interesse por parte da indústria de biotecnologia em diminuir o número de operações unitárias usadas no processamento de purificação, principalmente a centrifugação e a filtração, uma

vez que as proteínas geralmente são sintetizadas em meio líquido que contém partículas sólidas em suspensão (fragmentos de células), ou recuperadas de meios complexos como é o caso do soro do leite, por ser esse um fluido que provoca a colmatagem de leitos fixos, segundo Bascoul et al. (1993), Carrere (1993), James (1994).

Como consequência da redução do número de etapas na Recuperação e Purificação de Biomoléculas, os custos na produção e obtenção da proteína de interesse, com elevado grau de pureza, são diminuídos.

O emprego da fluidização do leito com os adsorventes convencionalmente utilizados na adsorção em leito fixo provocam elevada mistura entre o líquido e o adsorvente gerando uma dispersão axial elevada, diferindo do comportamento desejável de escoamento tubular apresentado pelo leito fixo e aproximando-se indesejavelmente ao comportamento de tanque agitado. onde a existência de apenas um estágio de equilíbrio compromete a eficiência do processo de separação por adsorção. Algumas alternativas foram criadas para limitar o grau de mistura existente no leito fluidizado. Buijs e Wesselingh (1980) desenvolveram uma coluna com bandejas, providas de distribuidores de fluxos, que serviam como suporte para o adsorvente sólido, entretanto, a redução do grau de mistura não foi suficiente para a melhoria da eficiência da coluna e do processo se comparada ao leito fixo. Terranova e Burns (1990), Chetty e Burns (1991) desenvolveram uma coluna de leito fluidizado estabilizado magneticamente usando adsorventes de afinidade não magnetizados, misturados com partículas de material magnetizado inerte em relação a adsorção; com esse procedimento obtiveram baixa mistura no leito, porém, devido à complexidade da estrutura do equipamento, viável em escala de laboratório, não houve um favorecimento no que diz respeito ao aumento de escala para uso industrial.

No início dos anos 90 Draeger e Chase desenvolveram uma coluna cromatográfica provida de um distribuidor de fluxo que permitia uma fluidização estável do leito com escoamento tubular mesmo utilizando adsorventes a base de agarose convencionalmente utilizados em adsorção em leito fixo. Essa fluidização

estável só era conseguida quando baixas velocidades de fluxos eram utilizadas, provocando baixa produtividade no processo de purificação de biomoléculas a partir de meios complexos. Estes pesquisadores perceberam a necessidade de ser desenvolvido adsorventes com alta velocidade de sedimentação. Surgiu então a necessidade de desenvolver adsorventes capazes de exibir características físicas e adsorptivas desejáveis para que a técnica de fluidização sólido-líquido pudesse ser usada na separação de biomoléculas apresentando as mesmas características encontradas em leito fixo.

A clara distinção entre o termo fluidizado e expandido foi introduzido por Chase (1994). Segundo o autor se o leito de adsorvente tem uma distribuição apropriada de tamanho e densidade, ocorre uma graduação no leito de adsorvente dentro da coluna, com partículas maiores e mais densas localizando-se junto à base da coluna e partículas menores e menos densas próximas ao topo do leito. Esse gradiente de tamanho e densidade de partículas gera uma estabilidade significativa da expansão do leito, contribuindo grandemente para a redução da mistura de adsorventes, o que marcadamente não é uma característica do leito fluidizado.

No ano de 1993 a Pharmacia Biotech introduziu no mercado novos tipos de adsorventes e colunas denominados de STREAMLINE designados especialmente para a tecnologia de leito expandido. Altas velocidades de fluxos podem ser usadas, durante a aplicação da amostra, devido às partículas de adsorventes possuírem alta velocidade de sedimentação conseguida através da inclusão de um núcleo de cristal de quartzo na matriz de agarose. Têm sido desenvolvidos novos tipos de adsorventes, mantendo-se as característica de alta densidade, oriundos de vários tipos de materiais (Voute et al., 1999, Theodossiou et al. , 2002).

2.4.1 Determinação do Comportamento Fluidodinâmico do Leito Expandido

A adsorção em leito expandido ocorre de forma a purificar a biomolécula desejável, oriunda de um meio que contém partículas em suspensão, combinando

a clarificação, a captura e a concentração em apenas um estágio de operação. A literatura descreve a utilização e aplicação do leito expandido na purificação de enzimas oriundas de culturas de células de leveduras (Chang e Chase, 1995), de anticorpos monoclonais provenientes de meios de cultura de células animais (Sumi et al., 1999) e de proteínas contidas em meios complexos (Noppe et al., 1999, Conrado et al., 2000).

Para obter o comportamento fluidodinâmico do leito expandido deve-se estudar o regime de escoamento do fluido, o grau de mistura do fluido na coluna e a possibilidade de existência de camada estagnada entre o fluido e o adsorvente. Deve-se ressaltar que a adsorção em leito expandido está baseada no controle da fluidização estável, na qual combinam-se as propriedades fluidodinâmicas do leito fluidizado com as propriedades cromatográficas do leito fixo.

Uma das formas de conhecer o comportamento de um leito fluidizado, em função das propriedades físicas das partículas e do fluido, é através da correlação de Richardson e Zaki (1954). Para partículas esféricas rígidas Richardson e Zaki (1954) propuseram que a relação entre a velocidade superficial do líquido (v) e a velocidade de equilíbrio (v_{ts}) fosse dada pela Equação 2.5:

$$\frac{v}{v_t} = \varepsilon^n \quad (2.5)$$

onde ε é a porosidade do leito e n é o coeficiente de Richardson e Zaki.

Para a determinação da porosidade do leito expandido, através da Equação 2.6, apresentada a seguir, é necessário conhecer o grau de expansão do leito. O grau de expansão fornece a relação entre a altura final do leito após a expansão (H) e a altura do leito sedimentado (H_0).

$$\varepsilon = 1 - (1 - \varepsilon_0) \frac{H_0}{H} \quad (2.6)$$

sendo ε_0 a porosidade do leito fixo.

Através da linearização da Equação 2.4 pode-se determinar a velocidade de equilíbrio de uma partícula e o coeficiente de Richardson e Zaki experimentais se a porosidade do leito for conhecida. A Equação 2.7 apresenta a equação linearizada de Richardson e Zaki:

$$\ln v = \ln v_t + n \ln \varepsilon \quad (2.7)$$

O valor de n é função do número de Reynolds terminal (Re_{ts}) e da relação entre o diâmetro da partícula (d) e da coluna (D).

$$n_{ts} = 4,65 + 20 (d/D) \quad (Re_{ts} < 0,2) \quad (2.8)$$

$$n_{ts} = 4,40 + 18(d/D)Re_{ts}^{-0,03} \quad (0,2 < Re_{ts} < 1,0) \quad (2.9)$$

$$n_{ts} = 4,40 + 18(d/D)Re_{ts}^{-0,1} \quad (1,0 < Re_{ts} < 200) \quad (2.10)$$

$$n_{ts} = 4,40Re_{ts}^{-0,1} \quad (200 < Re_{ts} < 500) \quad (2.11)$$

$$n_{ts} = 2,40 \quad (Re_{ts} > 500) \quad (2.12)$$

Re_{ts} é dado pela expressão:

$$Re_{ts} = \frac{v_{ts} \rho d}{\mu_l} \quad (2.13)$$

onde d é o diâmetro da partícula, ρ a densidade do líquido, μ_l a viscosidade do líquido e v_{ts} a velocidade terminal ou de Stokes apresentada na Equação 2.14:

$$v_t = \frac{d^2 g}{18 \mu_l} (\rho_s - \rho) \quad (2.14)$$

sendo ρ_s é a densidade do sólido

O estudo da fluidodinâmica do leito expandido até o início do ano 2000 restringia-se basicamente à determinação dos parâmetros de Richardson e Zaki e do coeficiente de dispersão axial através da aplicação do modelo clássico da dispersão, denominado aqui neste trabalho de MD, quando a fluidização ocorria na presença da solução tampão. A necessidade de avaliar se ocorre o comprometimento da fluidização do leito expandido quando o meio complexo era injetado de forma contínua na coluna foi se tornando cada vez mais necessário. A fluidização estável do leito pode ser comprometida dependendo da complexidade do meio; esse comprometimento está relacionado com a quantidade de partículas sólidas presentes, entre elas, células, e com o grau de interação dessas partículas sólidas da fase líquida com o adsorvente, segundo Fernández-Lahore (1999), bem como, com a viscosidade do líquido, segundo Barnfield-Frej (2000).

A principal diferença entre o leito fixo e o leito fluidizado estável refere-se à mobilidade das partículas sólidas dentro do leito. Essa mobilidade pode gerar um aumento no grau de mistura dentro da coluna provocando um afastamento da idealidade do escoamento tubular.

A falta de estabilidade do leito leva ao desvio da idealidade do fluxo, principalmente devido à formação de canais de fluxos no leito, da formação de agregados e de “pontos estagnados” de fluido dentro da coluna. Para obter o comportamento fluidodinâmico do leito expandido e verificar sua estabilidade é necessário obter experimentalmente a Distribuição do Tempo de Residência (DTR). Através da obtenção das curvas de distribuição pode-se aplicar, modelos matemáticos que possuem parâmetros físicos que quantificam esse grau de comprometimento. O modelo que tem sido usado é denominado de PDE (*axially dispersed plug-flow exchanging mass with stagnant zones*) e fornece três parâmetros: o número de Peclet (quantifica o grau de mistura dentro do leito expandido), o parâmetro N (fornece o grau de interação entre os componentes da fase fluida e o adsorvente) e o parâmetro ϕ (indica o grau de comprometimento da fluidodinâmica do leito).

Para a obtenção da DTR são utilizados fluidos traçadores que não interferem no processo e que possam ser detectados em meios complexos onde a turbidez estiver presente. A literatura apresenta inúmeros fluidos traçadores e métodos de detecção para a obtenção da DTR, no entanto, para os processos de adsorção em leito expandido os traçadores mais utilizados são íons de brometo ou lítio, detectados por eletrodos de íons seletivos (Fernández-Lahore et al., 2000) ou o aminoácido triptofano detectado pela técnica de fluorescência, Fernández-Lahore et al. (1999).

2.4.1. 1. Modelo Clássico da Dispersão (MD)

O modelo mais usado para determinar o comportamento fluidodinâmico do leito é o modelo da dispersão (MD) que caracteriza o escoamento do fluido na coluna levando em consideração apenas o transporte por convecção e dispersão axial resultando na Equação 2.15:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + v \frac{\partial C}{\partial z} \quad (2.15)$$

onde C é a concentração do elemento de fluido que sai da coluna, z é o comprimento da coluna, t o tempo e D_{ax} a dispersão axial. Uma solução analítica, apresentada na Equação 2.16, a qual descreve a DTR normalizada (E_θ) em função tempo adimensional $\theta = (t/\bar{t})$ e do número adimensional Pe . Pe é definido segundo a Equação 2.17.

$$E_\theta = \frac{Pe}{\sqrt{4\pi\theta}} \exp\left(-\frac{Pe(1-\theta)^2}{4\theta}\right) \quad (2.16)$$

$$Pe = \frac{vL}{D_{ax}} \quad (2.17)$$

onde v é a velocidade superficial e L o comprimento da coluna.

A distribuição de uma curva como a DTR deve ser quantificada pelos momentos da distribuição, os quais são calculados de acordo com a Equação 2.18:

$$m_k = \int_0^{\infty} t^k C(t) dt \quad (2.18)$$

sendo k a ordem do momento, $C(t)$ a concentração do fluido traçador na saída da coluna e t o tempo necessário para um elemento de fluido percorrer toda a coluna. O valor de m_0 representa a área abaixo da curva concentração-tempo e é usado para normalizar os momentos. O primeiro momento normalizado (μ_1) representa o tempo de residência médio τ e o segundo momento normalizado (μ_2) é utilizado para cálculo da variância da distribuição σ^2 . As equações dos momentos utilizadas são apresentadas a seguir:

$$\mu_1 = \frac{\int_0^{\infty} t C(t) dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad (2.19)$$

$$\sigma^2 = \mu_2 - \mu_1^2 \quad (2.20)$$

A média e a variância da DTR são usadas para calcular o número adimensional Pe .

2.4.1.2. Modelo PDE

Villermoux e Swaaij (1969) propuseram uma equação matemática mais rigorosa para avaliar a Distribuição do Tempo de Residência de um fluido, que escoar em uma coluna de forma tubular com um certo grau de mistura e com troca de matéria entre uma camada estagnada e uma camada dinâmica. Esse modelo de escoamento foi denominado pelos autores como modelo PDE. O modelo se

caracteriza pela determinação de três parâmetros: o número de Pe, o parâmetro N que determina o grau de interação entre os constituintes do meio complexo e o adsorvente e a fração do fluido em escoamento dinâmico, determinado pelo parâmetro ϕ . A Figura 2.3 apresenta o esquema representativo do modelo PDE.

Um valor de ϕ igual a 1,0 representa que a expansão do leito é ideal, sem formação de agregados ou canais preferenciais dentro da coluna. Valores acima de 40, para o número de Pe, representam uma baixa dispersão axial dentro da coluna e, valor de N igual a zero significa que não ocorre interação entre os constituintes da fase fluida com o adsorvente a ponto de gerar uma camada estagnada.

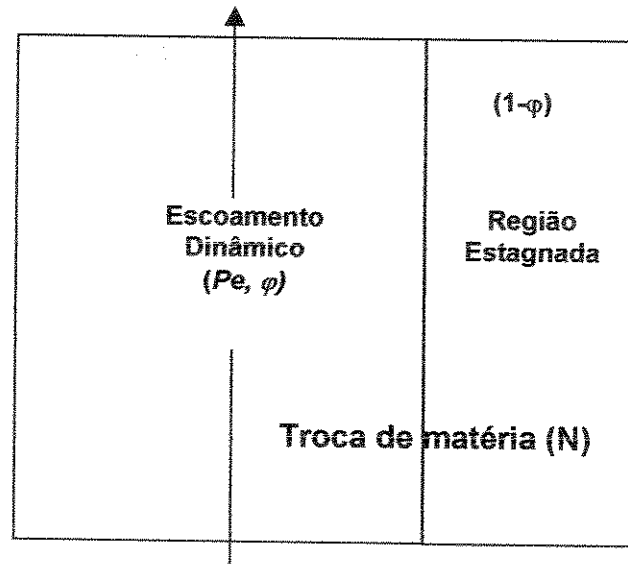


Figura 2.3- Esquema representativo do modelo PDE

$$C(s) = L[(E_o)] = \frac{Pe^{1/2} \exp\left(\frac{Pe}{2}\right) \cdot \exp\left(-(Pe\phi)^{1/2} A^{1/2}\right)}{\frac{Pe^{1/2}}{2} + \phi^{1/2} A} \quad (2.21)$$

$$\text{onde } A = \left(s + \frac{N}{\phi}\right) + \frac{Pe}{4\phi} - \frac{\frac{N^2}{\phi(1-\phi)}}{s + N(1-\phi)}.$$

A Equação 2.21 apresenta a expressão da DTR no domínio de Laplace no qual os parâmetros do modelo podem ser obtidos através da comparação entre a curva de distribuição experimental e a teórica. A expressão da transformada de Laplace permite o cálculo dos momentos da distribuição pela Equação 2.22 apresentada a seguir:

$$\mu_k = (-1)^k \lim_{s \rightarrow 0} \left(\frac{\partial^k \bar{C}}{\partial s^k} \right) \quad (2.22)$$

onde k representa a ordem do momento, C a concentração do fluido traçador na saída da coluna e s o tempo no domínio de Laplace.

O momento de ordem 1 fornece o número de Pe , o momento de ordem 2 o valor da variância da curva de distribuição e através dele obtêm-se a relação entre o Pe e N ; o momento de ordem 3 quantifica a assimetria da curva de distribuição e relaciona as três variáveis. As Equações 2.23 a 2.25 apresentam as relações entre os parâmetros físicos, obtidos através da aplicação do modelo PDE e os momentos determinados através da curva de distribuição:

$$\mu_1 = 1 + \frac{1}{Pe} \quad (2.23)$$

$$\sigma^2 = \frac{2}{Pe} + \frac{3}{Pe^2} + \frac{2B}{N} \left(\frac{1}{Pe} + 1 \right) \quad (2.24)$$

$$\mu_3 = \mu_1(3\mu_2 - 2\mu_1^2) + \frac{18B}{NPe^2} + \frac{20}{Pe^3} + \frac{6B(1-\phi)}{N^2} \left(\frac{1}{Pe} + 1 \right) + \frac{12}{Pe^2} + \frac{12}{NPe} B \quad (2.25)$$

onde $B = (1 - \phi)^2$.

A relação entre os momentos da curva de distribuição e os parâmetros obtidos através da equação do modelo MD é diferente das Equações 2.23 a 2.25 obtidas para o modelo PDE. O momento normalizado de ordem 1 fornece o tempo de residência médio. O momento centrado em relação ao tempo de residência (μ_2 -

μ_1^2) é a variância da DTR. O momento de ordem 3 não é normalmente utilizado pelo modelo MD.

2.5. Planejamento Experimental

A quantidade de partículas sólidas, a densidade e a viscosidade da solução, como também as condições operacionais, tais como, temperatura, grau de expansão e altura de leito, são parâmetros físicos considerados críticos para adsorção em leito expandido porque podem comprometer a fluidização e estabilidade do escoamento de um fluido em um leito expandido. A otimização de um processo através da observação e análise de multivariáveis é importante para melhor compreender um sistema operacional. Um planejamento experimental fatorial possibilita, através da Metodologia da Superfície de Resposta (RSM), a execução e avaliação dos experimentos com todas as possíveis combinações entre as variáveis independentes, ou seja, entre as variáveis que interferem no processo. Um planejamento fatorial possibilita ainda a avaliação dos efeitos individuais de cada variável, dos efeitos sinérgicos ou antagônicos entre as variáveis independentes sobre as variáveis respostas, ou seja, aquelas que se deseja obter.

Para aplicar a Metodologia da Superfície de Resposta é necessário à seleção de um número fixo de níveis para cada variável independente e então executar os experimentos com todas as combinações possíveis entre as variáveis. Normalmente o primeiro planejamento a ser executado é o planejamento fatorial de dois níveis (nível +1 e nível -1) para cada variável. Para as variáveis investigadas são necessários 2^s número de experimentos, onde s é o número de variáveis independentes. É recomendável a execução de 3 ensaios no ponto central (nível 0) para permitir o cálculo do erro experimental.

Com os resultados obtidos do planejamento é possível avaliar os efeitos e as interações sobre a resposta e determinar quais os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo linear, ou de primeira ordem, correlacionando as variáveis independentes com a variável resposta. Se o modelo de primeira

ordem não apresenta uma boa correlação com os dados experimentais, pode-se ampliar o modelo com mais 2s experimentos, segundo configuração estrela, obtendo-se assim um modelo quadrático (Barros et al., 2001).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os procedimentos dos ensaios de fluidização realizados na coluna de leito expandido com solução tampão e soro do leite bovino, bem como os procedimentos para a realização dos ensaios de adsorção para obtenção das curvas de rupturas do soro, objetivando a obtenção da proteína alfa-lactalbumina pura e o entendimento do processo de adsorção, realizada em leito expandido com a resina hidrofóbica tendo como ligante o fenil.

Para alcançar o objetivo acima exposto, os ensaios de fluidização do soro e obtenção das curvas de rupturas foram organizados seguindo a metodologia de planejamento experimental descrita por Barros et al. (2001). As variáveis controladas escolhidas para esse estudo foram as que podem influenciar diretamente a adsorção da proteína, realizada em leito expandido de resina hidrofóbica, como o grau de expansão, a temperatura e a altura do leito sedimentado.

Para a complementação do entendimento do processo de adsorção do soro do leite foram determinadas isotermas de equilíbrio da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina a partir do soro de leite bovino, da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina de alta pureza, separadamente, e da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina a partir de uma solução 1:1 (em massa), a várias temperaturas. A beta-lactoglobulina é a principal proteína que adsorve conjuntamente com a alfa-lactalbumina. Ensaios de eletroforese SDS-PAGE e de focalização isoeletrica foram realizados para acompanhar e confirmar a presença da alfa-lactalbumina nas frações eluídas.

O fluxograma simplificado dos ensaios realizados em tanques agitados, para a determinação da cinética e das isotermas de equilíbrio, é apresentado na Figura 3.1. A Figura 3.2 apresenta o fluxograma dos ensaios realizados na coluna, onde obteve-se as curvas de rupturas e os experimentos necessários ao acompanhamento do comportamento fluidodinâmico do leite.

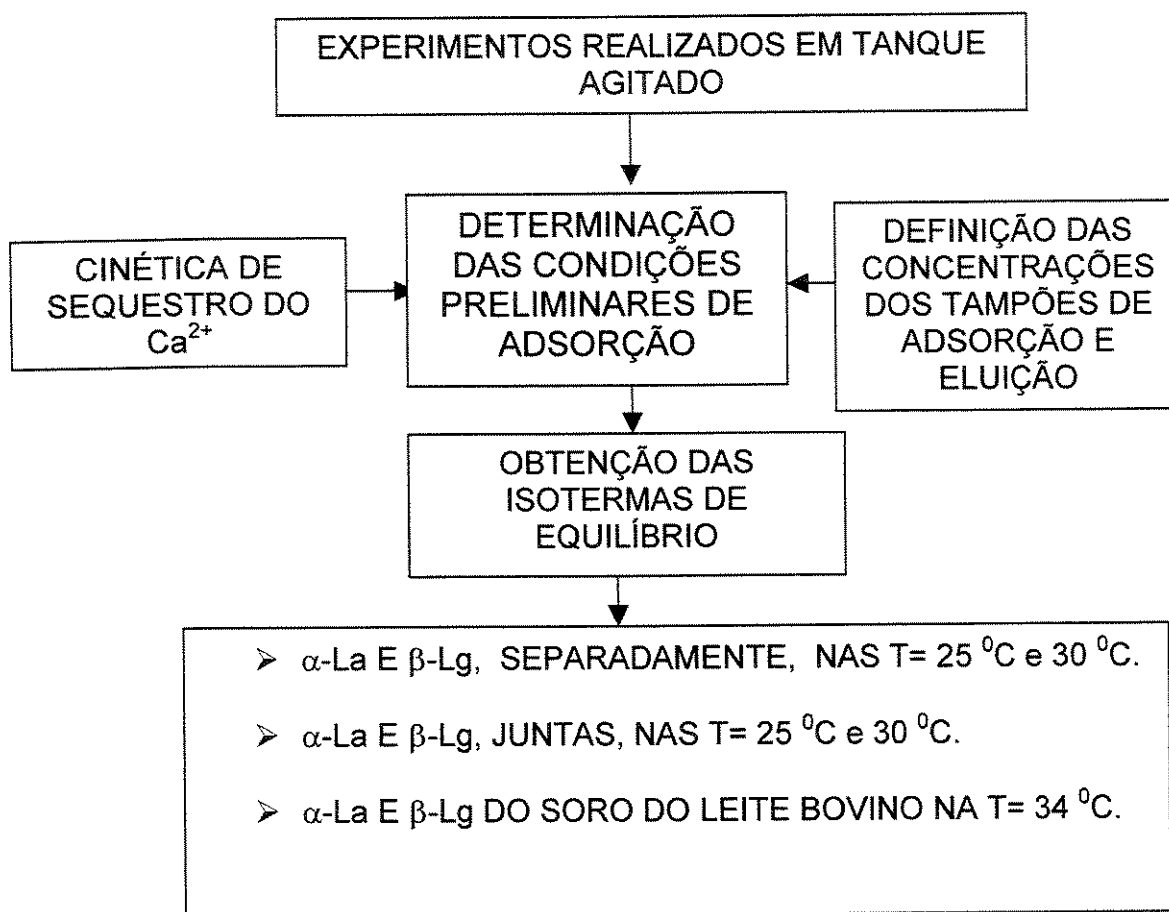


Figura 3.1 - Fluxograma simplificado do procedimento experimental realizado em tanques agitados.

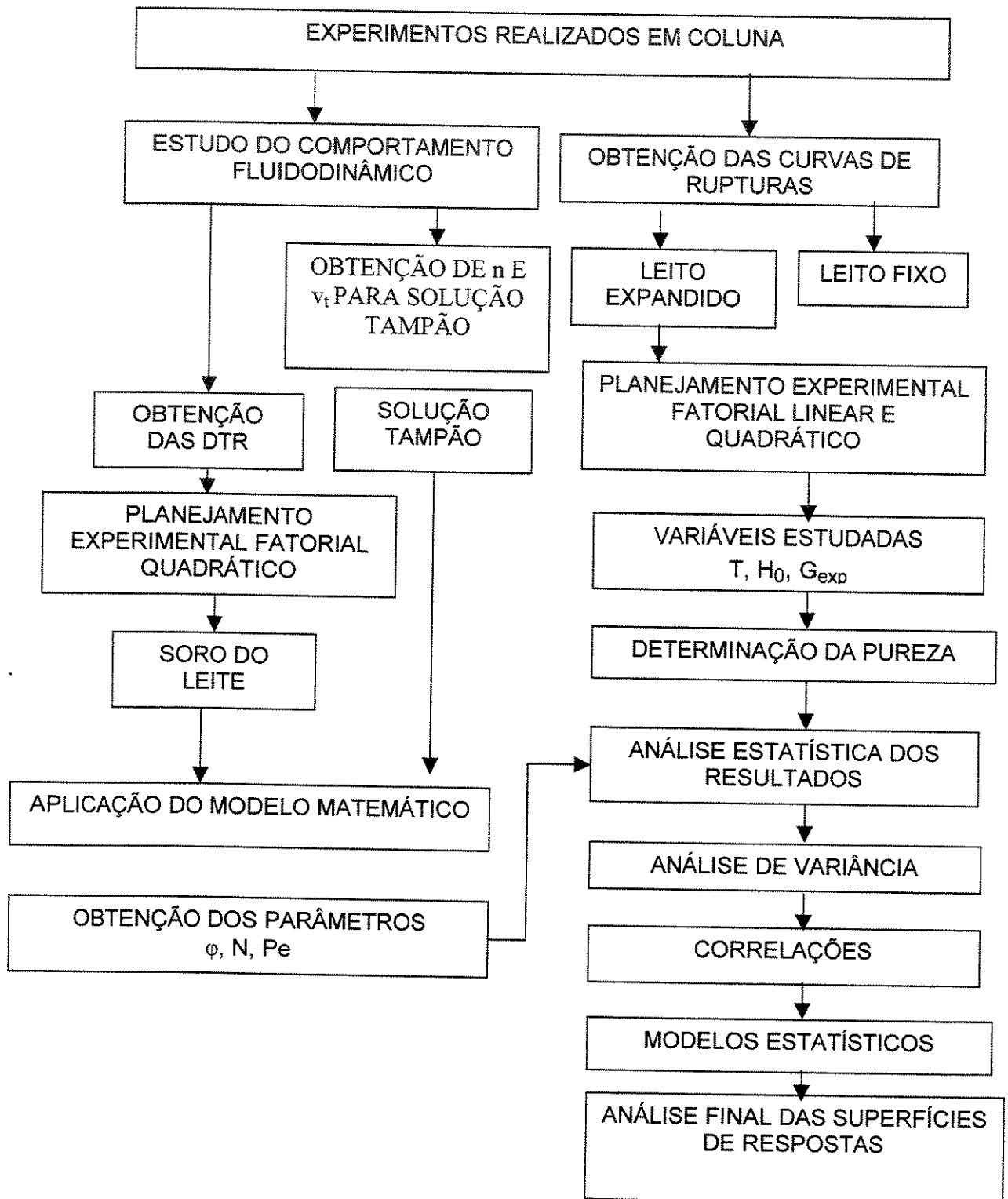


Figura 3.2 - Fluxograma simplificado do procedimento experimental realizado na coluna

3.1. Materiais

Proteínas Padrões

As proteínas padrões utilizadas neste trabalho foram a alfa-lactalbumina e a beta-lactoglobulina com pureza de 85% e 80%, segundo o fabricante (Sigma® Chemical Co., EUA). Nas preparações das soluções eram levados em consideração os valores dessas purezas. A alfa-lactalbumina foi usada para obtenção das isotermas de adsorção e como marcador de pl no ensaio de focalização isoeletrica. A beta-lactoglobulina foi utilizada na obtenção das isotermas de equilíbrio.

Soro do Leite Bovino

O soro do leite bovino utilizado neste trabalho foi produzido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas-SP. Esse Instituto produz, em uma planta piloto, localizado no Laboratório de Tecnologia de Laticínios (TECNOLAT), um concentrado de soro de leite, denominado de CSL, através do processo de ultrafiltração. Como o nosso objetivo era a purificação de uma proteína em leite expandido, a matéria-prima a ser utilizada não deveria ser submetida a nenhuma operação unitária anterior à adsorção, como centrifugação e filtração, por isso, a coleta do soro, aqui denominado de *in natura*, foi realizada logo após a coagulação do leite bovino desnatado. O leite utilizado era desnatado e pasteurizado (a pasteurização era realizada a uma temperatura de 75 °C por um tempo de 15 seg). A coagulação do leite foi feita com a adição do coalho, que contém a enzima quimosina, na proporção 30 mL de coalho para cada 100 L de leite, e adição de uma solução aquosa contendo 50% de CaCl₂ em massa. Para cada 100 L de leite adicionava-se 25 mL da solução salina. Após a adição desses componentes o leite era homogeneizado e mantido em repouso por um período de 40 a 60 min em temperatura de aproximadamente 35 °C. O material coagulado foi cortado, para uma melhor separação do soro, o soro foi coletado, colocado em bandejas de inox e congelado a -20 °C em câmeras de refrigeração, e posteriormente liofilizado.

Adsorvente

O adsorvente hidrofóbico utilizado neste trabalho foi o Streamline Phenyl usado em processos cromatográficos. Esse adsorvente é macroporoso, reticulado com 6% de agarose. Sua densidade é de aproximadamente $1,2 \text{ g.mL}^{-1}$ e possui uma estabilidade de pH na faixa de 2 a 13. O diâmetro médio das partículas é de $180 \text{ }\mu\text{m}$ determinado pelo equipamento da Mastersizer S da Malvern Instruments.

Coluna de Leito Expandido

A coluna usada possuía diâmetro interno de 25 mm e altura de 1,0 m. Era isolada termicamente e aquecida por banho termostático com temperatura controlada.

3.2. Metodologia

3.2.1- Determinação das Propriedades Físico-Químicas

Determinação de Proteínas do Soro de Leite Liofilizado

Foi determinada, no Laboratório de Propriedades Físicas (LPF) do Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Unicamp, a quantidade total de proteínas do soro do leite. O método de determinação foi o Kjeldahal, seguindo a metodologia descrita pela "Association of Official Analytical Chemistry" (A.O.A.C, 1990). Por esse método detectou-se um valor médio de 16% de proteínas totais. As análises foram realizadas em triplicatas. Para os ensaios de adsorção o soro do leite liofilizado foi solubilizado no tampão de adsorção de modo a restabelecer a concentração inicial de proteínas totais de aproximadamente $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Determinação de Lipídeos

A percentagem de lipídeos foi determinada no LPF da FEA pelo método descrito por Bligh e Dyer (1959). Em um tubo pirex de 700 mL era colocado 3,5 g de soro liofilizado finamente moído e homogeneizado e adicionava-se 10 mL de clorofórmio, 10 mL de metanol e 8 mL de água destilada, agitava-se por 30 min,

adicionava-se mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%, agitava-se a amostra vigorosamente por 20 min e deixava-a em repouso para que ocorresse naturalmente a separação entre as fases, succionava-se e, logo em seguida descartava-se a camada metanólica superior. Após esse procedimento filtrava-se a camada inferior em papel de filtro quantitativo (de modo que a solução ficasse límpida) para um tubo de 30 mL, mediava-se 5 mL de filtrado e transferia-se para um Becker de 50 mL previamente tarado. Evaporava-se o solvente em estufa a 100 °C esperava-se que a amostra atingisse a temperatura ambiente em um dessecador, para posterior pesagem. O método considera que todo o material retido no Becker é lipídeo extraído da amostra. Para obter a percentagem de lipídeos totais é necessário levar em consideração o fator 4 de diluição. A percentagem de lipídeo presentes no soro *in natura* usado nesse trabalho foi de 4,6%. As análises foram realizadas em triplicatas.

Determinação de Cinzas

As cinzas foram determinadas seguindo a metodologia da O.A.A.C. Um grama (1,0 g) da amostra do soro *in natura* foi colocada em um cadinho dentro de uma mufla aquecida a 600 °C por aproximadamente 24 h. Após esse tempo e a amostra atingir a temperatura ambiente, a mesma era submetida à pesagem, e a relação entre a massa da amostra antes e após a pesagem é considerada como cinzas.

Determinação de Carboidratos

A percentagem de carboidratos foi obtida por diferença quando somados as percentagens de lipídeos, proteínas e cinzas. O valor de carboidrato apresentado foi de 68%. As análises foram realizadas em triplicatas. Essa análise seguiu as instruções da A.O.A.C.

Eletroforese SDS-PAGE

As análises de eletroforese foram realizadas em gel de poliacrilamida seguindo o protocolo de Laemmli (1970). O gel foi preparado a uma concentração de poliacrilamida a 18%. As amostras e os marcadores padrões foram preparados em solução tampão contendo dodecil sulfato de sódio e β -mercaptoetanol. A

concentração de proteínas injetadas em cada “poço” do gel de concentração era de aproximadamente $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A separação das proteínas foi conduzida numa célula de eletroforese do tipo Mini-Protean II (Bio-Rad, EUA) submetida à tensão de 220 V. A coloração do gel foi realizada com solução de nitrato de prata seguindo o protocolo de Morrissey (1981).

Determinação da Cinética de Seqüestro do Íon Ca^{2+} pelo EDTA

O cálcio é um elemento que está presente no soro do leite e liga-se a alfa-lactalbumina tornando-a hidrofílica. É necessário um tratamento prévio do soro, com o EDTA, para seqüestrar o íon cálcio da proteína tornando-a hidrofóbica, permitindo uma maior eficiência do processo de adsorção por interação hidrofóbica. É fundamental estudar a cinética do seqüestro do EDTA- Ca^{2+} porque através desse estudo pode-se obter o tempo necessário em que o soro do leite deve permanecer em contato com o EDTA e pronto para ser adsorvido na resina. Foi preparada uma amostra do soro de leite na concentração de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de proteínas em solução aquosa contendo 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5. Após a solubilização o soro de leite era filtrado em membrana de $0,65 \mu\text{m}$ e só então era adicionado o agente quelante EDTA na concentração de 35 mM ao soro. Era realizada a homogeneização do soro e, inicialmente, a cada 10 min uma alíquota era coletada e analisada em espectrofotômetro de massa (GBC 905AA) até que a concentração de Ca^{2+} permanecesse constante. A concentração do íon cálcio na solução era obtida através de uma curva de calibração realizada com CaCl_2 .

Determinação das Proteínas Alfa-Lactalbumina e Beta-Lactoglobulina por HPLC

As análises quantitativas das proteínas alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina presentes nas amostras dos ensaios realizados para a obtenção das curvas cinéticas do soro de leite bovino, das isotermas de equilíbrio de co-adsorção, das isotermas dessas proteínas contidas no soro de leite, realizados em tanques agitados e, das amostras da alimentação, da etapa de lavagem e de eluição, dos ensaios obtidos na coluna de leite expandido, foram realizadas em HPLC, da Shimadzu (Japão), utilizando uma coluna de troca aniônica Mono Q da

Pharmacia Biotech. A fase móvel utilizada foi o tampão Tris-HCl, 20 mM, pH 8,0 e a eluição foi efetuada em gradiente de 12 mM.min⁻¹ numa vazão de 1 mL.min⁻¹. As proteínas alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina eram quantificadas através de curvas de calibração obtidas com as proteínas padrão da SIGMA-EUA. Os ensaios realizados para a obtenção das curvas de equilíbrio foram efetuados em duplicatas. Os dados para a construção das isotermas de equilíbrio em separado dessas duas proteínas (ensaios realizados em triplicatas e em tanques agitados) e os obtidos para a construção das curvas de rupturas, das proteínas do soro do leite bovino realizado nas colunas de leito fixo ou expandido, foram determinados através da absorbância por um detector UV à 280 nm.

3.2.2. Experimentos de Cinética e de Equilíbrio Realizados em Tanques Agitados

O esquema para obtenção dos dados de ensaios realizados em tanques agitados e, apresentado no fluxograma da Figura 3.1, é mostrado na Figura 3.3. As seringas, que simulavam tanques agitados, possuíam no seu interior a solução protéica juntamente com o adsorvente sólido. Essas seringas eram providas de um filtro localizado na base interna que impedia a entrada ou a saída da solução protéica sem que uma força adicional fosse imposta aos êmbolos das mesmas. Os tanques eram agitados através de um agitador rotativo.

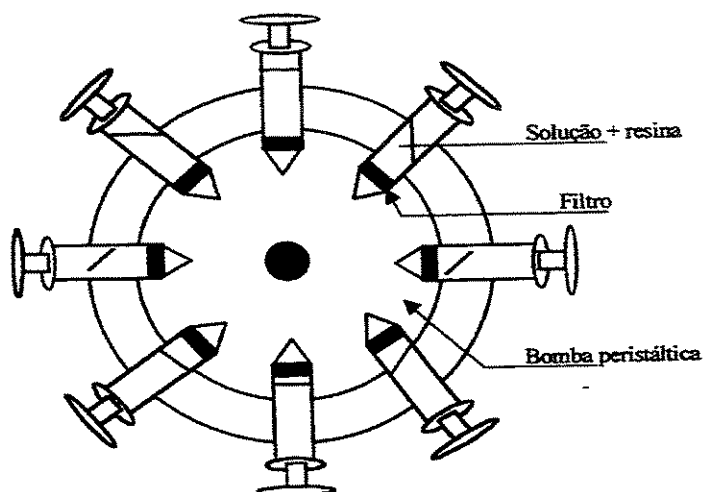


Figura 3.3- Esquema da seringa e do agitador rotativo para obtenção dos dados dos ensaios realizados em tanques agitados.

Determinação das Condições Preliminares de Adsorção da Alfa-Lactalbumina a Partir do Soro de Leite Bovino

Para obter a alfa-lactalbumina a partir do soro de leite bovino através do processo de adsorção por interação hidrofóbica usando a resina hidrofóbica, foram realizados testes preliminares na temperatura 25 °C para encontrar as concentrações do tampão de adsorção Tris-EDTA que adsorvesse em maior quantidade a alfa-lactalbumina e do Tampão de eluição Tris-CaCl₂ que conseguisse retirar a maior quantidade dessa proteína da resina hidrofóbica. A escolha da melhor condição foi baseada na análise, por meio de eletroforese SDS-PAGE, da pureza da proteína da fração eluída. As concentrações de EDTA testadas foram 15, 20 e 35 mM e de CaCl₂ 0,1; 1,0 e 1,5 mM. O pH da solução tampão foi 7,5 e a concentração de Tris foi mantida em 50 mM por ser essa a concentração comumente empregada em processos de adsorção de alfa-lactalbumina em resinas hidrofóbicas (Lindahl e Vogel, 1984; Noppe et al., 1999). Os experimentos de adsorção eram realizados em seringas de 3,0 mL contendo aproximadamente 50 mg de resina. Essa resina era equilibrada no tampão Tris-EDTA, 50 mM de Tris com 1,5 mM de EDTA pH 7,5, por cerca de 2 h e a seringa era mantida sob agitação constante. Estudos cinéticos, realizados posteriormente, demonstraram que um tempo de 20 min era suficiente para que a condição de equilíbrio seja alcançada. Após o equilíbrio, o tampão era retirado da seringa, e 2,0 mL do soro de leite com concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ de proteínas totais eram colocados em contato com a resina por um período de aproximadamente 1 h. Após a lavagem com a solução tampão, era realizada a etapa de eluição. A fração eluída era coletada e analisada por eletroforese SDS-PAGE.

Obtenção das Curvas Cinéticas da Alfa-Lactalbumina e Beta-Lactoglobulina a partir do Soro de Leite Bovino

As curvas cinéticas dessas duas proteínas foram obtidas, na temperatura 25 °C, em seringas contendo a solução do soro do leite bovino e o adsorvente Streamline-Phenyl. As resinas foram equilibradas no tampão 50 mM de Tris com 1,5 mM de EDTA.

O soro de leite liofilizado era dissolvido no tampão de adsorção 50 mM de Tris com 35 mM de EDTA de forma que a concentração de proteínas totais do soro de leite bovino fosse igual a $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, o que equivalia em concentração inicial de beta-lactoglobulina e alfa-lactalbumina valores de 2,10 e $1,51 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente. Em seringas de 3,0 mL, contendo 100 mg de resina, era colocado a solução de proteínas na mesma concentração inicial. As seringas contendo a solução protéica eram agitadas em agitador rotativo e, em intervalos de tempos definidos, eram determinadas, em HPLC, as concentrações finais dessas duas proteínas no sobrenadante.

Obtenção das Isotermas de Adsorção

Para entender melhor o comportamento da co-adsorção da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina, por serem essas as proteínas que adsorvem conjuntamente na resina hidrofóbica, foram obtidas isotermas de adsorção de equilíbrio da alfa-lactalbumina nas temperaturas de 25 e 30°C ; isotermas da beta-lactoglobulina nas temperaturas de 25 e 30°C ; isotermas da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina, solução 1:1, em massa, nas temperaturas de 25 e 30°C ; isotermas da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina a partir do soro de leite bovino na temperatura de 34°C . Os experimentos para a obtenção das isotermas de equilíbrio foram realizados em seringas de 3,0 mL. Em uma balança analítica (Mettler AJ150) eram pesados aproximadamente 50 mg de resina, para as isotermas das proteínas obtidas separadamente, 100 mg para as isotermas de co-adsorção da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina e para a do soro de leite bovino. Após a pesagem, as resinas eram colocadas nas seringas juntamente com a solução tampão de equilíbrio 50 mM de Tris com 1,5 mM de EDTA, pH 7,5, por um período de aproximadamente 2 h. Após a etapa de equilíbrio das resinas o tampão era retirado das seringas e 2,0 mL de solução protéica era colocado em contato com a resina. As soluções-mãe eram preparadas com concentrações conhecidas e a partir delas eram feitas diluições gerando novas soluções com diferentes concentrações. Tanto as concentrações da solução mãe quanto às das soluções sobrenadantes, após a etapa de equilíbrio, foram analisadas por HPLC. Para obter as isotermas de equilíbrio o agitador rotativo, apresentado na Figura

3.3, permanecia dentro de uma estufa incubadora, modelo Nova Técnica, por um período de 20 min nas temperaturas de 25, 30 ou 34 °C.

Com os valores das concentrações antes e após a adsorção, determinava-se a concentração da proteína no adsorvente pela seguinte equação:

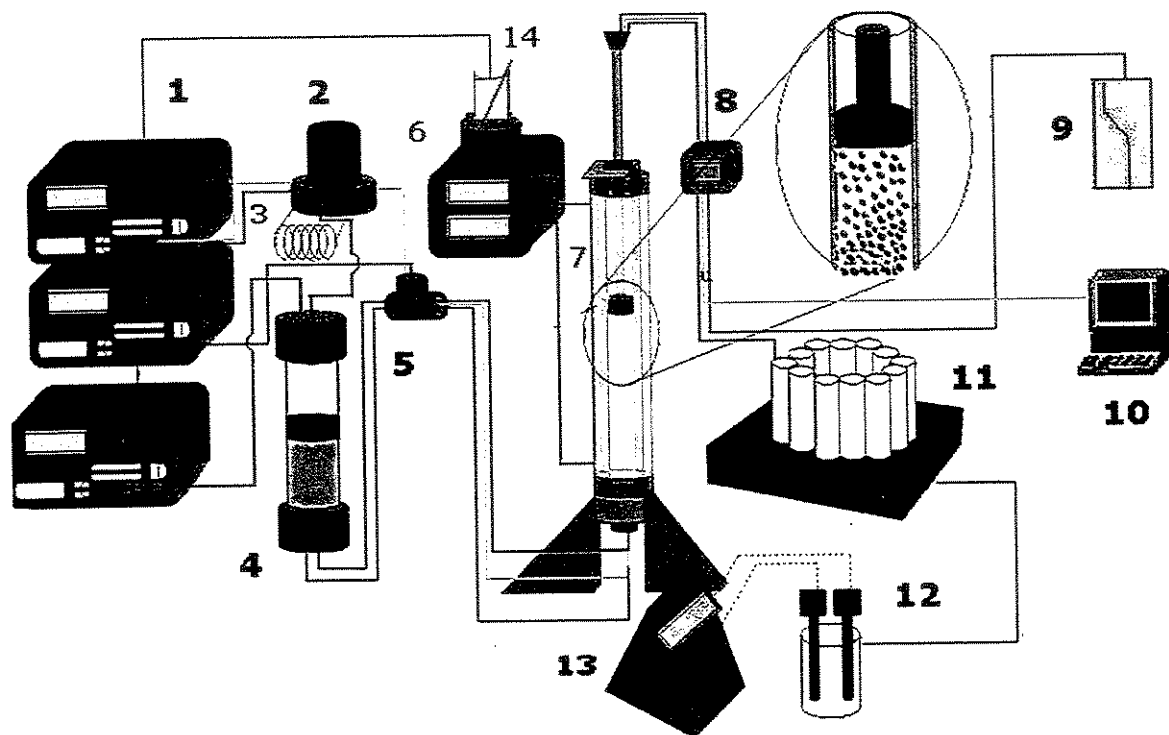
$$q = \frac{(C_i - C_f)V_s}{m_R} \quad (3.1)$$

onde q é a capacidade máxima de adsorção, C_i e C_f são as concentrações iniciais e finais da proteína no sobrenadante e m_R a massa da resina.

3.2.3. Experimentos Realizados em Coluna de Leito Expandido

O esquema experimental no qual foram realizados os ensaios na coluna no modo de operação fixo ou expandido, conforme fluxograma mostrado na Figura 3.2, é apresentado na Figura 3.3.

Para empacotar a coluna com a resina hidrofóbica era necessário que a mesma estivesse preenchida com água deionizada até aproximadamente 70 cm de sua altura. A resina era então colocada na coluna e após atingir a altura de sedimentação desejada, a água era retirada até que a mesma ficasse a uma altura de 10 cm acima da altura máxima desejada pela expansão do leito. O pistão era colocado na coluna e, em todos os experimentos, foi estabelecida uma distância de 0,5 cm entre a altura final do leito expandido e o pistão. Todas as mangueiras eram preenchidas com água antes de serem acopladas à coluna para evitar a entrada de bolhas de ar. Antes da realização dos experimentos na coluna, a resina era expandida com água deionizada até que visualmente não fosse percebida nenhuma formação de aglomerados de resina.



- 1- Bomba P-500 e P-6000
- 2- Vávula de sete vias
- 3- Loop de 500 microlitros (injeção do fluido traçador)
- 4- Super loop de 700 mL
- 5- Misturador
- 6- Banho termostático
- 7- Coluna de leite expandido (isolado termicamente)
- 8- Detector de UV (254-280 nm)
- 9- Registrador
- 10- Computador
- 11- Coletor de frações
- 12- Eletrodos de íons seletivos e de referência (temperatura 22 °C)
- 13- pH metro/mV
- 14- Solução tampão

Figura 3.3- Esquema utilizado para a obtenção da DTR do soro do leite bovino.

Estudo da Fluidodinâmica do Leito

O estudo da fluidodinâmica do leito foi realizado com a solução tampão e com o soro do leite bovino. Com a solução tampão foram realizados experimentos para observar as características da expansão do leito. O primeiro experimento foi realizado para observar as diferentes alturas finais de leito expandido correspondentes as diferentes velocidades lineares de alimentação da solução tampão. A partir desses dados experimentais era aplicado a equação de Richardson e Zaki para determinar os parâmetros n e v_t . O segundo, de uma série de experimentos, foi a obtenção de parâmetros que informaram:

1. o grau de mistura, ou seja, o modo de escoamento do fluido, através do coeficiente de dispersão axial, D_{ax} ,
2. a formação de camadas estagnadas entre o adsorvente e a resina, comprometendo a qualidade da fluidização, medida através do parâmetro ϕ ;
3. a interação entre os componentes da fase líquida (tampão ou soro) e a resina, informação permitida através do parâmetro N .

Todos esses parâmetros foram obtidos através da aplicação do modelo matemático PDE. Para obtê-los é necessário aplicar a técnica de estímulo e resposta e obter a Distribuição do Tempo de Residência (DTR) dos elementos de fluidos que escoam na coluna. A resolução das equações para a obtenção dos parâmetros do modelo PDE foi realizada através de um programa Fortran descrito posteriormente e apresentado no Apêndice I.

Os experimentos realizados com o soro do leite bovino tiveram como objetivo observar o comprometimento da qualidade da fluidização quando se passa da etapa de equilíbrio para a etapa de adsorção. Os parâmetros que fornecem tal comprometimento são os mesmos parâmetros obtidos com os ensaios realizados com a solução tampão.

Técnica do Estímulo e Resposta: Obtenção da Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

A técnica experimental do estímulo e resposta é usada para a obtenção da distribuição do tempo de residência de um fluido que escoa. Esta técnica consiste em perturbar o sistema com um fluido traçador, de concentração inicial conhecida, e observar como ele responde à perturbação, através da medida da concentração com o tempo, na saída do sistema. Estas medidas são convertidas em DTR informando quanto tempo cada fração de fluido passou dentro do sistema. O fluido traçador deve ser uma substância que possa ser detectada na saída do sistema e que, ao escoar no sistema líquido-sólido, não o perturbe e não interaja com ele. Através da DTR, aplicando a teoria dos momentos e as equações dos modelos PDE, avalia-se a performance da coluna de leito expandido quanto a sua fluidodinâmica. A função resposta depende de como foi feita a perturbação na entrada do sistema. Em todos os experimentos realizados nesse trabalho a perturbação foi na forma de pulso. O sinal resposta dessa perturbação é chamado de curva C. A Figuras 3.5 representa o sinal de entrada e saída dessa perturbação. A curva C normalizada é denominada de curva E ou DTR. A Figura 3.6 contém a curva DTR normalizada. Uma curva de distribuição, como a DTR, pode ser quantificada pelos momentos da distribuição.

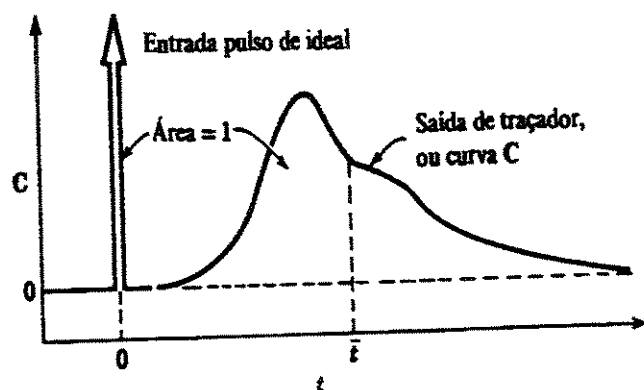


Figura 3.5- Sinal de entrada e saída da perturbação pulso provocada na entrada da coluna.

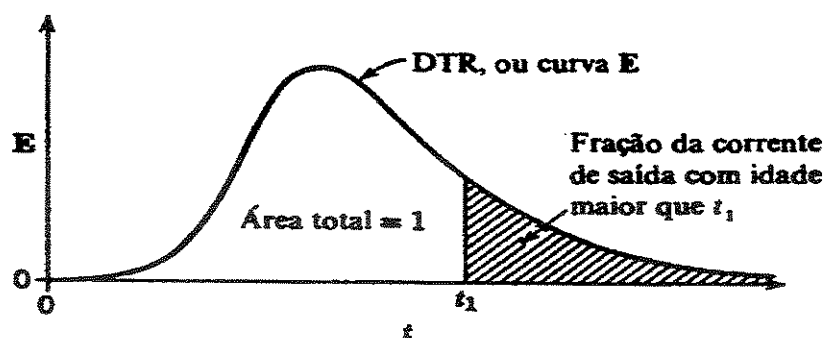


Figura 3.7- Curva de Distribuição de Tempo de Residência (DTR), também chamada de curva E.

Obtenção da DTR da Solução Tampão

Neste trabalho obteve-se a DTR dos elementos do fluido tamponante que escoou na coluna Streamline SP-25 contendo a matriz hidrofóbica, em três alturas de leitos sedimentados (15, 20 e 25 cm) e graus de expansão que variam de 2,00 a 3,20 vezes as alturas iniciais do leito. A obtenção da curva E era realizada após o equilíbrio da resina injetando-se na entrada da coluna 500 μ l de uma solução de acetona a 20%. A absorvância da acetona na saída da coluna foi detectada por um detector UV a 254 nm e o sinal da absorvância em milivolts foi obtida por uma placa de aquisição de dados acoplada a um computador. A curva de distribuição foi analisada utilizando o método dos momentos e, através da aplicação do modelo matemático, foram determinados os parâmetros que informaram o comportamento fluidodinâmico do leito expandido.

Obtenção da DTR do Soro do Leite Bovino

A obtenção da curva de distribuição do soro do leite bovino informa o comportamento e o possível comprometimento da fluidodinâmica do leito expandido quando uma solução mais complexa do que a solução tamponante escoou através da coluna.

No caso do soro do leite bovino, a DTR foi obtida para uma altura de leito sedimentado de 15 cm, graus de expansão de 1,50 a 3,00 vezes a altura do leito antes da expansão e temperaturas que variaram entre 22 e 34 °C.

As combinações entre as variáveis temperatura e grau de expansão, sob as quais foram obtidas e avaliadas as distribuições do tempo de residência, foram definidas através de um planejamento experimental.

O fluido traçador usado nesse experimento foi uma solução a 2% de brometo de potássio; o mesmo foi escolhido em virtude de não interagir nem com a proteína nem com o adsorvente e por poder ser determinado através de um eletrodo de íon seletivo para brometo, evitando a inconveniência de se trabalhar com acetona como fluido traçador (usado no experimentos para obtenção da DTR para o fluido tamponante) pelo fato da acetona não poder ser detectado em célula UV a 254 nm uma vez que a mesma está em solução do soro de leite, solução essa que é turva. O acompanhamento da variação da concentração desse fluido traçador com o tempo foi obtido através de um eletrodo de íon seletivo para brometo (marca Raldekis, Hungria) o qual estava acoplado diretamente a um condutivímetro (Digimed, DM-20); a medida do íon brometo foi feita de forma descontínua e a temperatura de 22 °C.

A curva E só foi obtida após a saturação da resina na coluna. Essa saturação assegura que o estado estacionário foi atingido e que a fluidodinâmica, na presença do soro do leite, está completamente estabelecida dentro da coluna. Dependendo do grau de expansão em que estivesse sendo obtido a DTR, o volume do soro de leite necessário para saturar o leito e mantê-lo fluidizado por um tempo suficiente para coleta dos dados experimentais, após a perturbação do sistema com o fluido traçador, era bastante elevado: em torno de 1200 mL. Dessa forma houve a necessidade de preparar o soro de leite com o dobro da concentração e colocá-lo no *loop* de 700 ml. O *loop* era provido de um êmbolo que se movia impulsionado pela água cuja alimentação era feita por uma bomba P-500 do FPLC. Através desse mecanismo o soro escoava até o misturador do FPLC onde era efetuada a diluição pela solução tampão que estava sendo alimentada pela bomba P-6000 do FPLC. Após a mistura das soluções, o soro do leite com concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ alimentava continuamente a coluna. Uma vez ocorrido a saturação da resina, injetava-se 500 µl da solução de brometo de

potássio à 2% através da válvula de sete vias. Eram coletadas várias frações de 2,0 mL de soro na saída da coluna no coletor de fração FRAC 200 da Pharmacia Biotech e através de um eletrodo seletivo para o íon brometo eram determinadas as concentrações desse íon em cada amostra obtendo-se, assim, a curva de distribuição do soro de leite bovino na coluna de leite expandido. Através das análises dos parâmetros obtidos pelo modelo PDE pôde-se determinar o comportamento fluidodinâmico do soro de leite na coluna SP-25.

Obtenção das Curvas de Rupturas

Através da obtenção das curvas de rupturas para o soro do leite bovino avaliou-se a influência da altura do leite sedimentado, da temperatura e do grau de expansão na adsorção da alfa-lactalbumina no leite expandido de resina hidrofóbica. O sistema para a obtenção das curvas de rupturas é o mesmo apresentado na Figura 3.3. Os tampões utilizados no processo de adsorção do soro de leite são apresentados a seguir:

1. tampão de equilíbrio: 50 mM de Tris-1,5 mM de EDTA
2. tampão de adsorção: 50 mM de Tris-35 mM de EDTA
3. tampão de lavagem: 50 mM de Tris-1,5 mM de EDTA
4. tampão de eluição: 50 mM de Tris-1,5 mM de CaCl_2

O pH das soluções tamponantes, exceto o do tampão de adsorção, foram ajustados em 7,5 com HCl. O tampão de adsorção era preparado sem que houvesse o ajuste do pH. O mesmo dissolvia o soro do leite liofilizado e após a dissolução e seqüestro do íon cálcio pelo EDTA a solução apresentava-se com pH em torno de 6,5 que era ajustado para 7,5 com solução de amônia. O soro era aquecido ou resfriado, de acordo com a temperatura na qual se desejava obter as curvas de rupturas, e só então era colocado no *loop* de 700 mL. Esse *loop* era isolado termicamente de forma a manter a temperatura do soro durante todo o experimento.

Após o equilíbrio da resina, ocorria a etapa de adsorção do soro de leite bovino na coluna até a saturação da resina. Os fluxos dos tampões e do soro do

leite bovino eram os mesmos e os seus valores estavam diretamente relacionados ao valor dos graus de expansão em que se desejavam obter as curvas de rupturas. A absorbância do soro do leite bovino na saída da coluna era obtida por detector UV à 280 nm. O volume do soro do leite bovino coletado após a etapa de lavagem, o injetado na coluna durante a alimentação e o da fração eluída eram anotados para serem levados em consideração nos balanços de massa. As concentrações de alfa-lacatalbumina das frações coletadas em todas as etapas eram determinadas por HPLC. A etapa de eluição era realizada com a coluna operando na forma de leito fixo. O cálculo da eficiência da coluna em adsorver todas as proteínas do soro de leite bovino era realizada através da Equação 2.3, de modo que a quantidade de soro de leite adsorvido na coluna era igual a área representado abaixo da curva a partir de $C/C_0 = 10\%$ (C_0 é igual a concentração inicial de proteínas do soro de leite e C a concentração do soro de leite no tempo) e a quantidade de soro aplicado a coluna era igual a toda a área situada abaixo da curva de ruptura.

A coluna Streamline SP-25 era totalmente isolada termicamente. A temperatura da coluna e dos tampões era mantida através de dois banhos termostáticos. Após a etapa de eluição, o pistão da coluna era movido de forma que a coluna tornasse a operar em modo expandido para que a regeneração da coluna fosse executada com 0,5 M de NaOH com fluxo de aproximadamente 100 cm.h⁻¹. Nessa etapa esperava-se que a coluna atingisse a temperatura ambiente para que a solução de soda cáustica fosse injetada continuamente na coluna.

As combinações das variáveis temperatura e grau de expansão, para a obtenção das curvas de rupturas, foram determinadas através do planejamento experimental que será descrito nos próximos itens.

3.3. Apresentação do Programa Computacional

O programa escrito em linguagem Fortran, apresentado no Apêndice I, foi desenvolvido em parceria com o Prof. Nagel Alves Costa do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba.

Esse programa tem como objetivo a obtenção da DTR teórica obtida através da transformada de Laplace da Equação 2.21. A resolução dessa equação foi realizada através da utilização de subrotinas da Biblioteca IMLS do programa Fortran PowerStation 4.0. O método numérico utilizado foi o de Levenberg-Marquart usando diferenças finitas. Os parâmetros do modelo PDE são obtidos após o ajuste da DTR teórica com a experimental.

3.4. Planejamento Experimental

Neste trabalho, executou-se foi primeiramente o planejamento experimental fatorial completo (modelo de primeira ordem). Através da análise estatística desse planejamento, houve a necessidade de ampliá-lo para um planejamento estrela (modelo quadrático). No planejamento fatorial linear foram avaliadas três variáveis independentes (altura do leito sedimentado, grau de expansão e temperatura) sobre a variável resposta pureza. Foram realizados 2^3 experimentos com 3 repetições no ponto central. Os valores das variáveis foram escolhidos e baseados nos dados da literatura e em dados obtidos neste trabalho. As alturas escolhidas para serem investigadas foram 15; 17,5 e 20 cm. O primeiro valor foi escolhido para o nível -1 porque a literatura retrata que a partir de 10 cm, os efeitos dispersivos na entrada da coluna são desprezíveis, Chase (1994). A altura de 20 cm foi escolhida para o nível +1 porque acreditava-se que nessa altura poderia ter um diferencial na separação das proteínas melhor do que a obtida na altura de leito de 15 cm. O valor do nível 0 deve ser a média entre os valores dos outros níveis. A escolha dos graus de expansão foi baseado nos valores máximo (2,00 vezes a altura do leito sedimentado) e mínimo (1,50 vezes a altura do leito inicial) comumente usado na literatura. Os valores das temperaturas foram escolhidos apenas para verificar se havia uma diferença significativa na adsorção do soro de leite bovino e, conseqüentemente, na pureza da alfa-lactalbuminana, quando a adsorção ocorre na temperatura ambiente, 25 °C, e na temperatura de 30 °C.

Após a análise estatística dos dados desse planejamento, concluiu-se que havia a necessidade de ampliá-lo para um planejamento fatorial estrela. Neste planejamento experimental) foram realizados 2^2 ensaios, quatro experimentos nos pontos axiais e três repetições de ensaios no ponto central. As variáveis independentes estudadas foram temperatura e grau de expansão. A temperatura mínima investigada foi 22 °C, escolhida para dar um diferencial pronunciado da temperatura mínima avaliada no planejamento linear. A temperatura máxima escolhida foi 34 °C, pois essa foi aproximadamente a temperatura em que houve a coagulação da caseína do leite bovino.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente capítulo tem por objetivo apresentar e discutir os resultados dos experimentos realizados com a matéria-prima soro do leite bovino *in natura* com o intuito de observar o comportamento adsorptivo de proteínas presentes no meio, principalmente, as proteínas alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina, sobre o adsorvente hidrofóbico, em testes realizados em tanques agitados e na coluna de leite expandido StreamlineSP-25. São apresentados os testes cinéticos e de equilíbrio das proteínas do soro do leite bovino e das proteínas alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina realizados em tanques agitados. São apresentados os estudos do comportamento fluidodinâmico obtido na coluna SP-25 com o adsorvente hidrofóbico, onde verificou-se, principalmente, o efeito da dispersão axial e o comprometimento da estabilidade do leite na presença do soro do leite bovino através da determinação de parâmetros importantes a serem considerados em um processo de aumento de escala, como por exemplo, o número de Peclet. Note-se em todo o trabalho uma ênfase na determinação de dados experimentais em testes realizados na coluna, em diferentes condições operacionais de temperatura e grau de expansão, tanto na obtenção do comportamento fluidodinâmico do leite quanto na obtenção das curvas de rupturas na presença do soro de leite bovino com o intuito de verificar os efeitos dessas variáveis sobre a pureza e recuperação da alfa-lactalbumina e sobre a eficiência da coluna em adsorver todas as proteínas do soro do leite bovino. Utilizou-se do planejamento estatístico como ferramenta para determinar os efeitos e as interações que as variáveis de processo interferem na RPB realizada em leite expandido. Sendo o soro do leite o bioproduto objeto de estudo desse trabalho, foi determinada a faixa ótima de processamento do mesmo para obter a alfa-lactalbumina com pureza de 100% detectado por HPLC.

4.1. Determinação das Condições Preliminares de Adsorção e Eluição da Alfa-lactalbumina a Partir do Soro de Leite Bovino

Experimentos preliminares foram realizados para avaliar a influência do EDTA no tampão de adsorção Tris-EDTA, a substituição do EDTA pelo cálcio no tampão de eluição Tris- CaCl_2 em pH 7,5 e a cinética e seqüestro do Ca^{2+} pelo EDTA. A escolha da melhor condição de adsorção da alfa-lactalbumina a partir do soro do leite bovino foi determinada pela análise da eletroforese SDS-PAGE tendo como referência a proteína alfa-lactalbumina contida no marcador de massa molecular utilizado.

Os experimentos de adsorção foram realizados em seringas, simulando um tanque agitado, contendo uma massa fixa de 50 mg de resina e 2 mL de solução protéica conforme discutido no item 3.2.2. A Tabela 4.1 apresenta as condições em que foram realizados os testes preliminares de adsorção da alfa-lactalbumina a partir do soro de leite bovino.

Tabela 4.1- Concentração dos tampões de adsorção e eluição usados nos testes experimentais para adsorção da alfa-lactalbumina a partir do soro do leite bovino.

Condições	Adsorção	Eluição
Primeira	50 mM Tris-15 mM EDTA	50 mM Tris-0,1 mM CaCl_2
		50 mM Tris- 1,0 mM CaCl_2
		50 mM Tris- 1,5 mM CaCl_2
Segunda	50 mM Tris- 25 mM EDTA	50 mM Tris-0,1 mM CaCl_2
		50 mM Tris-1,0 mM CaCl_2
		50 mM Tris-1,5 mM CaCl_2
Terceira	50 mM Tris- 35 mM EDTA	50 mM Tris-0,1 mM CaCl_2
		50 mM Tris-1,0 mM CaCl_2
		50 mM Tris-1,5 mM CaCl_2

A Figura 4.1 apresenta a eletroforese de frações eluídas realizada para as três diferentes condições de adsorção apresentadas. Observa-se através da Figura 4.1 que a terceira condição de adsorção foi a que apresentou o melhor grau de pureza da alfa-lactalbumina, ou seja, quando o tampão de eluição utilizado apresenta concentração de CaCl_2 igual a 1,5 mM. A massa molecular dessa proteína é de 14,4 kDa. Ficou definido que as condições em que seriam realizados

os experimentos para obtenção da alfa-lactalbumina em tanque agitado e em coluna seriam:

- Tampão de equilíbrio: 50 mM de Tris com 1,5 mM de EDTA
- Tampão de adsorção: 50 mM de Tris com 35 mM de EDTA
- Tampão de lavagem: 50 mM de Tris com 1,5 mM de EDTA
- Tampão de eluição: 50 mM de Tris com 1,5 mM de CaCl_2

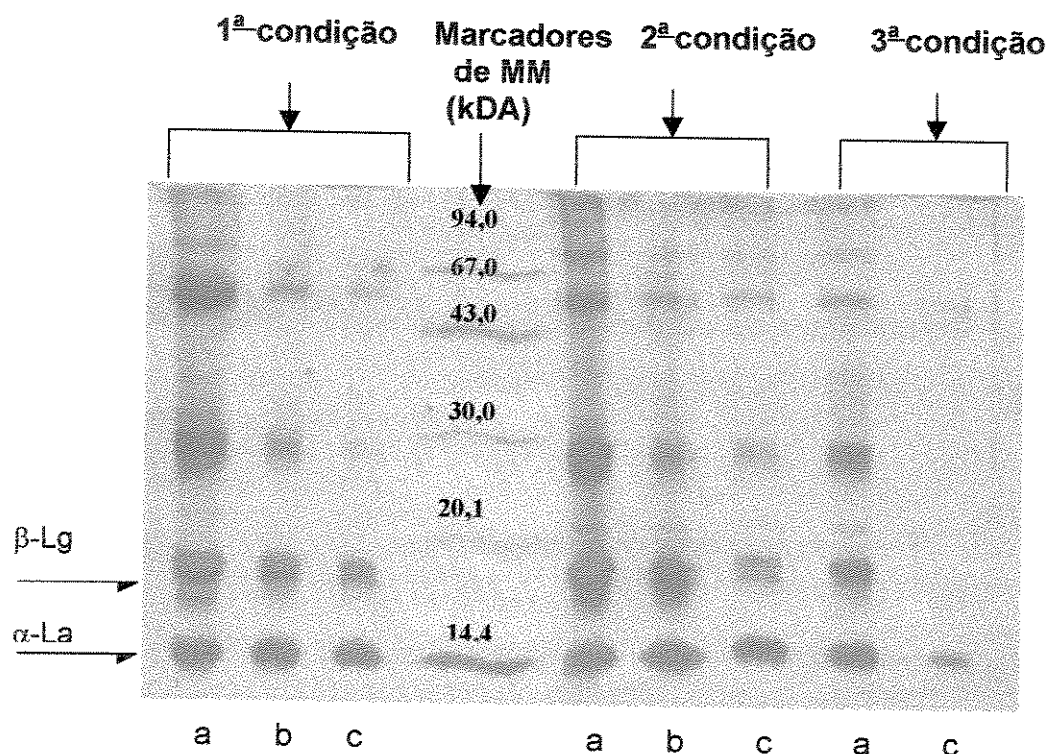


Figura 4.1- Eletroforetograma das frações eluidas do soro de leite bovino após as condições de adsorção. **1ª condição:** 50 mM Tris-15 mM EDTA, **2ª condição:** 50 mM Tris-25 mM EDTA, **3ª condição:** 50 mM Tris-35 mM EDTA. As letras a, b e c indicam amostras eluidas com as concentrações de 0,1; 1,0 e 1,5 mM de CaCl_2 , presentes no tampão de eluição, respectivamente.

Uma vez estabelecida as condições de adsorção e eluição da alfa-lactalbumina foi necessário determinar o tempo mínimo em que o soro do leite bovino deveria ficar em contato com o tampão de adsorção de forma que a alfa-lactalbumina tivesse o Ca^{2+} dissociado e assim se tornasse o mais hidrofóbica possível, garantido a sua adsorção na resina Streamline Phenyl.

A Figura 4.2 mostra o gráfico da cinética de seqüestro do Ca^{2+} da alfa-lactalbumina para o soro do leite bovino pelo agente quelante EDTA. Em um tempo de aproximadamente 200 min (3,33 h) ocorreu o seqüestro dos íons Ca^{2+} .

Desse modo o soro do leite bovino liofilizado, antes do processo de adsorção, era solubilizado no tampão de adsorção 50mM Tris-35 mM EDTA. O soro permanecia em contato com esse tampão por um tempo mínimo de 3,33 h. Após a adsorção a etapa de eluição era realizada com tampão Tris- CaCl_2 nas concentrações de 50 mM e 1,5 mM, respectivamente.

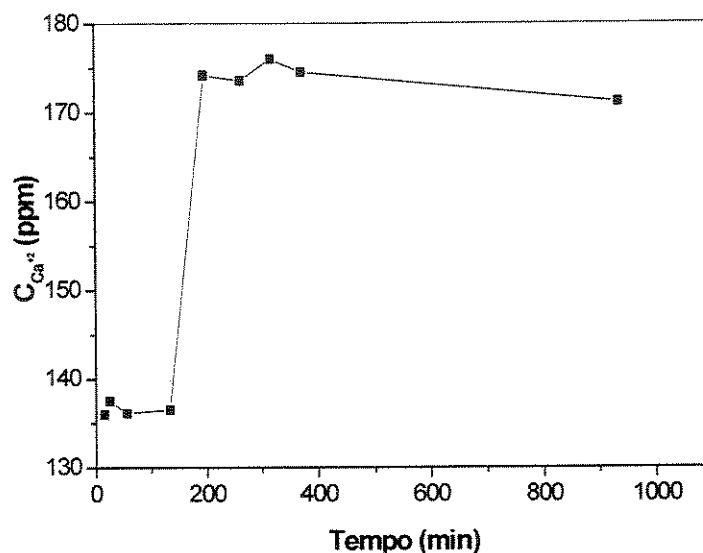


Figura 4.2- Cinética de seqüestro do íon cálcio presente na alfa-lactalbumina presente no soro do leite bovino pelo agente quelante EDTA.

4.2. Isotermas de Adsorção

Foram determinadas isotermas de adsorção da alfa-lactalbumina e da beta-lactoglobulina padrão, separadamente, isotermas de adsorção conjunta da alfa-lactalbumina e da beta-lactoglobulina a partir de uma solução 1:1, em massa, das proteínas padrão nas temperaturas de 25 e 30 °C, e também as isotermas dessas duas proteínas a partir do soro do leite bovino na temperatura de 34 °C.

As isotermas de co-adsorção dessas duas proteínas foram realizadas porque, nos primeiros ensaios de adsorção sobre a resina hidrofóbica em coluna, a beta-lactoglobulina foi a proteína que apresentou maior quantidade adsorvida na resina Streamline Phenyl juntamente com a alfa-lactalbumina.

Veredas (2000) estudou a cinética de adsorção da alfa-lactalbumina padrão sobre a resina hidrofóbica em questão em tanque agitado, nas

concentrações iniciais de 0,564; 1,33 e 1,56 mg.mL⁻¹ e temperatura de 24 °C, e determinou que a partir de 20 min praticamente não ocorre variação de concentração dessa proteína na solução sobrenadante. Assim nesse trabalho, adotou-se um tempo de 20 min para obtenção das isotermas de equilíbrio da alfa-lactalbumina e da beta-lactoglobulina separadamente.

A cinética da alfa-lactalbumina e da beta-lactoglobulina, a partir do soro do leite bovino, foi obtida em tanques agitados na temperatura de 25 °C e nas concentrações iniciais de 1,5 mg.mL⁻¹ para alfa-lactalbumina e 2,3 mg.mL⁻¹ para beta-lactoglobulina (Figura 4.3). Através do comportamento cinético dessas duas proteínas pode-se concluir que em um tempo de aproximadamente 30 min atinge-se a condição de equilíbrio tanto para alfa-lactalbumina quanto para beta-lactalbumina. Neste trabalho foi adotado o tempo de 30 min para obtenção das isotermas de equilíbrio dessas proteínas a partir do soro de leite bovino.

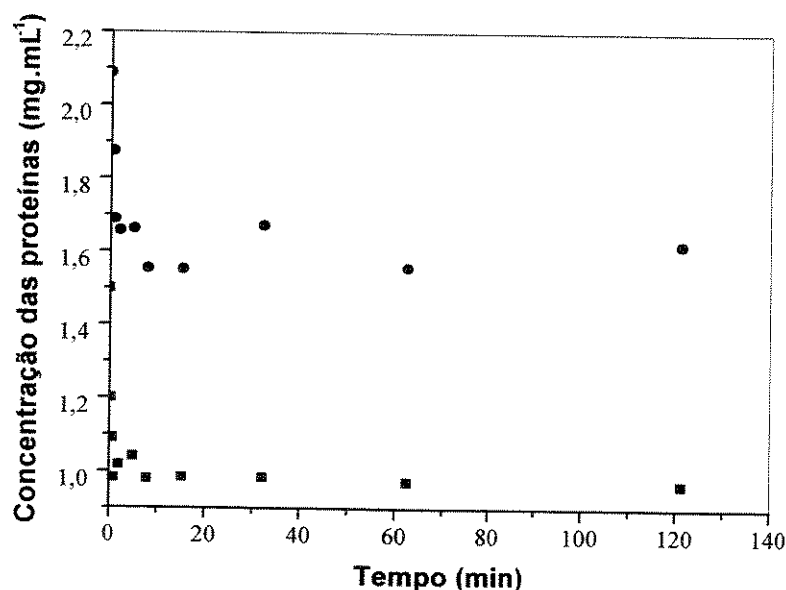


Figura 4.3- Cinética de adsorção da alfa-lactalbumina (■) e da beta-lactoglobulina (●), a partir do soro de leite bovino, na resina Streamline Phenyl. T= 25 °C, pH 7,5; solução tampão 50 mM Tris-35 mM EDTA.

As Figuras 4.4 e 4.5 mostram as isotermas da alfa-lactalbumina e da beta-lactoglobulina, separadamente, nas temperaturas de 25 e 30 °C. A Tabela 4.2 apresenta os valores dos parâmetros determinados através da aplicação do modelo de Langmuir (Equação 2.1) para o ajuste dos dados experimentais. O

aumento da temperatura aumenta a capacidade de adsorção dessas proteínas e a capacidade de adsorção da beta-lactoglobulina na resina é maior do que a da alfa-lactalbumina nas duas temperaturas estudadas. A Tabela 4.2 apresenta os valores de q_m para as duas proteínas e a comparação entre esses valores confirma o que acima foi exposto.

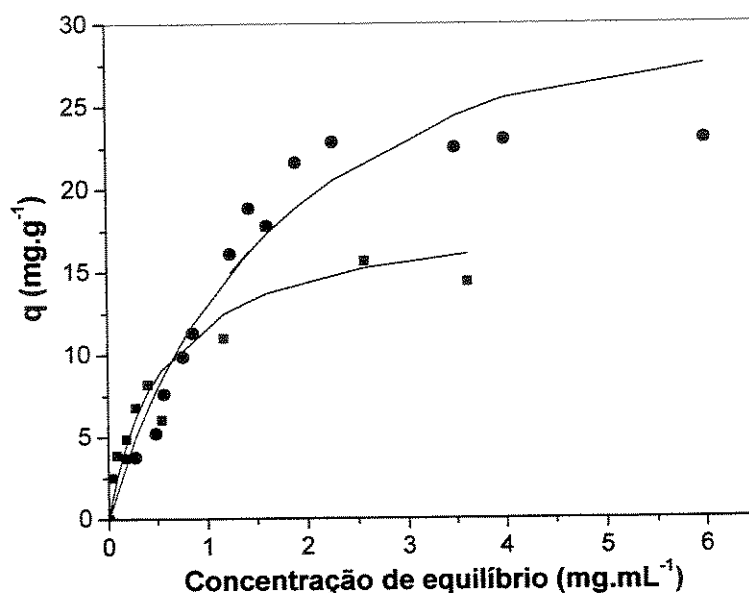


Figura 4.4- Isotermas de adsorção da alfa-lactalbumina na resina hidrofóbica obtida nas temperaturas de 25 °C (■) e 30 °C (●), em solução tampão 50 mM de Tris-35 mM EDTA e pH 7,5.

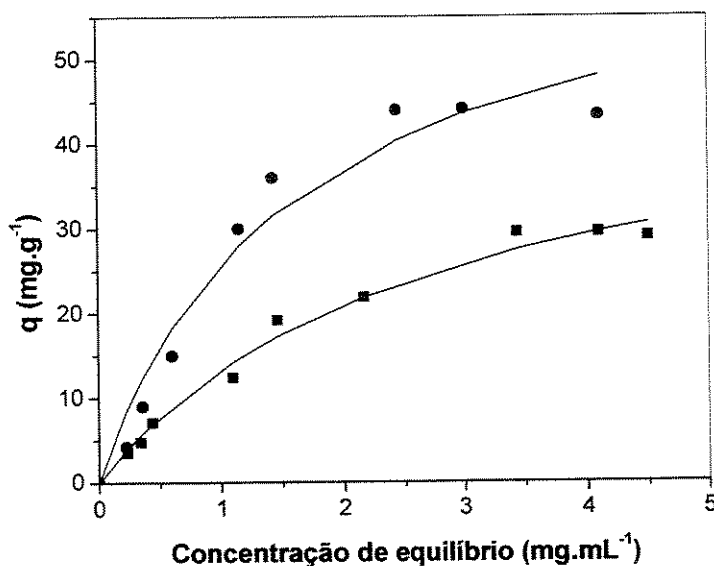


Figura 4.5- Isotermas de adsorção da beta-lactoglobulina na resina hidrofóbica obtida nas temperaturas de 25 °C (■) e 30 °C (●), em solução tampão 50 mM Tris-35 mM EDTA e pH 7,5.

Tabela 4.2- Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo Langmuir para a adsorção da alfa-lactalbumina e da beta-lactoglobulina padrão.

T (°C)	Alfa-lactalbumina			Beta-lactoglobulina		
	qm (mg .g ⁻¹)	K _d (mg.mL ⁻¹)	R ²	qm (mg .g ⁻¹)	K _d (mg.mL ⁻¹)	R ²
25	18,66	1,85	0,96	48,76	2,66	0,98
30	37,32	0,58	0,97	66,74	1,59	0,98

As constantes de dissociação para a alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina diminuíram com o aumento da temperatura, no entanto, esse efeito foi mais acentuado para a alfa-lactalbumina, indicando que na faixa de temperatura estudada a alfa-lactalbumina adsorve mais fortemente na resina do que a beta-lactoglobulina. A temperatura é um parâmetro que aumenta a interação da alfa-lactalbumina na resina hidrofóbica. Provavelmente esse aumento decorre da existência de uma maior força de ligação entre os aminoácidos apolares acessíveis da estrutura da alfa-lactalbumina com o grupo fenil da resina, do que os aminoácidos apolares da beta-lactoglobulina. No entanto, a capacidade máxima de adsorção da beta-lactalbumina é maior se comparada com a da alfa-lactalbumina.

As isotermas obtidas da adsorção conjunta da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina na temperatura de 25 °C se sobrepõem indicando que nessa condição é inviável a separação dessas duas proteínas (Figura 4.6).

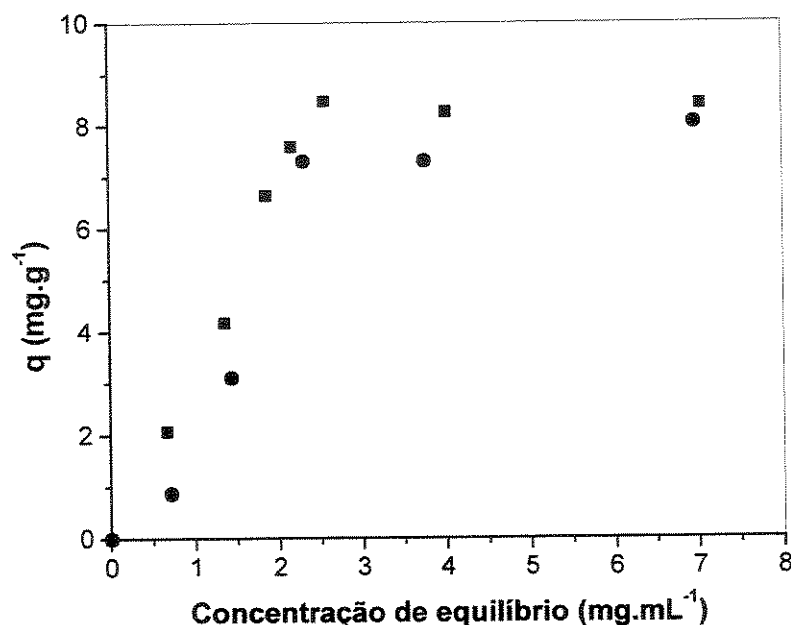


Figura 4.6- Isotermas de co-adsorção da alfa-lactalbumina (■) e da beta-lactoglobulina (●), na resina hidrofóbica obtida a partir de uma solução 1:1 padrão, a temperatura de 25 °C, pH 7,5 em solução tampão 50 mM Tris-35 mM EDTA.

A Figura 4.7 apresenta as isotermas de adsorção conjunta da alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina na temperatura de 30 °C. Pode-se observar, comparando-se as isotermas apresentadas nas Figuras 4.6 e 4.7, que este aumento da temperatura deslocou a condição de equilíbrio da alfa-lactalbumina, e provocou um aumento na capacidade de adsorção e interação com a resina. Acima da concentração de equilíbrio de 0,8 mg/ml, o comportamento da isoterma da alfa-lactalbumina traduz a tendência de formação de multicamadas. O aumento da interação é percebido através do aumento da inclinação da reta na faixa linear da isoterma na temperatura de 30 °C se comparada à de 25 °C para alfa-lactalbumina, confirmando o que já havia sido observado na isoterma obtida em separado na temperatura de 30 °C. A capacidade de adsorção da beta-lactoglobulina não sofreu alteração com o aumento da temperatura.

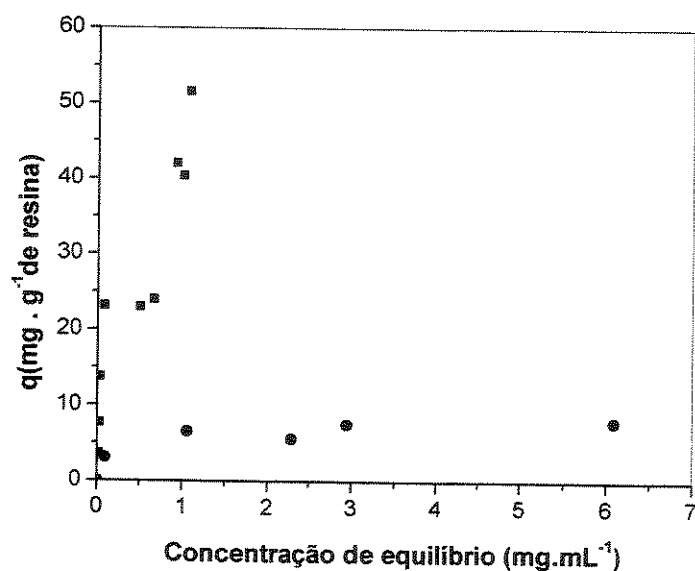


Figura 4.7- Isotermas de co-adsorção da alfa-lactalbumina (■) e da beta-lactoglobulina (●), na resina Streamline Phenyl obtida a partir de uma solução 1:1 padrão, temperatura de 30 °C, pH 7,5 e solução tampão 50 mM Tris- 35 mM EDTA.

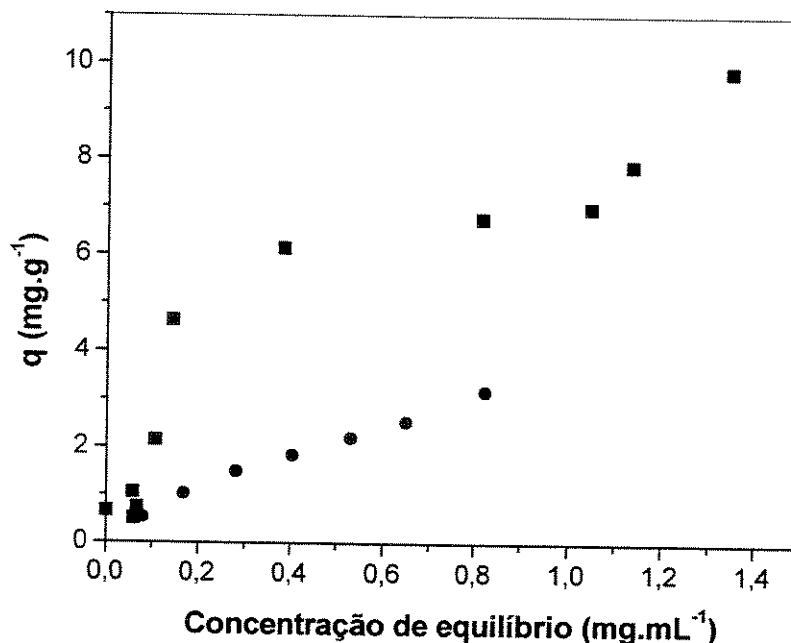


Figura 4.8- Isoterma de co-adsorção da alfa-lactalbumina (■) e da beta-lactoglobulina (●) contida no soro de leite bovino, obtida na resina hidrofóbica e temperatura de 34 °C, solução tampão 50 mM Tris -35 mM EDTA e pH 7,5.

A Figura 4.8 apresenta as isotermas da alfa-lactalbumina e da beta-lactoglobulina obtidas a partir do soro do leite bovino *in natura* na temperatura de 34 °C. Apesar das capacidades de adsorção das proteínas terem diminuído em relação às obtidas na co-adsorção a partir das soluções binárias, os comportamentos das isotermas são semelhantes às obtidas na temperatura de 30 °C, significando que nessas temperaturas os mecanismos envolvidos para adsorção dessas proteínas são os mesmos.

O modelo de Langmuir modificado para isotermas de co-adsorção, apresentado na Equação 2.2, poderia ser aplicado para alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina, na região de monocamada, no entanto, segundo Guiochon (2002), esse modelo só tem consistência termodinâmica (estabelecendo uma condição de equilíbrio) quando os q_m para cada proteína, ajustados pelo modelo, são iguais. Observando as isotermas apresentadas nas Figuras 4.7 e 4.8 percebe-se que os q_m são diferentes para as duas situações estudadas.

4.3. Comportamento Fluidodinâmico do Leito Expandido

4.3.1. Determinação dos Parâmetros de Richardson e Zaki

Foram realizados experimentos para estudar a expansão do leito de resina hidrofóbica como uma função da velocidade superficial utilizando o tampão de equilíbrio Tris 50 mM - 35 mM EDTA, para as alturas de leitos sedimentados de 10, 15, 20, 25 e 30 cm e velocidades lineares variando entre 3,25 cm.min⁻¹ e 6,30 cm.min⁻¹.

Há uma relação linear entre a altura do leito e a velocidade superficial para todas as alturas de leito sedimentado e velocidades lineares estudadas (Figura 4.9). Esse comportamento indica que na faixa de velocidade estudada a fluidização do leito é estável.

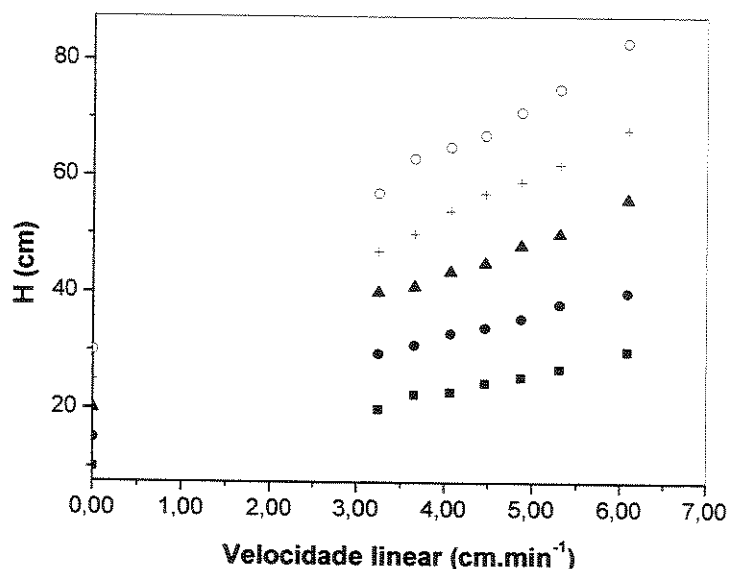


Figura 4.9- Altura final do leito expandido em função da velocidade linear do fluido tamponante a temperatura de 25°C para alturas de leito sedimentados de (■) 10 cm (●) 15 cm (▲) 20 cm (+) 25 cm (○) 30 cm.

Através da regressão linear do gráfico do logaritmo natural da velocidade linear pelo logaritmo natural da porosidade do leito expandido pode-se obter os parâmetros n e v_t da equação de Richardson e Zaki (1954) (Figura 4.10). O parâmetro n está relacionado com o regime de fluxo do processo e v_t com a velocidade terminal de equilíbrio. A Tabela 4.3 apresenta os valores de n e v_t para a fluidização da resina nas condições estudadas nesse trabalho.

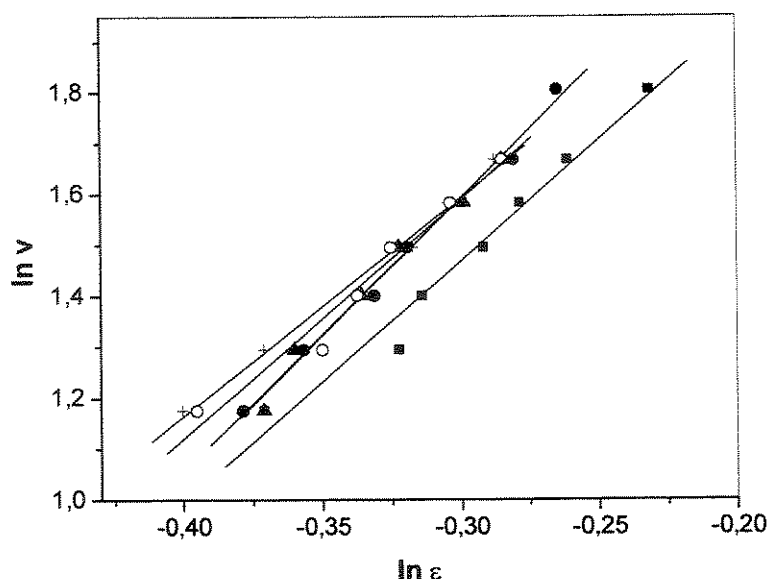


Figura 4.10- Linearização dos dados obtidos para velocidades lineares versus porosidade, para as alturas de leito sedimentado (■) 10 cm, (●) 15 cm, (▲) 20 cm, (+) 25 cm, (○) 30 cm, objetivando a obtenção dos parâmetros de Richardson e Zaki.

Tabela 4.3- Parâmetros de Richardson e Zaki para a fluidização da resina Streamline Phenyl obtidos com a solução tampão 50 mM Tris e 35 mM de EDTA, pH 7,5 e $T = 25^{\circ}\text{C}$.

H_0 (cm)	n	v_t (cm/min)	R^2	n_{ts}	n_M	v_{ts} (cm/min)	v_{tM} (cm/min)	Re_{ts}	Re_{tM}	d (μm)	μ_l (cp)
10	4,7	17,8	0,97	4,5	4,9	22,1	21,1	0,70	0,63	182	0,96
15	5,4	24,5	0,99								
20	5,4	25,0	0,98								
25	4,3	17,8	0,98								
30	4,7	19,9	0,97								

Os valores de n e v_t foram obtidos, através dos dados experimentais, aplicando a Equação 2.7. O valor de n_{ts} foi obtido da Equação 2.9 levando-se em consideração o Reynolds terminal (Re_{ts}) obtido com o valor da velocidade terminal (v_{ts}) calculado pela Equação 2.14 (Equação de Stokes). Os parâmetros n_M , v_{tM} e Re_{tM} são as médias dos valores de n , v_t e R_t (Reynolds obtido através dos valores de v_t , respectivamente).

Segundo Richardson e Zaki (1954), para $0,2 < Re_t < 500$ o fluxo é laminar quando os valores de n variam de 4,65 a 2,39. Jottran (1952) encontrou valores

para n igual a 5,6 para Reynolds terminal na faixa de 0,004 a 0,7 para partículas de diâmetro entre 20 e 130 μm , fluidizadas com água; essa faixa de Re_{ts} é bem menor do que a considerada por Richardson e Zaki, no entanto, o autor considera que o fluxo é laminar. Um trabalho recente (Theodossiou et al., 2002) compara valores de n experimental obtidos para protótipos de adsorventes desenvolvidos em laboratório (até então não comerciais e com alta densidade, e diâmetro de partícula pequena, em torno de 24 a 45,5 μm) com o adsorvente comercial da linha Streamline (com diâmetro de partícula entre 70 a 260 μm). O valor de n experimental obtido para o adsorvente não comercial variou entre 5,02 a 5,81 para valores de Re_{ts} entre 0,066 a 0,080 e o da linha Streamline apresentou um valor de 6,55 e Reynolds terminal de 0,76. No entanto, apesar dos altos valores de n esses autores consideraram que o regime de fluxo é laminar. Observando na Tabela 4.3 os valores obtidos para o parâmetro n_{ts} e n_M verifica-se que os valores são próximos e estão dentro da faixa prevista por Richardson e Zaki (1954), Jottran (1952) e Theodossiou et al. (2002). Desta forma pode-se assegurar que nas faixas de altura e velocidade linear estudadas, neste trabalho, o fluxo foi laminar quando o leito é fluidizado com a solução tampão. O valor encontrado para v_{tM} e o estabelecido pela equação de Stokes (v_{ts}) são próximos, indicando que a velocidade de equilíbrio não foi ultrapassada, ou seja, o leito possui uma fluidização estável.

4.3.2- Análise da Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

Foram obtidas as curvas de Distribuição de Tempo de Residência (DTR), usando a técnica de estímulo e resposta na coluna SP-25 contendo leito de resina hidrofóbica fluidizado com tampão e com soro do leite *in natura*. O objetivo da obtenção das curvas de DTR era a determinação dos parâmetros ϕ , Pe , D_{ax} e N através da aplicação do modelo matemático PDE. Os valores desses parâmetros podem caracterizar que tipo de escoamento predomina na coluna, mistura ou tubular, através de D_{ax} , o grau de comprometimento da fluidização, através do parâmetro ϕ e o grau de interação entre todos os constituintes presentes no meio líquido com o adsorvente sólido.

Como anteriormente mencionado, o avanço desse modelo frente ao modelo clássico de dispersão é que o mesmo prevê troca de matéria entre uma camada fluida que se move ao longo do leito e uma camada estagnada, fenômeno esse não previsto pelo modelo da dispersão. Os parâmetros previstos pelo modelo são obtidos através da resolução da Equação 2.17. Foi utilizado um programa Fortran, apresentado no Apêndice I, para a resolução dessa equação.

4.3.1.2- Análise da DTR pelo Modelo PDE

DTR obtida com solução tampão

A determinação da DTR com a solução tampão, antes da obtenção da mesma com o soro do leite bovino, se fez necessária uma vez que os parâmetros fluidodinâmicos obtidos através da distribuição com essa solução servem como referência permitindo comparar o grau de comprometimento da fluidodinâmica do leito quando a coluna passa a ser alimentada com a solução complexa (soro do leite bovino). Como consequência do comprometimento da fluidização pode ocorrer a diminuição da eficiência da adsorção das proteínas na coluna de leito expandido.

A Figura 4.11 apresenta a Curva de Distribuição do Tempo de Residência experimental e a obtida pelo modelo PDE, para a solução tampão Tris-EDTA nas concentrações de 50 mM e 35 mM, respectivamente, obtidas na altura de leito de 15, 20 e 25 cm e graus de expansão de 2,20; 2,75 e 3,00.

A Tabela 4.4 apresenta os parâmetros ϕ , Pe , D_{ax} e N encontrados através da aplicação do modelo PDE para a solução tampão. Através da Figura 4.11 pode-se concluir que ocorre um bom ajuste do modelo aos dados experimentais para as alturas de leito e graus de expansão investigadas nesse trabalho.

Através dos valores encontrados para os parâmetros, pode-se concluir que os valores de D_{ax} estão dentro do previsto na literatura para leito expandido. Batt et al. (1995) encontrou valores de D_{ax} para uma série de experimentos realizados com resinas Streamline iguais a $1,86 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, usando velocidades

de 135 cm.h^{-1} e altura de leito sedimentado de 8,6 cm. Thömmes et al. (1996) encontrou valores de D_{ax} na faixa de 6×10^{-6} a $9 \times 10^{-6} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ em colunas com altura de leito de 6,0 cm e velocidades lineares que variam de 375 cm.h^{-1} a 200 cm.h^{-1} . Os parâmetros Pe e D_{ax} estão intrinsecamente relacionados e altos valores do número de Pe são indicativos de uma baixa dispersão axial. Um número de Pe igual a 40 é considerado um valor crítico em se tratando de leito expandido. Nesse trabalho nas condições experimentais em que foram obtidos as DTRs com a solução tampão o número de Pe esteve igual ou acima do valor considerado crítico.

Tabela 4.4- Parâmetros obtidos através da aplicação do modelo PDE para expansão do leito ocorrido na presença do tampão 50 mM de Tris e 35 mM de EDTA, pH 7,5, $T = 25^\circ\text{C}$.

H_0	G_{exp}	Pe	φ	N	D_{ax}
15	2,20	40	0,98	0,06	$4,71 \times 10^{-6}$
	2,75	54	1,00	0,00	$7,97 \times 10^{-6}$
	3,00	54	0,98	0,00	$1,01 \times 10^{-5}$
20	2,20	80	1,00	0,00	$3,72 \times 10^{-6}$
	2,75	90	1,00	0,00	$6,00 \times 10^{-6}$
	3,00	93	1,00	0,00	$7,10 \times 10^{-6}$
25	2,20	80	1,00	0,00	$3,84 \times 10^{-6}$
	2,75	91	1,00	0,00	$7,47 \times 10^{-6}$
	3,00	92	0,98	0,10	$8,8 \times 10^{-6}$

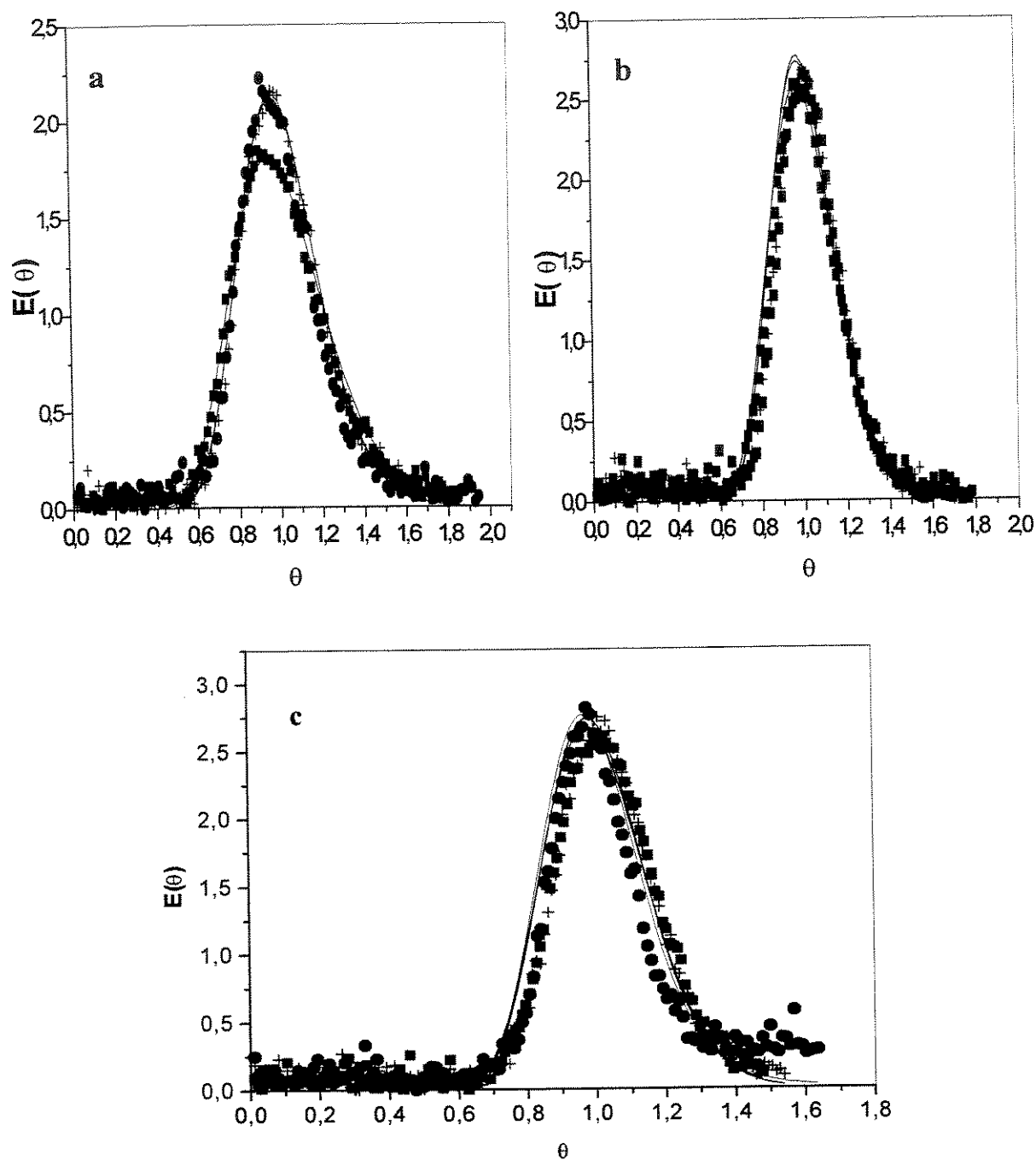


Figura 4.11- DTRs obtidas com a solução tampão 50 mM de Tris e 35 mM de EDTA, pH 7,5, $T = 25^\circ\text{C}$ para alturas de leito sedimentado de 15 cm (a), 20 cm (b) e 25 cm (c) e graus de expansão de 2,20 (■) 2,75 (+) e 3,00 (●). A linha cheia (—) representa o ajuste pelo modelo.

Fernández-Lahore et al. (1999) aplicando o modelo PDE às curvas de distribuição obtidas com tampão contendo sulfato de amônio em resina do mesmo tipo utilizado neste trabalho, encontrou valores de ϕ , Pe e N iguais a 0,55; 72 e 4,8 respectivamente. O alto valor encontrado para N é justificado pelos autores pela possível interação do tampão com a resina hidrofóbica, uma vez que o tampão contém sal de amônio. Essa interação provoca um gradiente de concentração, próximo à superfície da resina, promovendo a formação de uma camada estagnada levando portanto ao comprometimento da fluidização, apresentado pelo valor do parâmetro $\phi = 0,55$. Os baixos valores encontrados para N neste trabalho indicam que não há formação de camada estagnada na presença da solução tampão a ponto de comprometer a fluidização do leito. Esse comportamento é confirmado pelos altos valores encontrados para ϕ .

DTR obtida com o soro do leite bovino

A obtenção da DTR com o soro do leite bovino permitiu avaliar quantitativamente um possível comprometimento da fluidodinâmica do leito expandido em comparação com a fluidodinâmica estabelecida com a solução tampão e com o próprio soro do leite bovino nas várias condições operacionais de temperatura e grau de expansão em que ocorreram a adsorção das proteínas do soro do leite bovino.

A Figura 4.12 apresenta as DTR obtidas para a solução tampão e o soro do leite bovino, nas mesmas condições de grau de expansão e temperatura. Observando as curvas de distribuição obtidas as mesmas apresentam-se simétricas, porém, com um número de Pe igual a 48 para o soro de leite e maior do que o encontrado para a solução tampão que é igual a 40. Kalil (2000), Chase (1994) e De Luca et al. (1994), reportam comportamento semelhante para algumas soluções protéicas complexas característica creditada a uma maior viscosidade da solução que favorece, dependendo da velocidade linear de trabalho, a uma maior expansão do leito. Kalil (2000) estudando o efeito da expansão do leito em função da velocidade linear com a solução tampão e com caldo bruto com células, observou que ocorria uma expansão um pouco maior do

leito quando se aplicava o caldo bruto. Esta diferença foi observada a partir da expansão de 2,00 vezes a altura inicial do leito. A autora credits essa diferença de comportamento à maior viscosidade do caldo bruto se comparada com a viscosidade do tampão. O soro do leite tem viscosidade igual a 1,073 cp e o tampão de equilíbrio Tris-EDTA igual a 0,958 cp, à temperatura de 25 °C. Esse aumento na viscosidade da solução provocou um aumento na altura do leito de resina, levando a crer que há um re-equilíbrio nas forças que agem sobre as partículas sólidas, aliada a uma velocidade linear ideal (como consequência aumento do grau de expansão e porosidade do leito) gerando uma melhor fluidização do leito.

Os valores de N são iguais a zero para as duas soluções indicando que não há forte interação entre os constituintes das soluções com o adsorvente e, portanto, não há formação de camada estagnada e que um valor de ϕ elevado e igual a 1,00 para a solução tampão e 0,95 para o soro do leite demonstra que a fluidização do leito não foi comprometida devido a formação de camada estagnada.

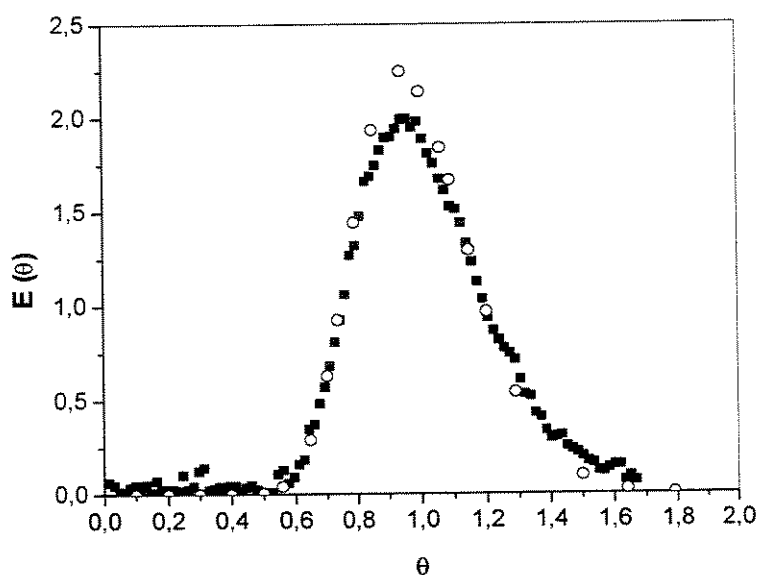


Figura 4.12- Curvas de Distribuição do Tempo de Residência obtidas para o soro de leite bovino e para a solução tampão 50 mM tri-35mM EDTA, pH=7,5 (o) soro do leite, $G_{exp}=2,25$, $T=25$ °C, (■) tampão, $G_{exp}=2,25$, $T=28$ °C

A Figura 4.13 apresenta curvas de distribuição obtidas para o soro do leite bovino em diferentes temperaturas e graus de expansão. Os valores dos parâmetros Pe , ϕ e N para todas as condições operacionais estudadas são apresentados na Tabela 4.5.

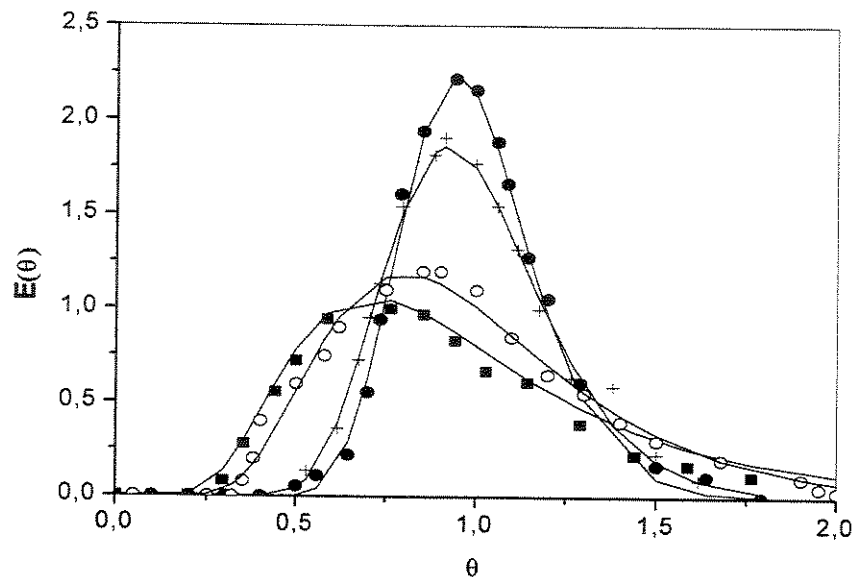


Figura 4.13- Curvas de Distribuição do Tempo de Residência obtidas para o soro de leite bovino, $pH=7,5$ (•) $G_{exp}=2,25$, $T=34^{\circ}C$, (+) $G_{exp}=3,00$, $T=28^{\circ}C$, (■) $G_{exp}=1,50$, $T=28^{\circ}C$

Tabela 4.5- Parâmetros Pe , ϕ e N obtidos através do modelo PDE para o soro do leite bovino. Altura de leite sedimentado igual a 15 cm.

Ensaio	T	G_{exp}	Pe	ϕ	N
1	24	1,71	12	93	0,01
2	32	1,71	35	87	0,11
3	24	2,75	41	87	0,11
4	32	2,75	50	97	0,00
5	22	2,25	35	82	0,11
6	28	3,00	37	97	0,00
7	34	2,25	57	97	0,00
8	28	1,50	9	87	0,13
9	28	2,25	48	95	0,00
10	28	2,25	46	93	0,01
11	28	2,25	47	96	0,03

Fernández-Lahore et al. (1999) e (2000) avaliam a influência da concentração de células presentes no meio líquido sobre a fluidodinâmica do leito expandido com diferentes tipos de adsorventes. Estes autores trabalharam com velocidade linear fixa e temperatura constante, portanto, não verifica a influência que as condições operacionais, tais como, temperatura e a velocidade linear (esta última variável estar diretamente relacionada com o grau de expansão e conseqüentemente, a porosidade), podem afetar a fluidodinâmica do leito, uma vez que não são apenas a complexidade da solução e o grau de interação dos constituintes que alimenta a coluna os responsáveis pelo comprometimento da estabilidade do leito.

No presente trabalho foram avaliados os efeitos da temperatura e do grau de expansão. Avaliou-se o grau de expansão acreditando-se que o mesmo tem uma importante influência sobre a fluidodinâmica do leito, uma vez que, a velocidade linear afeta diretamente o grau de mistura do fluido e do sólido refletindo na dispersão axial. Avaliou-se o efeito da temperatura devido à mesma aumentar as interações hidrofóbicas entre a proteína e o adsorvente, podendo provocar um gradiente de concentração entre a fase fluida e sólida e, com isto, gerar uma camada estagnada.

Nas condições de T e G_{exp} em que foram obtidas as curvas de distribuição para o soro do leite bovino percebe-se um comprometimento da estabilidade do leito nas DTRs obtidas nos menores graus de expansão. As curvas obtidas nos graus de expansão de 1,50 e 1,71 não possuem simetria e apresentam um acentuado desvio para a esquerda, indicando que a maioria dos elementos de fluido que escoam na coluna permanece um menor tempo do que nas condições de grau de expansão de 3,00 e 2,25 e temperaturas de 28 e 34 °C, respectivamente. Esse comportamento é típico de formação de canais preferenciais formados ao longo do leito. Em contrapartida à formação de canais dentro da coluna há, por parte do sólido, formação de aglomerados visualmente percebidos no experimento realizado no grau de expansão igual a 1,50 e temperatura de 28 °C. A formação de canais preferenciais provocou uma drástica diminuição do número de Pe , se comparada com as demais condições em que foram obtidas as DTRs, como pode

ser verificado na Tabela 4.5. É interessante observar que nos graus de expansão de 2,25 e 3,00 e temperaturas de 32 e 28 °C, respectivamente, o número de Pe para a condição de menor grau de expansão é maior do que o de maior grau. Quando foram analisadas as curvas de distribuição da solução tampão com a do soro do leite bovino na condição de $G_{exp} = 2,25$ e $T = 28$ °C, verificou-se que o Pe para o soro era maior do que para a solução tampão. Esse comportamento foi fisicamente explicado pelo fato do soro possuir maior viscosidade do que a solução tampão. No entanto, sabe-se que o aumento da temperatura diminui a viscosidade da solução, dessa forma o comportamento deveria ser o inverso, porém, para obter um grau de expansão maior é necessário que se trabalhe com uma maior velocidade linear o que pode provocar (dependendo do valor dessa velocidade) um aumento no grau de mistura da solução aumentando a dispersão axial na coluna e uma conseqüente diminuição no número de Pe. Dando continuidade a análise da fluidodinâmica do leite, é de se esperar que o efeito da temperatura traga alguma conseqüência, uma vez que, o aumento na temperatura aumenta a interação das proteínas hidrofóbicas do soro com o adsorvente e que esta interação pode gerar um gradiente de concentração e, conseqüentemente, a formação de uma camada estagnada entre o adsorvente e soro do leite, quantitativamente representado pelo parâmetro N. Avaliando os dados de N na Tabela 4.5 percebe-se que estes são próximos ou iguais a zero, independente das condições de trabalho aqui estudadas. Com os valores apresentados para o parâmetro N pode-se concluir que os constituintes do soro do leite bovino adsorvem na resina, mas, não tão fortemente a ponto de gerar uma camada estagnada que afeta a fluidização do leite. Esse fato é confirmado pelos valores de ϕ que com o soro do leite, nas condições aqui estudadas, apresentaram valores acima de 0,8, valor esse considerado crítico segundo Fernández-Lahore et al. (2000) para leite expandido.

Pode-se concluir que, com o soro do leite bovino, os números de Pe obtidos abaixo do valor crítico são, principalmente, devido ao aumento da dispersão axial dentro da coluna e não pela formação de uma camada estagnada proveniente de uma forte interação entre os componentes presentes no soro do leite a ponto de ser refletido no comprometimento da estabilidade do leite. A

formação de camada estagnada refletiria quantitativamente no parâmetro ϕ , que para esse trabalho apresenta valores acima de 80% como mencionado anteriormente. Os efeitos e as interações entre as variáveis G_{exp} e T sobre os parâmetros Pe , ϕ e N serão mais perceptíveis quando for analisado o planejamento experimental que será discutido no item 4.6.

4.4. Estudo Comparativo entre a Adsorção do Leito Fixo e o Leito Expandido

Foram obtidas curvas de rupturas para o soro de leite na coluna SP-25 operando com o leito no modo fixo e expandido com a mesma altura de leito (fixo e sedimentado) igual a 10 cm e velocidade linear de $4,00 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$. O objetivo desse estudo foi observar o comportamento da adsorção nesses dois modos de operação. A Figura 4.14 apresenta as curvas de rupturas para a adsorção do soro de leite no leito fixo e expandido que as curvas se sobrepõem. Esse comportamento era esperado uma vez que o leito expandido deve operar de forma similar ao leito fixo.

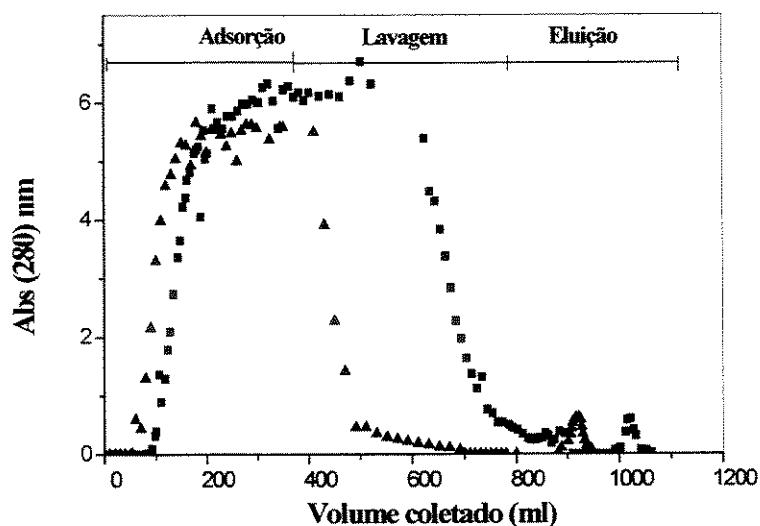


Figura 4.14- Curvas de rupturas do soro de leite bovino obtidos no modo de operação fixo ($\blacktriangle$) e expandido ($\blacksquare$) para altura de leito de 10 cm.

Essa similaridade de comportamento é devido à expansão do leito ser estável e com baixo coeficiente de dispersão axial, provocada pela característica inerente ao adsorvente que, uma vez fluidizado, gera um gradiente de densidade de partículas dentro da coluna, segundo Chase (1994). A Tabela 4.6 apresenta os

valores de D_{ax} e Pe obtidos para o leito fixo tendo como fluido de alimentação da coluna a solução tampão de equilíbrio. O coeficiente de dispersão axial, esperado e reportado na literatura (10^{-7}), é uma ordem de grandeza menor do que ao valor encontrado para o leito expandido (10^{-6}).

Tabela 4.6 – Parâmetros obtidos através da aplicação do modelo MD para altura de leito fixo de 10 cm, solução tampão de equilíbrio, pH 7,5 e $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

v_t (cm/min)	σ^2	D_{ax} (m^2/s)	Pe
2,03	0,0157	$2,66 \times 10^{-7}$	127,00
3,25	0,0204	$5,50 \times 10^{-7}$	97,94
3,65	0,0218	$5,90 \times 10^{-7}$	91,53
4,06	0,0238	$8,10 \times 10^{-7}$	84,13
4,46	0,0229	$8,52 \times 10^{-7}$	87,03

4.5. Análise das Curvas de Ruptura e da Determinação da Recuperação e Pureza da Alfa-lactalbumina a Partir do Soro do Leite Bovino

Os ensaios de adsorção no leito expandido com a resina foram realizados em condições experimentais de modo que a influência do grau de expansão, temperatura e a interação entre ambas pudessem ser evidenciadas sobre a eficiência da coluna em adsorver as proteínas do soro do leite bovino e, conseqüentemente, sobre a recuperação e pureza da alfa-lactalbumina. Neste trabalho a eficiência é o principal fator em que se baseiam as análises comparativas entre as várias condições operacionais usadas para obtenção das curvas de rupturas.

Estão aqui abordados apenas os experimentos realizados com a altura do leito sedimentado igual a 15 cm. O grau de expansão variou de 1,50 a 3,00 e a temperatura de 22 a 34 $^{\circ}\text{C}$. As condições estabelecidas de temperatura e grau de expansão para obtenção das curvas de rupturas no processo de adsorção, ou seja, as combinações das variáveis T e G_{exp} , seguiram a metodologia usada para a otimização de processos, usando como ferramenta o planejamento experimental, cujos resultados serão discutidos no item 4.6.

No presente item são avaliadas as curvas de rupturas comparando os dados obtidos entre duas ou três situações operacionais, entre os onze ensaios em que foram realizados os experimentos, buscando um entendimento físico do que ocorreu quanto à eficiência da coluna em adsorver todas as proteínas do soro do leite bovino e, conseqüentemente, a influência sobre o grau de pureza e a recuperação da alfa-lactalbumina. Essa forma de análise comparativa entre os dados obtidos não é a forma ideal, uma vez que as combinações das variáveis foram obtidas através de um planejamento experimental e que metodologicamente uma análise estatística englobando as diferentes situações operacionais é a mais indicada. No entanto, a forma em que foram analisados os dados favorece a uma investigação, mesmo que especulativa, interessante para a obtenção de uma fundamentação teórica que serve também para uma conclusão do comportamento físico e não apenas estatístico realizado com o planejamento experimental.

4.5.1 Curvas de Rupturas Obtidas para o Soro do Leite Bovino

A Tabela 4.7 apresenta as condições de temperatura e grau de expansão em que foram obtidas as curvas de rupturas e os respectivos valores de pureza (Pz) e eficiência (Ef) da coluna de leite expandido em adsorver todas as proteínas do soro de leite bovino e, conseqüentemente, a alfa-lactalbumina.

Tabela 4.7- Condições operacionais das curvas de rupturas do soro do leite bovino e os valores de pureza da alfa-lactalbumina e eficiência da coluna.

Ensaio	T (°C)	G _{exp}	Pz (%)	Ef (%)
1	24	1,71	71	76
2	32	1,71	82	79
3	24	2,75	83	78
4	32	2,75	100	92
5	22	2,25	77	75
6	28	3,00	84	84
7	34	2,25	100	91
8	28	1,50	79	68
9	28	2,25	85	90
10	28	2,25	82	88
11	28	2,25	85	87

A Figura 4.15 apresenta as curvas de rupturas nas condições de maior e menor eficiência da coluna em adsorver as proteínas do soro de leite bovino. As menores eficiências ocorreram nos graus de expansão de 1,50, 1,71, 2,25 e temperaturas de 28, 24 e 22 °C, respectivamente, e a maior eficiência no grau de expansão 2,75 e temperatura de 32 °C.

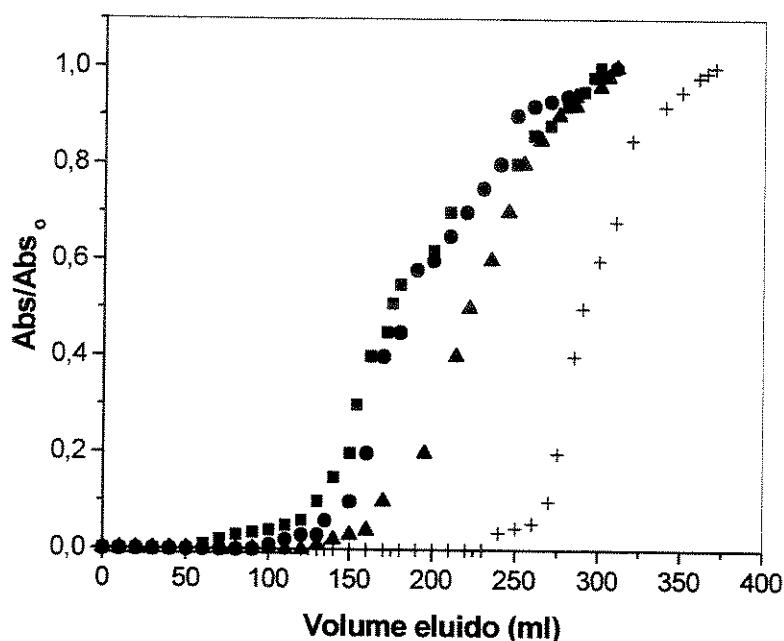


Figura 4.15- Curvas de rupturas do soro do leite bovino; menor Ef: $G_{exp}=1,50$, $T=28^{\circ}\text{C}$ (■), $G_{exp}=1,71$, $T=24^{\circ}\text{C}$ (•), $G_{exp}=2,25$, $T=22^{\circ}\text{C}$ (▲); maior Ef: $G_{exp}=2,25$, $T=32^{\circ}\text{C}$ (+).

Nas condições de menor eficiência (68%, 76%, 75%) as purezas da alfa-lactalbumina foram iguais a 79%, 71% e 77%, e na de maior eficiência (92%) a pureza da alfa-lactalbumina foi de 100%, determinada por HPLC. A Tabela 4.8 apresenta os dados e as condições em que foram obtidos a maior e a menor eficiência da coluna e o grau de pureza alcançada para a alfa-lactalbumina.

Tabela 4.8- Dados da pureza da alfa-lactalbumina e da maior e menores eficiências obtidas na coluna de leite expandido.

	T (°C)	G _{exp}	Pz (%)	Ef (%)
Menores Ef	28	1,50	79	68
	24	1,71	71	76
	22	2,25	77	75
Maior Ef	32	2,75	100	98

É interessante observar que a pureza, igual a 79%, obtida no grau de expansão 1,50 e temperatura de 28 °C, é maior do que a pureza de 71% obtida na condição de grau de expansão 1,71 e temperatura de 24 °C, e praticamente igual a pureza de 77% obtida no grau de expansão de 2,25 e temperatura de 22 °C, apesar da eficiência ser menor, mas deve-se observar que a temperatura em que foi realizado o experimento no G_{exp} de 1,50 é maior do que as demais e igual a 28 °C, levando a concluir que um aumento no grau de expansão aumenta a eficiência na adsorção das proteínas do soro de leite e que um aumento na temperatura aumenta o grau de pureza da alfa-lactalbumina. No entanto, comparando os valores das eficiências obtidas para o grau de expansão 1,71 e 2,25 nas temperaturas de 24, 22 °C, respectivamente, observa-se que as mesmas são praticamente iguais, porém, os valores das purezas são diferentes, sendo o de maior valor obtido a menor temperatura, 22 °C. Nesse último caso a diferença entre as temperaturas (2 °C) é muito pequena e que provocou uma diferença de 8% na pureza e que um aumento considerável no grau de expansão (aproximadamente 32%) praticamente não provocou grandes variações na eficiência sendo, portanto, precipitado concluir que o aumento da temperatura só influencia o aumento da pureza da proteína e que o aumento do grau de expansão, por sua vez, é o único fator que provoca o aumento da eficiência do processo de adsorção.

Analisando os dados de Ef e Pz obtidas no mesmo grau de expansão e temperaturas diferentes, apresentados na Tabela 4.9, e na mesma temperatura com graus de expansão diferentes, apresentados na Tabela 4.10, cujas curvas de rupturas são apresentadas na Figura 4.16, num primeiro momento pode-se concluir que o aumento da temperatura e do grau de expansão aumenta a eficiência de adsorção e a pureza da alfa-lactalbumina.

Tabela 4.9- Pureza da alfa-lactalbumina e eficiência da coluna no mesmo grau de expansão e temperaturas diferentes.

	G_{exp}=1,71		
	T (°C)	Pz (%)	Ef (%)
Ensaio 1	24	71	76
Ensaio 2	32	82	79
	G_{exp}=2,75		
	T (°C)	Pz (%)	Ef (%)
Ensaio 3	24	83	78
Ensaio 4	32	100	92

Tabela 4.10- Pureza da alfa-lactalbumina e eficiência da coluna na mesma temperatura e graus de expansão diferentes.

	T= 24 °C		
	G_{exp}	Pz (%)	Ef (%)
Ensaio 1	1,71	71	76
Ensaio 3	2,75	83	78
	T= 32 °C		
	G_{exp}	Pz (%)	Ef (%)
Ensaio 2	1,71	82	79
Ensaio 4	2,75	100	92

A conclusão de que um aumento na eficiência e na pureza está intrinsecamente relacionado ao aumento do grau de expansão e temperatura, conjuntamente, torna-se comprometida se for generalizado para todas as condições operacionais aqui investigadas, basta comparar os valores das eficiências e purezas obtidas nos ensaios 4 e 6, onde percebe-se uma queda na

eficiência e pureza a medida que a temperatura diminui e o grau de expansão aumenta e, comparado os dados de pureza e eficiência obtidos nos ensaios 3 e 8, observa-se que os mesmos diminuem a medida que a temperatura aumenta e o grau de expansão diminui. A Tabela 4.11 apresenta os dados dos ensaios acima citados.

Tabela 4.11- Dados obtidos para pureza da alfa-lactalbumina e eficiência da coluna em diferentes graus de expansão e diferentes temperaturas

		Pz (%)	Ef (%)
Ensaio 4	$G_{exp}=2,70$ $T=32^{\circ}\text{C}$	100	92
Ensaio 6	$G_{exp}=3,00$ $T=28^{\circ}\text{C}$	84	84
Ensaio 3	$G_{exp}=2,75$ $T=24^{\circ}\text{C}$	83	78
Ensaio 8	$G_{exp}=1,50$ $T=28^{\circ}\text{C}$	79	68

Assim, pelas análises feitas até o presente momento, percebe-se que há uma sinergia de fenômenos presentes no processo de adsorção no leite expandido de resinas hidrofóbicas quando as duas variáveis controladas (G_{exp} e T) são modificadas.

Diante do que acima foi exposto é difícil concluir, através de uma análise comparativa entre os ensaios, como essas duas variáveis afetam o processo de adsorção quanto à pureza dos produtos e eficiência da coluna. Essa forma de análise mostra a influência e o conseqüente efeito que duas variáveis controladas, no presente caso temperatura e grau de expansão, podem apresentar no processo de adsorção do soro do leite bovino em resinas hidrofóbicas e leite expandido. Uma variável pode ter maior efeito sobre a adsorção de proteínas do que outra. Deve-se, então, avaliar a influência que cada uma, e ainda a combinação delas pode afetar o processo. Em se tratando de uma mistura complexa, como é o caso do soro do leite bovino, os efeitos das combinações das duas variáveis no estudo da adsorção também são complexos; esses efeitos podem ser positivos e negativos sobre a variável resposta pureza ou eficiência. O

efeito é positivo quando o aumento da variável controlada aumenta, por exemplo, a eficiência e a pureza. Os efeitos negativos estão relacionados com o aumento da variável resposta quando a variável controlada diminui. Uma variável pode contribuir de forma positiva e a outra de forma negativa para o aumento da variável resposta. A análise ideal é observar e avaliar quantitativamente os efeitos globais das variáveis sobre a adsorção do soro do leite bovino nas condições estudadas e analisar estatisticamente os dados.

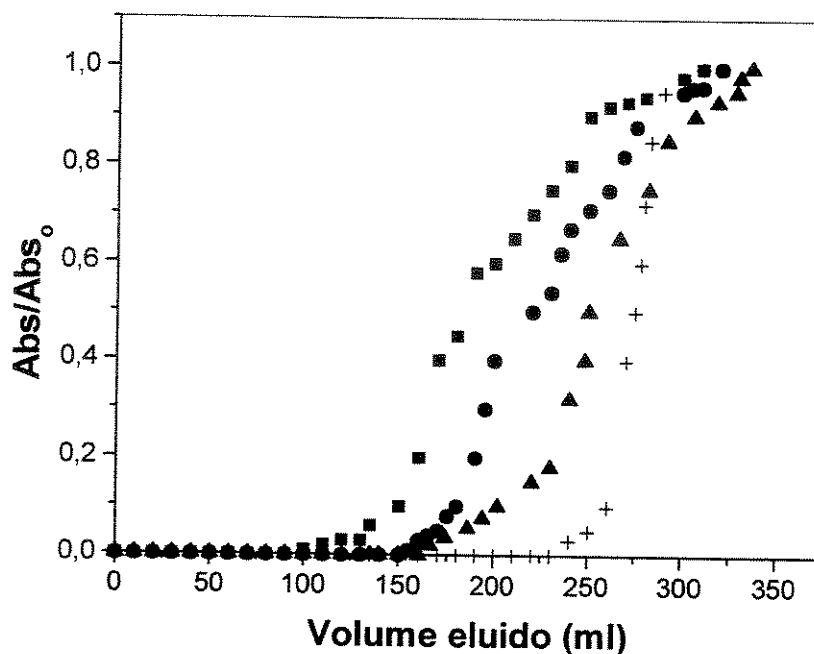


Figura 4.16- Curvas de rupturas obtidas nas condições (■) $G_{exp} = 1,71$, $T = 24^{\circ}C$; (●) $G_{exp} = 1,71$, $T = 32^{\circ}C$; (▲) $G_{exp} = 2,75$, $T = 24^{\circ}C$; (+) $G_{exp} = 2,75$, $T = 32^{\circ}C$.

A literatura apresenta curvas de rupturas obtidas experimentalmente de forma convencional, ou seja, mantendo-se constante a temperatura e analisando principalmente o efeito da variação da velocidade linear que também está relacionado com o efeito do grau de expansão sobre a capacidade dinâmica da coluna de leito expandido (Tong et al., 2002, Finette et al., 1998, Mullick et al., 1998, Thömmes et al., 1995). Segundo esses autores o aumento da velocidade linear diminui a capacidade dinâmica de adsorção das proteínas. Finnet et al. (1998) estudaram o efeito da temperatura, que variou entre 4 e 37 $^{\circ}C$, mantendo a velocidade linear constante e igual a 3,82 $cm \cdot min^{-1}$, na adsorção em separado da

lisozima e da albumina do soro humano em leite expandido, no adsorvente Cibracon Blue F3A imobilizado em Fractosil 1000, e observaram que o aumento da temperatura aumenta a capacidade de adsorção das proteínas e que a inclinação das curvas de rupturas tornavam-se mais íngremes. Os autores explicam que a redução da viscosidade do fluido a altas temperaturas afeta a difusividade da proteína em solução, e melhora o transporte das moléculas da fase fluida até a superfície externa do adsorvente, e dessa superfície, até o interior dos poros. Em adição a influência da redução da viscosidade do fluido sobre esses fenômenos de transportes, variações sobre a inclinação das curvas de rupturas para essas proteínas em diferentes temperaturas deve também ter sua origem na combinação de efeitos dependentes da temperatura como variação da conformação de ambas proteínas, variações nos valores de pK e mudanças dos estados de ionização das proteínas.

Com os experimentos realizados nesse trabalho com o soro do leite bovino, fica evidente, pelo que foi exposto até o presente momento, que os efeitos combinados provocados pela variação da velocidade linear com a temperatura afetam tanto a eficiência da coluna em adsorver todas as proteínas do soro do leite bovino, quanto à pureza da alfa lactalbumina. Há uma velocidade linear e uma temperatura ótima, iguais a $3,50 \text{ cm.min}^{-1}$ ($G_{\text{exp}}=2,25$) e 34°C , respectivamente, nas quais a dispersão axial é a menor obtida, uma vez que apresenta o maior número de Pe, como pode ser visto na Tabela 4.5, nas condições experimentais estudadas, indicando que nas melhores condições de fluidização e na maior temperatura há uma maior eficiência em adsorver todas as proteínas do soro de leite bovino e que, a alfa-lactalbumina é a proteína que adsorve mais seletivamente na resina hidrofóbica. A Figura 4.17 apresenta as curvas de rupturas obtidas nessas duas condições.

Nas condições de graus de expansão em que foram obtidas as melhores purezas, as porosidades do leite são iguais a 0,72 para $G_{\text{exp}}= 2,25$ e 0,77 para $G_{\text{exp}}= 2,75$. Para o grau de expansão de 3,00 e porosidade de 0,79 a eficiência e pureza decaíram, nessa condição o número de Pe (37) apresentou um valor abaixo do valor considerado crítico para leite expandido. Chang e Chase (1996),

trabalhando com a adsorção da enzima lisozima em resina Streamline SP e comparando diferentes graus de expansão, concluíram que uma maior quantidade de proteína adsorvida era alcançada com a expansão do leito de duas vezes, correspondendo a uma porosidade de leito de 0,70. Kalil (2000), estudando a adsorção de inulinase em cromatografia de troca iônica, concluiu que o aumento da expansão do leito diminui a massa adsorvida dessa enzima na coluna Streamline SP-25. A melhor adsorção, encontrada por essa autora, foi com a altura do leito expandido igual a duas vezes a altura do leito sedimentado.

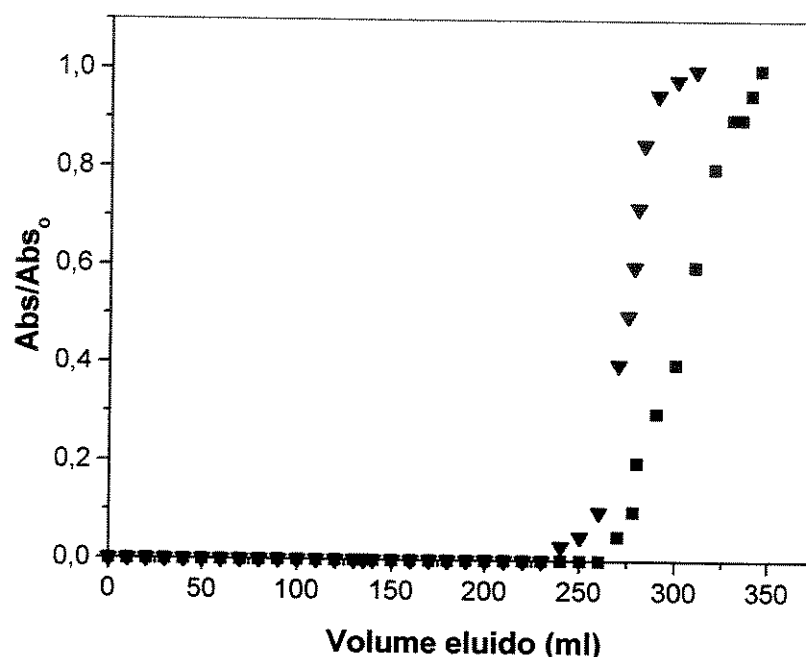


Figura 4.17 - Curvas de rupturas do soro do leite bovino obtidas nas condições: (■) $G_{exp} = 2,75$, $T = 32^{\circ}\text{C}$; (▼) $G_{exp} = 2,25$, $T = 34^{\circ}\text{C}$. Abs_0 é a absorção inicial do soro de leite. Abs_0 é a absorção do soro do leite.

O aumento do grau de expansão aumenta a porosidade do leito e, conseqüentemente, possibilita uma melhor passagem de partículas sólidas pelos espaços vazios. Para alcançar uma maior expansão, partindo da mesma altura do leito sedimentado, necessita-se do aumento da velocidade de alimentação do fluido. Esse aumento da velocidade diminui a formação de aglomerados na resina; a aglomeração da resina compromete a fluidização do leito e conseqüentemente a adsorção das proteínas. O aumento da velocidade linear não pode ser demasiadamente elevado evitando assim que a velocidade de sedimentação de

Stokes seja ultrapassada. Acima da velocidade de equilíbrio, a fluidização do leito expandido deixa de ser estável, o que não é desejável para um processo de adsorção realizado em colunas. O aumento da expansão do leito, até 2,75 vezes, aliado à diminuição da formação de aglomerados e a presença de uma fluidização estável favorece a difusão das proteínas até a superfície da resina aumentando a adsorção do soro do leite e aumentando a retenção na coluna.

Nos experimentos em que a adsorção ocorreu nos graus de expansão de 1,50 e 1,71 houve uma diminuição na altura do leito quando a coluna de leito expandido deixou de ser alimentada pelo tampão de equilíbrio (etapa de equilíbrio) e passou a ser alimentada pelo soro do leite bovino (etapa de adsorção). Para o grau de expansão de 1,50 em que a altura final do leito era igual a 22,50 cm, com a aplicação do soro essa altura diminuiu para 20,00 cm e se manteve até a saturação do leito. Essa diminuição da altura do leito é um sinal de que existe a formação de agregados na resina e que a velocidade linear ora controlada no processo, não foi suficiente para vencer essa agregação através da fluidização do leito.

Com uma baixa velocidade linear os efeitos dispersivos na entrada da coluna ainda são acentuados comprometendo a adsorção da solução protéica. Na condição de grau de expansão de 1,50 ao ser retirada cuidadosamente, a resina da coluna, logo após a etapa de adsorção, foi percebido visualmente a formação de aglomerados na resina. Com expansões de 2,00 e 2,50, as alturas finais do leito eram mantidas mesmo após a alimentação do soro do leite bovino. Retirada a resina da coluna, após a etapa de adsorção, foi visualmente perceptível a diminuição dos aglomerados.

Para graus de expansões acima de 2,25, percebia-se uma maior fluidização do leito e até mesmo a formação de uma camada de espuma com espessura de aproximadamente 1,00 cm no final da coluna, chegando muitas vezes ao entupimento do pistão devido ao arraste da resina.

Vale salientar que nos ensaios realizados para observar visualmente a diminuição da altura do leito, a formação de aglomerados na resina, a formação de espumas após a aplicação do soro do leite, e a viscosidade foram todos realizados à temperatura de 25 °C. A temperatura é uma variável que afeta a retenção das proteínas em cromatografia, influenciando as características tanto da fase móvel quanto da fase estacionária. O efeito de temperatura pode estar relacionado com a variação da viscosidade da solução protéica, característica física muito importante na cromatografia de leito expandido, com a estrutura e a mudança conformacional da proteína, com a solubilidade da proteína em soluções aquosas, como também, à força de interação entre a proteína e o ligante.

Em relação ao soro do leite bovino percebe-se que acima de 32 °C ocorre um aumento da eficiência na adsorção das proteínas do soro do leite e um conseqüente aumento na pureza da alfa-lactalbumina. Segundo Hjertén et al. (1974), na cromatografia de interações hidrofóbicas o aumento da temperatura acentua a retenção de proteínas e a diminuição da temperatura geralmente promove a eluição da proteína. Para Jan-Christer Janson e Lars Rydén (1998), o tratamento teórico da dependência da temperatura nas interações hidrofóbicas é bastante complexo, no entanto pode-se concluir que a intensidade das interações hidrofóbicas aumenta com o aumento de temperatura.

4.5.2 Recuperação e Purificação da Alfa-Lactalbumina

Após os ensaios de adsorção foram realizadas as etapas de lavagem da resina, eluição da proteína e regeneração do leito. A Tabela 4.12 apresenta os resultados da pureza, recuperação, perda e fator de purificação da proteína alfa-lactalbumina obtidas durante a realização do processo de cromatografia de interações hidrofóbicas com o soro de leite bovino. Os balanços de massa para os processos de adsorção dessa proteína são mostrados no Apêndice II.

A pureza (Pz) da alfa-lactalbumina obtida da fração eluída com CaCl_2 foi determinada por análise em HPLC, que fornece a percentagem da proteína contida na amostra em relação às demais presentes no meio. A recuperação (Rc)

foi definida como a relação entre a quantidade em massa da proteína alfa-lactalbumina que foi alimentada na coluna e a quantidade em massa dessa proteína obtida na eluição. A perda (Fp) apresentada na Tabela 4.12 foi definida como a relação entre a quantidade em massa da alfa-lactalbumina obtida no processo de regeneração da coluna e a quantidade em massa da proteína obtida na eluição; essa perda representa a percentagem de alfa-lactalbumina que deixou de ser obtida na etapa de eluição.

Tabela 4.12- Valores da pureza, recuperação, regeneração, perdas referentes à eluição e fator de purificação da alfa-lactalbumina.

T (°C)	G_{exp}	Pz (%)	Rc (%)	Perdas (%)	Fp
24	1,71	71	9,3	0,00	3,39
22	2,25	77	9,3	0,00	3,70
28	3,00	84	8,2	6,65	4,10
28	1,5	79	8,0	0,00	3,60
24	2,75	83	8,0	0,00	3,69
32	1,71	82	7,8	11,26	4,50
28	2,25	85	7,8	0,00	3,90
28	2,25	85	7,7	0,00	4,00
34	2,25	100	7,7	14,23	4,75
28	2,25	82	7,5	0,00	2,70
32	2,75	100	7,4	16,00	4,50

A Figura 4.18 apresenta um cromatograma completo nas condições onde se obteve a maior e a menor recuperação da alfa-lactalbumina a partir do soro do leite bovino na resina Streamline Phenyl na coluna SP-25.

Na condição de menor recuperação, temperatura de 32 °C e grau de expansão de 2,75 e na de maior recuperação, temperatura de 24 °C e grau de expansão de 1,71, as purezas foram de 71% e 100%, respectivamente. Deve-se ressaltar que os valores reportados da pureza foram às apresentadas contidas no registrador do HPLC. Comparando a análise quantitativa (obtida através do HPLC)

com a análise qualitativa (obtida por eletroforese, ver Figura 4.21) observa-se que nas condições em que foram obtidas pureza da alfa-lactalbumina de 100%, pode-se visualizar na análise qualitativa, impurezas de caráter protéico.

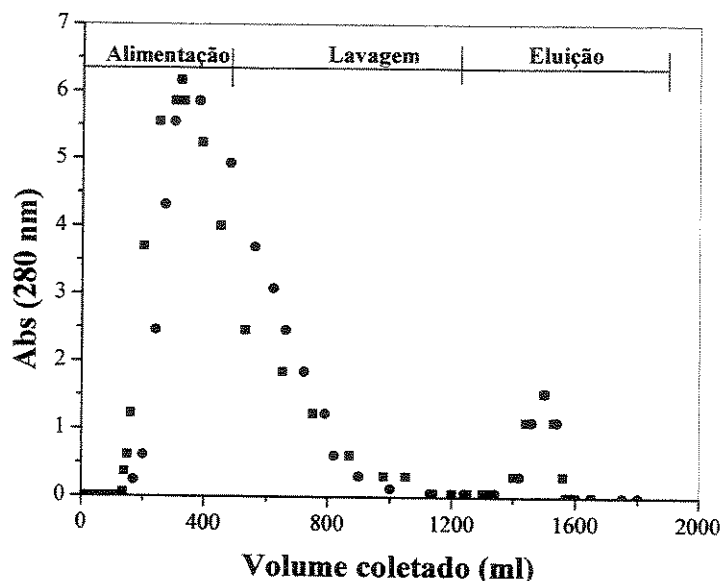


Figura 4.18- Cromatogramas completos da obtenção da alfa-lactalbumina nas condições de menor recuperação (•) $G_{exp} = 2,75$, $T = 32^{\circ}\text{C}$ e maior recuperação (■) $G_{exp} = 1,71$, $T = 24^{\circ}\text{C}$.

Observando a Tabela 4.12 percebe-se que as condições nas quais ocorreram perdas, tendo como referência a eluição, estão associados às condições de operação realizadas com as maiores temperaturas, 34, 32 e 28°C , indicando que a temperatura realmente aumenta a interação da proteína com a resina não promovendo a retirada total da alfa-lactalbumina. Nesse trabalho, todas as etapas de eluição foram realizadas na mesma temperatura em que foram promovidas as etapas de adsorção e lavagem. A escolha desse procedimento foi feita como uma forma de evitar, num primeiro momento, a otimização de uma variável a mais (temperatura de eluição) no processo.

Na etapa de eluição realizada na menor temperatura estudada, 22°C , obteve-se o maior valor recuperação da alfa-lactalbumina igual a 9,3% indicando que nessas condições ocorreu um favorecimento da eluição da proteína.

Independente das condições em que foram realizados os processos cromatográficos neste trabalho, a quantidade recuperada da alfa-lactalbumina foi baixa. No entanto devem ser ressaltadas duas importantes questões. A primeira é que todo o processo para obtenção dessa proteína foi realizado em apenas um ciclo de adsorção. A segunda é que as perdas na etapa de lavagem foram bastante elevadas, como pode ser observado nos balanços de massa apresentados no Apêndice II.

Veredas (2000) obteve recuperação de alfa-lactalbumina em leite expandido de até 16,26%, no entanto o soro do leite utilizado foi submetido a uma etapa de ultrafiltração antes do processo de adsorção na resina hidrofóbica.

Um aumento na interação das proteínas presentes no soro do leite bovino com a resina hidrofóbica poderia diminuir as perdas de proteínas no processo de lavagem. A adição de sais, em meio protéico, aumenta a retenção e a seletividade da proteína sobre ligantes hidrofóbicos, devido a esses compostos aumentarem a tensão superficial da água favorecendo a exposição dos aminoácidos apolares presentes na proteína. Veredas (2000) estudou a influência da adição do sulfato de amônio sobre a adsorção de proteína e concluiu que não ocorreu efeito significativo na capacidade de adsorção das proteínas totais contidas no concentrado de soro de leite. Porém não foi observado no trabalho a adsorção seletiva da proteína alfa-lactalbumina, segunda proteína com maior número de resíduos hidrofóbicos presentes no soro do leite e, que adsorve mais do que a beta-lactoglobulina, como mostram as isotermas de equilíbrio da co-adsorção e do soro do leite bovino. Para diminuir a interação da alfa-lactalbumina sobre a resina hidrofóbica na etapa de eluição, além da mudança do EDTA pelo íon Ca^{2+} , pode-se diminuir a temperatura de operação.

Com relação à pureza da alfa-lactalbumina, conclui-se que a temperatura está intrinsecamente relacionada com a seletividade do adsorvente em adsorver a proteína. A Figura 4.19 apresenta um eletroforetograma mostrando um perfil de pureza, referente à alfa-lactalbumina, obtido neste trabalho. O resultado da eletroforese mostra uma proteína pura com massa molecular de 14,4 kDa obtida

nos G_{exp} de 2,25 e 2,75 e temperaturas de 34 e 32 °C confirmando ser essa proteína a alfa-lactalbumina.

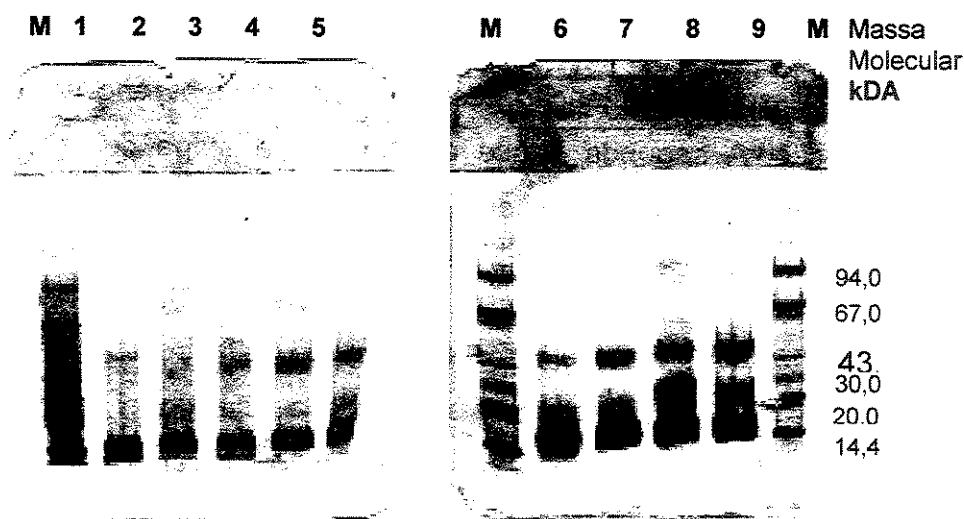


Figura 4.19- Eletroforese SDS-PAGE, em gel gradiente 8-15%, das frações eluídas do soro do leite bovino, sob condições redutoras. M-marcadores de baixa massa molecular. 1 e 2- α -La Pz = 100 %, 3- α -La Pz = 85 %, 4- α -La Pz = 84,44 %; 5- α -La Pz = 82,79 %; 6- α - La Pz =82 %; 7- α - La Pz = 79 %; 8- α -La Pz = 77,44 %; 9- α - La Pz = 71%.

A confirmação do resultado da eletroforese é mostrada através da focalização isoeétrica realizada com a fração de eluição com grau de pureza de 100% acima mencionada e apresentada na Figura 4.20.

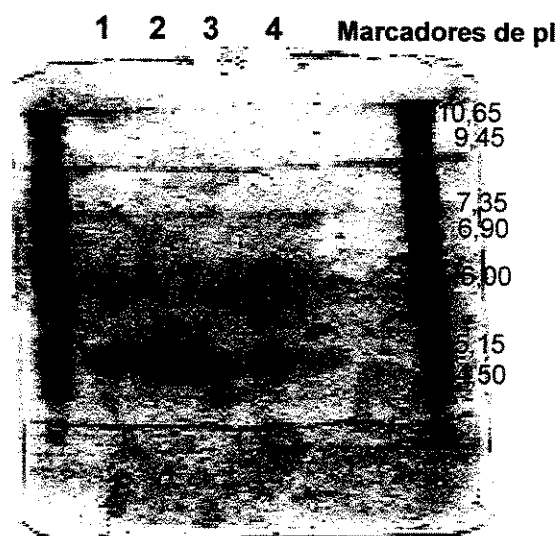


Figura 4.20- Focalização isoeétrica da α -Lg :1 e 2- α -Lg padrão Sigma; 3- α -Lg obtida nas condições de adsorção $G_{exp}=2,25$ e $T= 34$ °C; 4- α -Lg nas condições de adsorção $G_{exp}=2,75$ e $T= 32$ °C.

Veredas (2000), trabalhando com concentrado do soro do leite bovino encontrou um fator de purificação para alfa-lactalbumina de 5,26 para uma quantidade inicial de alfa-lactalbumina presente no concentrado de 15,56%. O fator de purificação encontrado neste trabalho variou de 2,70 a 4,75, como mostrado na Tabela 4.12, para uma concentração média de alfa-lactalbumina no soro *in natura* de 22,23%. É relevante apresentar que nas condições em que foram obtidas purezas de 100% os fatores de purificação estão aproximadamente 5 vezes o valor inicialmente encontrado da alfa-lactalbumina no soro do leite bovino que é em torno de 20%.

A Figura 4.21 apresenta os cromatogramas obtidos em HPLC da amostra do soro de leite *in natura* e das amostras obtidas nas etapas de lavagem e eluição. A alfa-lactalbumina apresenta, nas condições de eluição utilizadas nas análises, um tempo de retenção médio de 17,5 min.

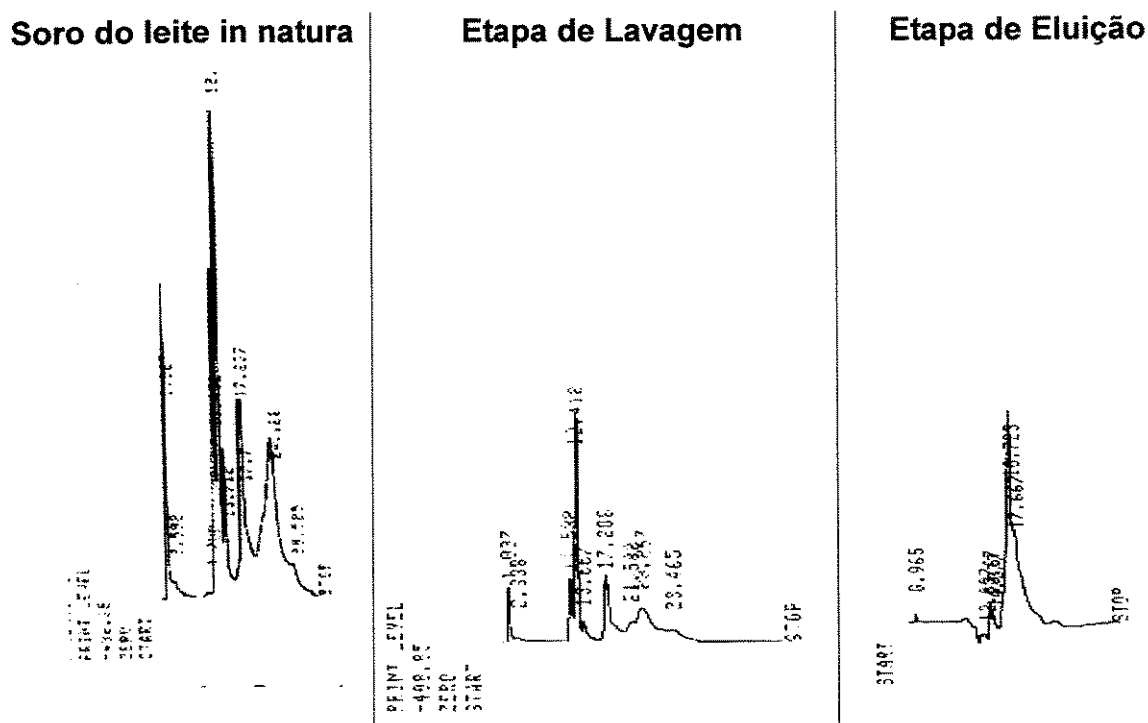


Figura 4.21 – Cromatogramas obtidos em HPLC após análise da alfa-lactalbumina contida no soro *in natura*, na etapa de lavagem e na etapa de eluição respectivamente.

4.6. Otimização do Processo de Adsorção do Soro do Leite Bovino

Os experimentos realizados para se obter a alfa-lactalbumina, o mais pura possível, foram realizados através de planejamentos experimentais fatoriais que permitem avaliar todas as combinações possíveis das variáveis a serem estudadas, realizando um menor número de experimentos. Através da análise desses planejamentos é possível obter modelos estatísticos.

As variáveis independentes analisadas foram a altura do leito sedimentado, a temperatura e grau de expansão, e as dependentes ou respostas, foram pureza, recuperação, eficiência da coluna de adsorção em adsorver todas as proteínas do soro, e parâmetros relacionadas a fluidodinâmica do leito (Pe , N e ϕ).

Foram realizados dois planejamentos fatoriais: um primeiro planejamento fatorial completo linear e um segundo planejamento fatorial completo com pontos axiais, ou seja, quadrático. A realização desse segundo planejamento surgiu após a análise estatística do primeiro planejamento, indicando a necessidade de ampliação na faixa de estudo das variáveis independentes, bem como, da ampliação do próprio modelo.

4.6.1 Resultado e Análise do Planejamento Fatorial Completo Linear

Neste primeiro planejamento foram analisadas as influências da H_0 , T e G_{exp} apenas sobre a pureza da alfa-lactalbumina. A matriz deste planejamento é mostrada na Tabela 4.13. Os valores decodificados de cada nível são apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.13- Planejamento experimental fatorial completo para a avaliação da pureza da alfa-lactalbumina obtida a partir do soro de leite “in natura”.

Ensaio	Altura do Leito (cm)	Temperatura °C	Grau de Expansão	Pureza %
1	-1	-1	-1	51
2	+1	-1	-1	60
3	-1	+1	-1	54
4	+1	+1	-1	72
5	-1	-1	+1	77
6	+1	-1	+1	61
7	-1	+1	+1	83
8	+1	+1	+1	75
9	0	0	0	55
10	0	0	0	56
11	0	0	0	55

Tabela 4.14- Valores utilizados no planejamento fatorial linear

Nível	-1	0	+1
H ₀ (cm)	15	17,5	20
T (°C)	25	27,5	30
G _{exp}	1,5	1,75	2,0

A escolha da altura do leito sedimentado de 15 cm para o nível -1 foi baseada em dados reportado na literatura Chase (1994). O nível +1 foi fixado em 20 cm por que a partir dessa altura, nos graus de expansão estudados nestes primeiros experimentos, 1,50 e 2,00, acreditava-se que a altura final atingida pelo leite seria suficiente para fornecer um número de estágios de equilíbrio satisfatório para separação da alfa-lactalbumina das demais proteínas. Os níveis escolhidos para a temperatura basearam-se na necessidade de avaliar a interação hidrofóbica da proteína com a resina na temperatura ambiente e observar o efeito gradativo do aumento da temperatura na pureza da proteína.

Pode-se observar através da Tabela 4.13 que no experimento do ensaio 1, realizado na combinação do planejamento experimental no nível -1, para todas as

variáveis estudadas, a pureza da alfa-lactalbumina foi a de menor valor e igual a 51%.

No experimento do ensaio 7, foi obtido o maior valor de pureza neste planejamento, 83%. As combinações das variáveis apontam para o nível +1 para a temperatura e o grau de expansão e -1 para a variável altura do leito sedimentado. Comparando o ensaio 1 com o 7, conclui-se que a altura do leito sedimentado, na faixa aqui estudada, não influencia na pureza da proteína alfa-lactalbumina. O aumento da temperatura e do grau de expansão provoca o aumento da pureza. A confirmação desses efeitos e o seu grau de influência são mostrados na Tabela 4.15.

A Tabela 4.15 apresenta um resumo dos efeitos principais e interações das variáveis independentes, altura do leito sedimentado, temperatura e grau de expansão sobre a variável resposta pureza da alfa-lactalbumina para um modelo completo de primeira ordem. Os blocos de cor cinza pertencem as variáveis que apresentaram significância estatística em nível de 95% de confiança.

Tabela 4.15- Efeitos principais e interações sobre a pureza da alfa-lactalbumina

Fatores	Efeitos
Média	63,76
H ₀	0,596
T	2,596
G _{exp}	14,746
H ₀ vs T	-1,896
H ₀ vs G _{exp}	-12,446
T vs G _{exp}	6,966
H ₀ vs T vs G _{exp}	5,746

Pode-se confirmar que a altura e o grau de expansão, na faixa estudada, influenciam positivamente sobre a pureza da alfa-lactalbumina, tendo o grau de expansão efeito nas interações hidrofóbicas entre a proteína de interesse e a resina, nos ensaios realizados na coluna.

Através da análise da eletroforese apresentada na Figura 4.22, percebe-se que na etapa de lavagem há eliminação de todas as proteínas, inclusive da alfa-lactalbumina e da beta-lactoglobulina. A eletroforese da etapa de eluição foi realizada com uma amostra coletada nas condições em que foram realizados os experimentos do ensaio 7, observa-se, portanto, predominantemente a presença da alfa-lactalbumina e da beta-lactoglobulina. A ligação dessa última proteína era esperada uma vez que a mesma é a proteína do leite bovino que está presente em maior quantidade no soro do leite e que possui a maior quantidade de sítios hidrofóbicos.

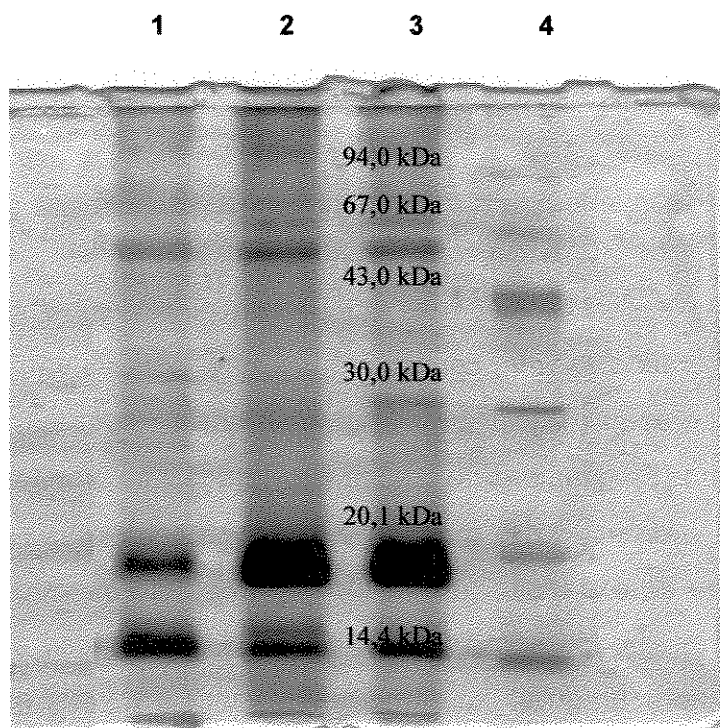


Figura 4.22- Eletroforetograma das frações de soro de leite bovino na resina Streamline Phenyl. 1- Fração da etapa de eluição do ensaio 7. 2- Fração da etapa de lavagem do ensaio 3- Fração de alimentação do soro de leite bovino 4- Marcadores de baixa massa molecular.

A percentagem de variação explicada (R^2) para este planejamento foi de 77%. Essa variação é um parâmetro estatístico importante para ser analisado no planejamento fatorial quando se busca a obtenção de um modelo experimental. Esse parâmetro compara a variância dos pontos experimentais em relação ao

modelo proposto, que neste planejamento é o linear de primeira ordem, com a variância da própria população de pontos experimentais.

O valor de R^2 de 77% é considerado um valor baixo, mesmo para processos biológicos, onde são aceitáveis valores em torno de 85%. Apesar do não ajuste ao modelo experimental, a relevância das respostas dos experimentos foi importante, por ter confirmado a consideração de que a proteína beta-lactoglobulina adsorve conjuntamente com a alfa-lactalbumina. A partir dessa confirmação foi realizado um planejamento fatorial quadrático ampliando a faixa de investigação das variáveis independentes, principalmente a temperatura, e que a altura do leito sedimentado foi a variável eliminada para estudo no planejamento quadrático, uma vez que no nível de confiança estatística (95%), em que as outras variáveis foram avaliadas, ela não apresentou efeito significativo.

4.6.2 Análise do Planejamento Fatorial Completo Quadrático

Os ensaios experimentais realizados para o planejamento experimental fatorial 2^2 + configuração estrela, com o soro do leite, para as variáveis respostas pureza (Pz), recuperação (Rc), eficiência da coluna em adsorver as proteínas do soro de leite bovino (Ef), número de Peclet (Pe), fração de camada dinâmica (ϕ), unidades de transferência de massa (N), em função das duas variáveis temperatura e grau de expansão, mantendo-se constante os valores $T = 28^\circ\text{C}$ e $G_{\text{exp}} = 2,25$ são apresentados pela matriz da Tabela 4.16. Como a altura do leito sedimentado não apresentou efeito significativo sobre a pureza essa variável foi eliminada neste planejamento. Os valores decodificados de cada nível utilizado são apresentados na Tabela 4.17.

Tabela 4.16- Planejamento experimental fatorial completo quadrático para pureza e recuperação da alfa-lactalbumina a partir do soro de leite *in natura* .

Ensaio	T (°C)	G _{exp}	Pz (%)	Rc (%)	Ef (%)	Pe	φ	N
1	-1	-1	71	9,0	76	12	85	0,01
2	+1	-1	82	7,8	79	35	87	0,11
3	-1	+1	83	8,0	78	41	87	0,11
4	+1	+1	100	7,4	92	50	97	0,00
5	-1,41	0	77	9,3	75	35	82	0,11
6	0	+1,41	84	8,2	84	37	97	0,00
7	+1,41	0	100	7,7	91	57	97	0,00
8	0	-1,41	79	8,0	68	9	87	0,13
9	0	0	85	7,7	90	48	95	0,00
10	0	0	82	7,5	88	46	93	0,01
11	0	0	85	7,8	87	47	96	0,03

Tabela 4.17- Valores decodificados de cada nível usados no planejamento experimental.

Nível	-1,41	-1	0	+1	+1,41
T (°C)	22	24	28	32	34
G _{exp}	1,5	1,71	2,25	2,75	3,00

Para o ajuste do modelo de segunda ordem utilizou-se o programa *STATISTICA*, versão 6,0, para realizar as regressões, que gerou os modelos codificados, com os parâmetros estatisticamente significativos de 1ª ordem, 2ª ordem e, com as duas interações das variáveis temperatura e grau de expansão.

4.6.3 Análise dos Efeitos

A Tabela 4.18 apresenta o resumo dos efeitos da temperatura e do grau de expansão sobre as variáveis respostas para o modelo quadrático com nível de confiança de 95%. Os blocos de cor cinza são os valores que apresentaram significância estatística.

Tabela 4.18- Efeitos principais e interações sobre a pureza e recuperação da alfa-lactalbumina

Efeitos estimados						
Fatores	Pz (%)	Rc (%)	Ef (%)	Pe	ϕ	N
Média	84,00	7,68	88,33	47,00	94,67	0,013
T (L)	15,05	-1,10	9,90	15,87	8,30	-0,084
T (Q)	4,03	0,72	-4,40	-1,00	-6,01	0,061
G _{exp} (L)	9,59	-0,35	9,40	20,00	6,53	-0,091
G _{exp} (Q)	-2,73	0,35	-11,45	-24,00	-1,77	0,071
T (L) vs G _{exp} (L)	3,10	0,51	5,50	-7,00	4,00	-0,02

L (linear), Q (quadrático)

Na Tabela 4.18, observando-se os efeitos globais da variável temperatura e grau de expansão no processo de adsorção e conseqüentemente sobre a pureza da alfa-lactalbumina, pode-se concluir que os mesmos foram positivos e maior para a temperatura. Essa comprovação através da análise estatística dos dados confirma o que anteriormente havia sido discutido, no item 4.5.1, com base no comportamento físico do processo, ou seja, a temperatura aumenta as interações hidrofóbicas da proteína alfa-lactalbumina com o adsorvente sólido usado nesse trabalho. A temperatura aumenta em média 15% a pureza da alfa-lactalbumina enquanto o grau de expansão aumenta em 9,59%. Apesar do G_{exp} apresentar o valor do efeito menor do que a temperatura, o fato de ser positivo só vem confirmar que é necessário o aumento da porosidade do leito para que o processo de adsorção em leito expandido seja eficaz.

Analizando a recuperação da alfa-lactalbumina no processo de adsorção, observa-se através do ensaio 1 e da comparação com o ensaio 4, que diminuindo a temperatura e o grau de expansão, há um aumento na recuperação da alfa-lactalbumina, ou que, o aumento da temperatura e do grau de expansão diminuem a recuperação. Os efeitos da temperatura e do grau de expansão sobre a variável resposta recuperação são negativos, como pode ser observado na Tabela 4.18. A temperatura apresenta em valor absoluto efeito maior do que o grau de expansão.

A contribuição para a diminuição em média da recuperação desta proteína foi de apenas 1,1 % e 0,35% para a temperatura e o grau de expansão respectivamente. Os baixos valores percentuais desses efeitos são coerentes com os valores obtidos experimentalmente, uma vez que, o menor valor obtido para a variável resposta (7,4; ensaio 4) é aproximadamente 80% do encontrado para o maior valor de recuperação (9,3; ensaio 5). Independente da questão matemática é a temperatura a variável, das que foram estudadas nesse trabalho, a que mais interfere na recuperação da alfa-lactalbumina, o aumento da temperatura dificulta a eluição dessa proteína.

Os efeitos das variáveis independentes sobre a eficiência da coluna em adsorver todas as proteínas do soro de leite bovino foram positivos e apresentam praticamente os mesmos valores; indicando que tanto a temperatura quanto grau de expansão aumentam a eficiência da adsorção das proteínas na resina hidrofóbica. Deve-se observar que a consequência desses efeitos positivos sobre a adsorção das proteínas do soro do leite bovino reflete-se em um aumento da pureza da alfa-lactalbumina.

Os efeitos estimados relacionados com as respostas dos parâmetros obtidos através da aplicação do modelo PDF apresentam para o número de Pe e ϕ valores positivos, ou seja, o aumento da temperatura e do grau de expansão diminuem a dispersão axial dentro da coluna e a formação de camada estagnada frente à camada dinâmica. Esses comportamentos confirmam os efeitos negativos produzidos pela temperatura e grau de expansão com relação ao parâmetro N , ou seja, se as variáveis independentes diminuem a formação da camada estagnada um maior coeficiente global de transferência de massa é obtido, fazendo com que o valor de N seja diminuído. É interessante observar que o grau de expansão contribui bem mais do que a temperatura para o aumento do número de Pe , já o aumento do parâmetro ϕ é influenciado mais pela temperatura.

Analisando globalmente todas as variáveis respostas pode-se afirmar que a T e o G_{exp} aumentam a pureza da alfa-lactalbumina porque as mesmas

influenciam tanto as interações hidrofóbicas das proteínas do soro do leite bovino quanto a fluidodinâmica do leito, sendo esse comportamento confirmado por um aumento da eficiência da coluna em adsorver todas as proteínas do soro do leite bovino, um alto valor de Pe (para leito expandido) e φ em decorrência da ausência de camada estagnada apesar da complexidade da matéria-prima.

4.6.4 Análise da Regressão dos Modelos Estatísticos

As Equações 4.1 a 4.6 correspondem aos modelos estatísticos codificados para todas as variáveis respostas analisadas. As variáveis independentes destacadas em negrito são as estatisticamente significativas.

$$Pz (\%) = 84,0 + 7,51 T + 4,68 G_{exp} + 2,04 T^2 - 1,46 G_{exp}^2 + 1,55 G_{exp} T \quad (4.1)$$

$$Rc(\%) = 7,7 - 0,55T - 0,17G_{exp} + 0,36T^2 + 0,17G_{exp}^2 + 0,25 T. G_{exp} \quad (4.2)$$

$$Ef (\%) = 88,3 + 4,95 T + 4,70 G_{exp} - 2,23 T^2 - 5,73 G_{exp}^2 + 2,75 T. G_{exp} \quad (4.3)$$

$$Pe = 47,0 + 7,88 T + 10,40 G_{exp} - 0,5 T^2 - 12,00 G_{exp}^2 - 3,50 T.G_{exp} \quad (4.4)$$

$$N = 0,013 - 0,04 T - 0,04 G_{exp} + 0,03 T^2 + 0,04.G_{exp}^2 - 0,01 T.G_{exp} \quad (4.5)$$

$$\varphi = 94,7 + 4,15 T + 3,27. G_{exp} - 3,02 T^2 - 1,77 G_{exp}^2 + 2,00 T.G_{exp} \quad (4.6)$$

A Tabela 4.19 apresenta a percentagem de variação explicada (qualidade do ajuste) e os coeficientes de regressão para as combinações das variáveis estudadas deste planejamento. A significância estatística para os modelos representados nas Equações 4.1 a 4.6, cujos resultados são apresentados nas Tabelas III.1, III.2, III.3, III.4, III.5 e III.6 (ANOVA) do Apêndice III, foi determinada pela análise da variância.

Tabela 4.19- Resultado da análise da regressão para a pureza e recuperação da alfa-lactalbumina

Variável Resposta	Qualidade do Ajuste (%)	Coeficiente de Correlação	Teste F (Regressão)		
			F_{calc} MQ_R/MQ_r	F_{tab} (95%)	F_{calc}/F_{tab}
Pz	90,05	95,13	9,5	5,05	1,90
Rc	87,10	93,33	6,73	5,05	1,33
Ef	96,40	98,18	26,83	5,05	5,31
Pe	99,80	99,89	506,7	5,05	100,00
φ	98,54	99,27	10,9	5,05	2,15
N	91,60	95,71	14,2	5,05	2,81

Os modelos estatísticos para pureza e recuperação da alfa-lactalbumina apresentam coeficientes de correlação de 0,9513 e 0,9333, respectivamente, indicando um bom ajuste dos dados experimentais aos preditos pela correlação. Os modelos apresentam uma percentagem de variação explicada pela regressão de 90,05% e 87,10%, ou seja, para a pureza da alfa-lactalbumina 90,05% da variação total em torno da média é explicada pela regressão para um valor máximo explicável de 99,20% e para a recuperação 87,10% da variação total em torno da média é explicada para uma variação máxima explicável de 99,41%.

O modelo estatístico para a eficiência da coluna em adsorver todas as proteínas do soro do leite bovino apresenta um coeficiente de correlação de 0,9818 indicando um ótimo ajuste dos dados experimentais aos preditos pelo modelo. A variação máxima explicável foi de 99,24% para essa variável resposta. As Figuras 4.23, 4.24 e 4.25 apresentam os pontos experimentais em boa concordância com os pontos previstos pelo modelo.

O teste F obtido pela regressão para verificar se as equações do modelo 4.1, 4.2 e 4.3 são estatisticamente significativa e útil para fins preditivos, apresentaram os seguintes valores: para a pureza e recuperação da alfa-lactalbumina a relação entre F_{calc} em função do F_{tab} é 1,90 e 1,33 vezes,

respectivamente, indicando que para essas duas variáveis respostas o modelo é estatisticamente significativo; para a variável eficiência o F_{cal} é 5,30 vezes o F_{tab} , podendo-se afirmar que o modelo é estatisticamente significativo e preditivo segundo Box et al. (1978).

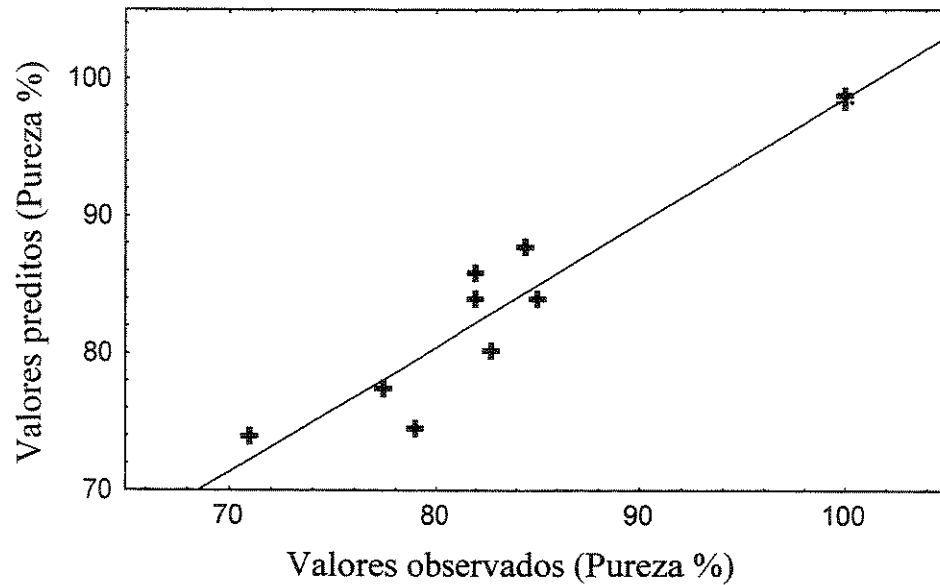


Figura 4.23 - Valores observados versus valores preditos para pureza da alfa-lactalbumina.

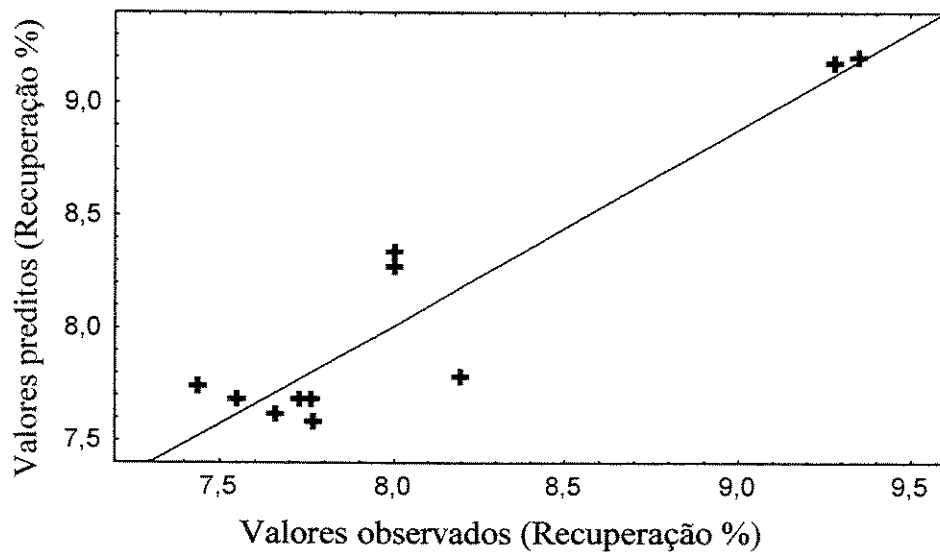


Figura 4.24 - Valores observados versus valores preditos para recuperação da alfa-lactalbumina.

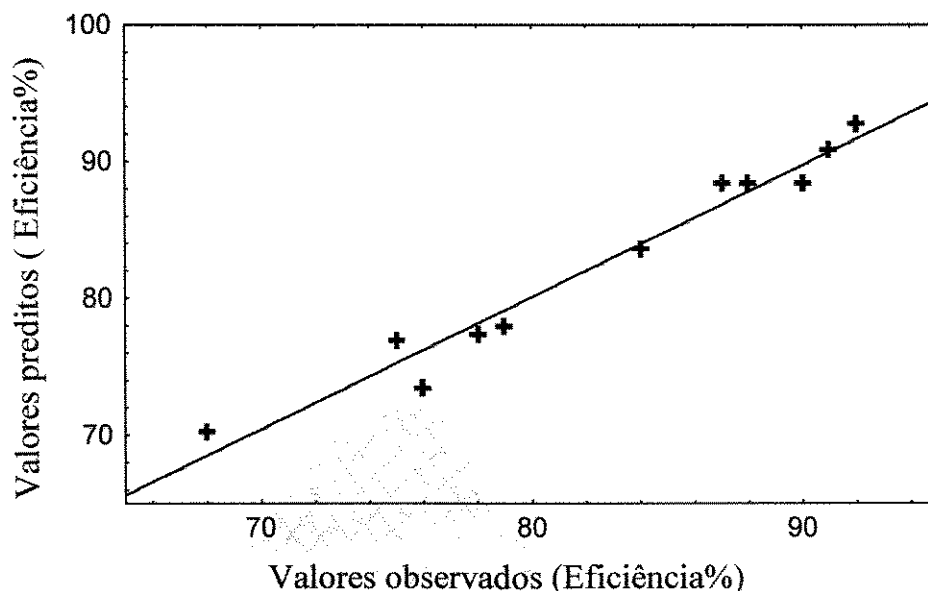
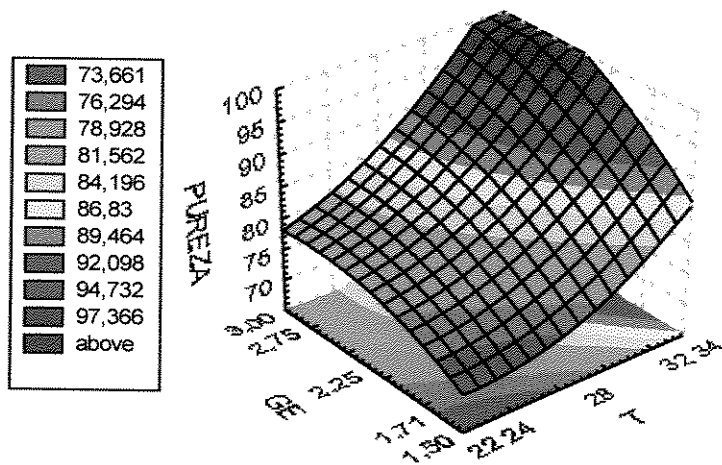


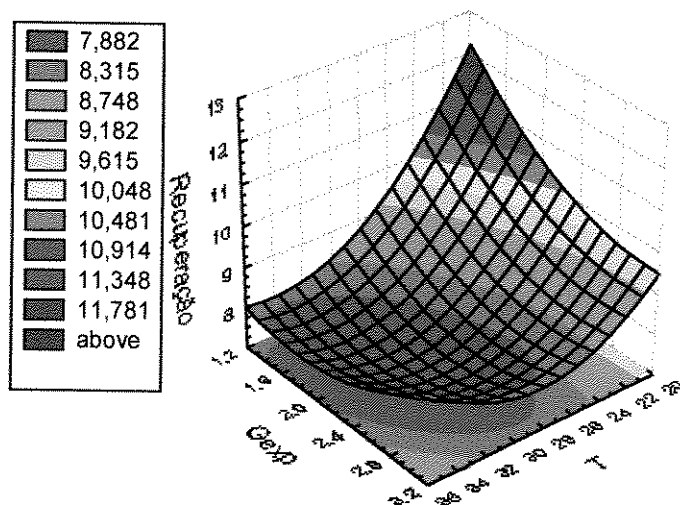
Figura 4.25 - Valores observados versus valores preditos para eficiência da coluna em adsorver todas as proteínas do soro do leite bovino.

A Figura 4.26 apresenta as superfícies de resposta para a pureza, recuperação e eficiência da coluna, e foram construídas para todas as combinações das variáveis. A superfície de resposta mostrada na Figura 4.26(a) revela que em valores de temperatura abaixo do ponto central e em graus de expansão menor do que 2,00 concentram-se os menores valores de pureza. Nesta faixa de temperatura para graus de expansão acima de 2,00 há um moderado aumento de pureza. A partir do ponto central há um aumento na inclinação da superfície de resposta. É nessa região da superfície onde encontram-se os maiores valores de pureza. O aumento dessa inclinação é mais acentuado devido a variação da temperatura do que do grau de expansão. O comportamento da recuperação da alfa-lactalbumina frente às variações de temperatura e grau de expansão, observado através do gráfico de superfície mostrado na Figura 4.26 (b), revela que a partir do ponto central seguindo na diagonal no sentido dos menores valores da temperatura e do grau de expansão, a superfície de resposta é bastante inclinada apontando para a região de maiores valores de recuperação da proteína. No entanto o universo em que se pode variar a temperatura e o grau de expansão para obter valores acima de 10% de recuperação é bastante limitado. Essa limitação é maior para a temperatura do que para o grau de expansão. A

superfície de resposta para a eficiência da coluna em adsorver todas as proteínas do soro do leite bovino, apresentado na Figura 4.26(c), mostra que para alcançar elevadas eficiências deve-se aumentar o grau de expansão e a temperatura. A partir do ponto central, $T=28^{\circ}\text{C}$ e $G_{\text{exp}} = 2,25$, são obtidas eficiências acima de 88%.



(a)



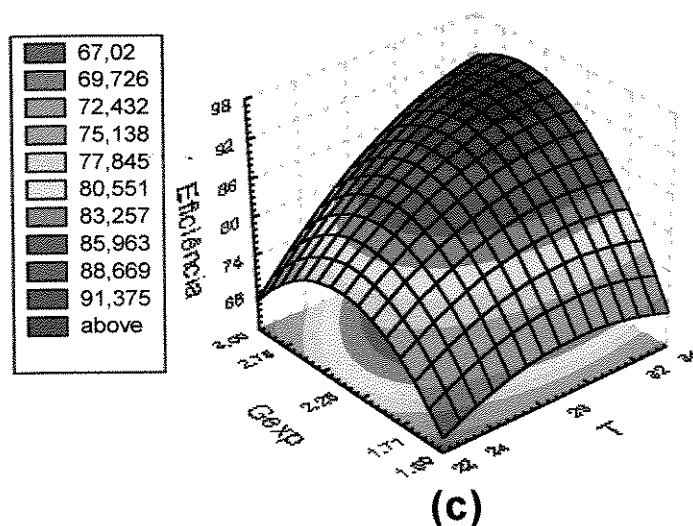


Figura 4.26 - Superfícies de respostas para as variáveis pureza (a), recuperação (b) e eficiência (c).

Os modelos estatísticos para os parâmetros obtidos através do modelo PDE, Pe , ϕ e N apresentam coeficientes de correlação 0,9988, 0,9927 e 0,9571, respectivamente, indicando um ótimo ajuste dos dados experimentais, para as variáveis Pe e ϕ e um bom ajuste para a variável N , aos preditos pela correlação. Os modelos estatísticos dessas variáveis, apresentados nas Equações 4.4 a 4.6, possuem uma percentagem de variação explicada pela regressão de 99,80, 98,50 e 91,60 para Pe , ϕ e N , respectivamente, ou seja, para o número de Pe 99,88% da variação total em torno da média é explicada pela regressão para um valor máximo explicável de 99,80%, para ϕ 99,27% da variação total em torno da média é explicada para uma variação máxima explicável de 91,60%. As Figuras 4.27, 4.29 e 4.30 apresentam os pontos experimentais em boa concordância com os pontos previstos pelo modelo. O teste F obtido pela regressão para verificar se a equação do modelo 4.4, 4.5 e 4.6 é estatisticamente significativa e útil para fins preditivos, apresentaram os seguintes valores: para o número de Pe o F_{cal} em relação ao F_{tab} é 100 indicando que para essa variável resposta o modelo é estatisticamente significativo e altamente preditivo; para a variável ϕ o F_{cal} é 2,15 vezes o F_{tab} , podendo-se afirmar que o modelo é estatisticamente significativo,

para o parâmetro N o F_{cal} é 2,81 vezes o F_{tab} , sendo, portanto, considerado estatisticamente significativo.

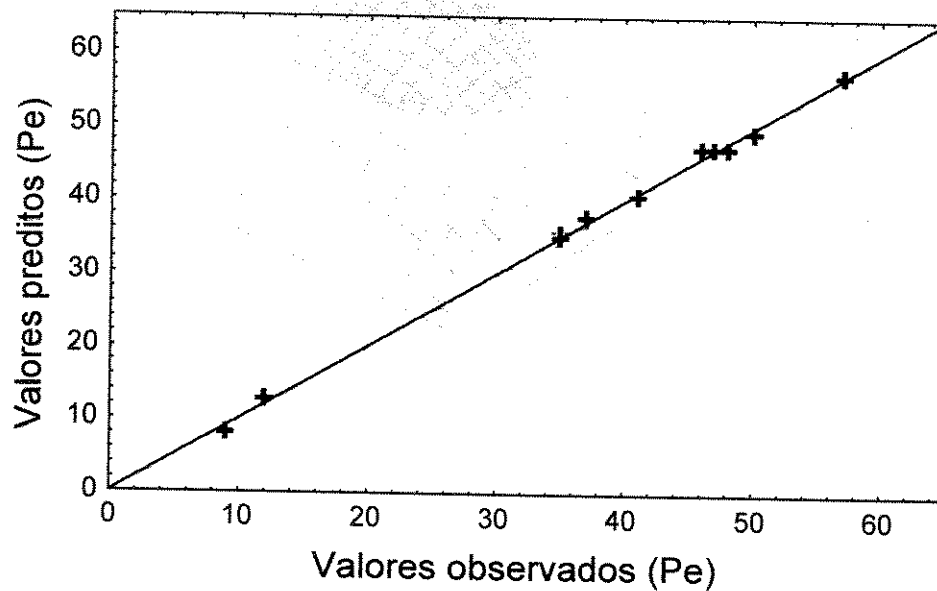


Figura 4.27 - Valores observados versus valores preditos para o número de Pe.

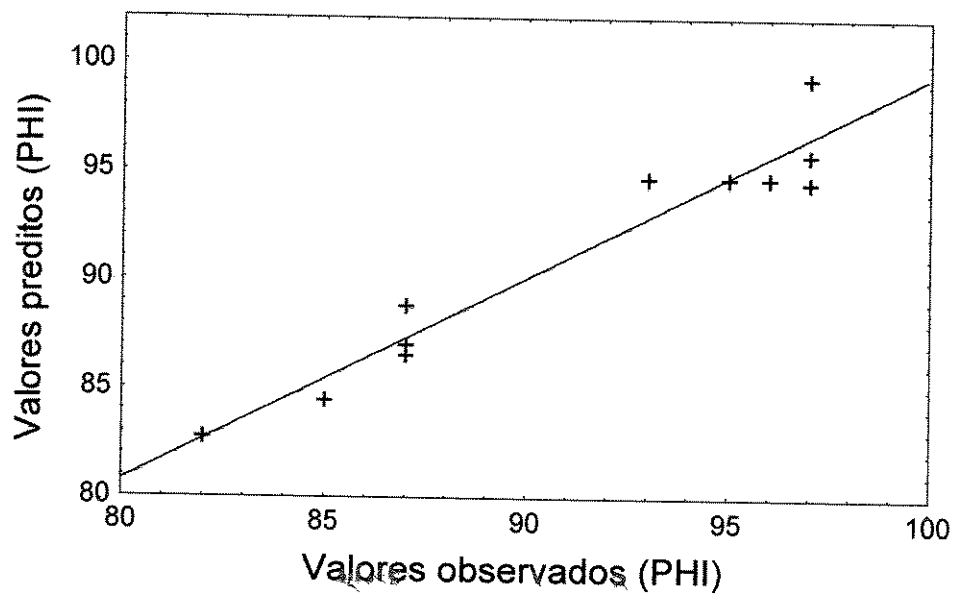


Figura 4.28- Valores observados versus valores preditos para o parâmetro ϕ .

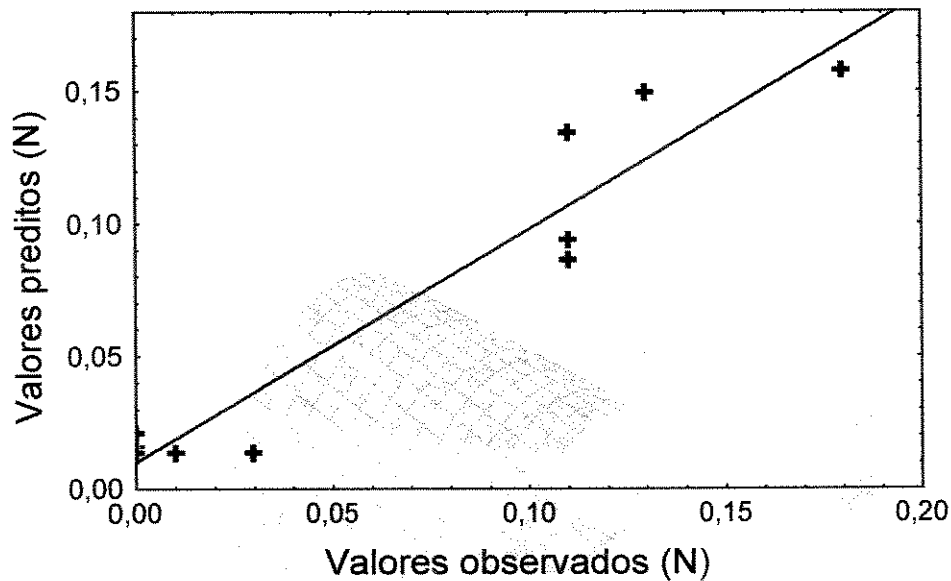
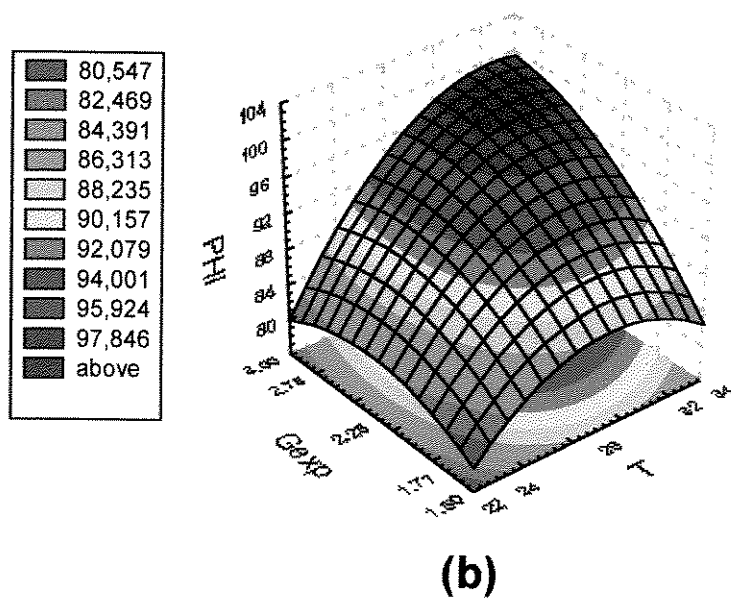
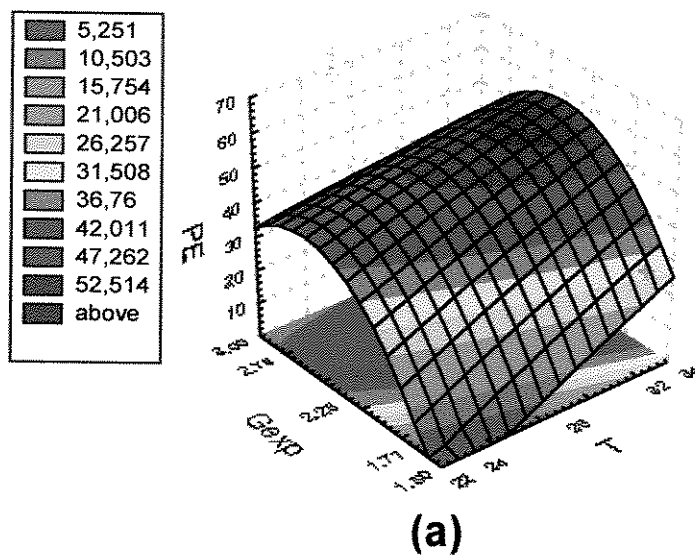


Figura 4.29 - Valores observados versus valores preditos para o parâmetro N.

As superfícies de respostas obtidas para os parâmetros Pe , φ e N são apresentadas na Figura 4.30. A Figura 4.30(a) mostra que serão obtidos valores de Pe acima de 40, ou seja, a coluna operando com baixa dispersão axial, quando a temperatura e o grau de expansão forem fixados em valores acima do ponto central. O modelo estatístico encontrado para esse parâmetro é altamente preditivo. A Figura 4.30(b) mostra que a faixa de temperatura e grau de expansão em que se deve operar a coluna de leito expandido, sem que haja comprometimento da fluidização do leito, representado numericamente φ , é a mesma obtida para o número de Pe , demonstrando uma perfeita concordância física com o que ocorreu com o processo e os dados experimentais obtidos, ou seja, uma baixa dispersão axial é um pré-requisito para que a fluidização estável do leito seja garantida. Observa-se através da Figura 4.30(c) que foram obtidos valores de N aproximadamente igual a zero, evitando com isso possíveis formação de camadas estagnadas, quando a coluna de leito expandido foi operada em temperaturas e graus de expansão acima do ponto central.



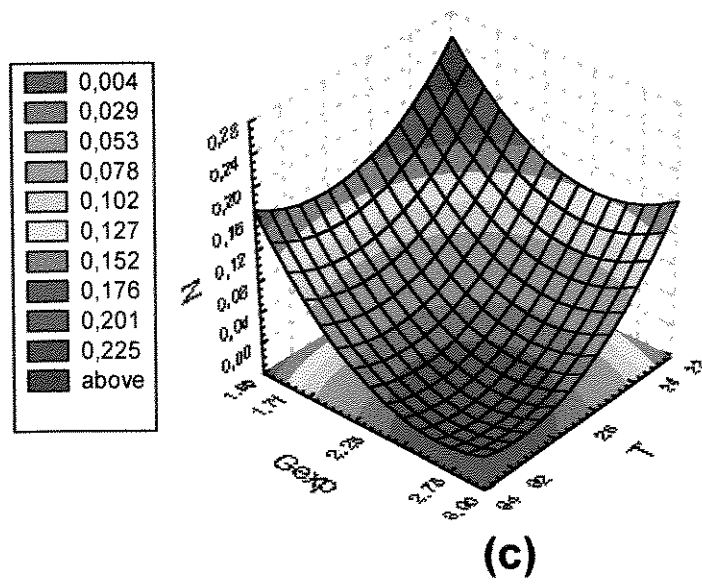


Figura 4.30 - Superfície de resposta para o número de Pe (a) e os parâmetros ϕ (b) e N (c).

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi estudar o comportamento da adsorção do soro do leite bovino e a purificação da alfa-lactalbumina em resina hidrofóbica em leito expandido, explorando a capacidade dessa proteína ligar-se a metais. Para alcançá-lo foi necessário investigar a influência de parâmetros químicos e físicos que interferem na adsorção e na fluidização do leito de resina. Primeiramente foram definidas as condições químicas a serem fixadas para o estudo da adsorção da alfa-lactalbumina, e em seguida as condições físicas que intrinsecamente afetariam a fluidização, como altura, temperatura e grau de expansão do leito.

Investigando o comportamento da adsorção em leito expandido avaliando-se os efeitos multivariáveis (temperatura e grau de expansão), usando como ferramenta um planejamento experimental, ficou evidente que a influência conjunta das mesmas sobre a adsorção de proteínas é de fundamental importância, uma vez que, os resultados encontrados, no que diz respeito ao efeito da velocidade linear, são divergentes quando confrontados com os da literatura. Ressalta-se que não foram encontrados resultados sobre o efeito dessas variáveis na adsorção de proteínas que não tenham sido realizados de forma univariável. Nesse trabalho, os resultados encontrados mostram que o aumento da velocidade linear e, conseqüentemente, o grau de expansão associado com o aumento da temperatura, aumentam a eficiência da coluna em adsorver as proteínas do soro de leite bovino, imprimindo uma fluidodinâmica estável, sob o ponto de vista do leito expandido, com números de Pe de aproximadamente 50, indicando um comportamento ideal da coluna devido ao baixo grau de mistura. Os efeitos positivos dessas duas variáveis implicaram no não comprometimento da fluidização do leito, representado numericamente por

valores de ϕ de aproximadamente igual a 1,0, provavelmente, devido aos constituintes da matéria-prima não terem interagido fortemente com o adsorvente a ponto de gerar uma camada estagnada e conseqüentemente resistência à transferência de massa, na faixa operacional em que foram realizados os experimentos. Esse último comportamento, fisicamente é confirmado através dos efeitos negativos, observados através das análises estatísticas dos dados que a temperatura e o grau de expansão apresentam sobre o parâmetro N, ou seja, um abaixamento da temperatura e do grau de expansão implica em uma diminuição da interação dos constituintes da matéria-prima com o adsorvente. Em valores absolutos N é aproximada igual a zero para todas as situações estudadas.

Deve-se ressaltar que para baixas temperaturas e baixos graus de expansão visualmente percebe-se que há diminuição da altura do leito expandido provocada provavelmente pela formação de aglomerados na resina.

Através dos ensaios de equilíbrio realizados em tanques agitados observou-se que a beta-lactoglobulina apresenta maior capacidade de adsorção do que a alfa-lactalbumina quando a adsorção das proteínas é realizada em separado nas duas temperaturas estudadas (25 e 30 °C). Os dados experimentais são bem ajustados pelo modelo de Langmuir. Quando a adsorção dessas proteínas foi realizada conjuntamente na temperatura de 25 °C, a capacidade adsorptiva das duas é a mesma, no entanto, na temperatura de 30 e 34 °C provavelmente ocorre competitividade entre as mesmas pelo adsorvente de forma que houve uma mudança no mecanismo de adsorção, passando a alfa-lactalbumina a adsorver com maior capacidade sobre a resina do que a beta-lactalbumina, inclusive com formação de multicamada. Os ensaios de adsorção (curvas de ruptura) obtidas na coluna com o leito no modo expandido confirmam que há grande perda na etapa de lavagem dessas duas proteínas, porém, a alfa-lactalbumina é a proteína que aparece em maior quantidade na etapa de eluição. O aumento da temperatura e do grau de expansão aumenta a pureza da alfa-lactalbumina. Foi obtido grau de pureza de 100% da alfa-lactalbumina, segundo a técnica de análise adotada, ou seja, HPLC.

A principal conclusão resultante desse trabalho foi que a estratégia adotada para purificação da alfa-lactalbumina é viável principalmente quando explora-se o potencial que o aumento da temperatura propicia ao aumento das interações hidrofóbicas, e que, diante da complexidade da matéria-prima a ser adsorvida, o leito expandido operando em condições otimizadas é indicado para ser usado no processo de adsorção desse produto e que em apenas um ciclo de operação a recuperação da alfa-lactalbumina foi de aproximadamente 9%.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

Os resultados obtidos através das curvas de equilíbrio demonstram que há uma mudança de mecanismo de adsorção quando as proteínas alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina são adsorvidas conjuntamente em diferentes temperaturas. Uma investigação mais avançada, através da ampliação da faixa de temperatura de adsorção estudada, a aplicação de modelos como o de Langmuir para ajustar os dados experimentais de mistura binária, bem como, um estudo cinético com diferentes concentrações iniciais do soro do leite bovino, pode ajudar a entender os fenômenos que estão ocorrendo durante a adsorção dessas proteínas.

Sendo a cromatografia de interações hidrofóbicas o método cromatográfico estrategicamente escolhido para adsorver a proteína alfa-lactalbumina, um aumento na capacidade adsorptiva da mesma sobre a resina deve ser avaliado, de forma que, sugere-se uma otimização na etapa de adsorção na coluna através da utilização de soluções tampões com a presença de sais (aumento da força iônica) de forma que favoreça uma melhor interação dessa proteína com a resina hidrofóbica, visando aumentar a percentagem de recuperação da mesma. Ainda no que diz respeito ao aumento da percentagem de recuperação da alfa-lactalbumina, sugere-se também que seja investigada a possibilidade de realizar o processo de adsorção em mais de um ciclo operacional.

Uma vez que o aumento da temperatura e a ligação do íon cálcio com a proteína fizeram parte da estratégia de adsorção e eluição da alfa-lactalbumina e sabendo-se que esses dois fatores podem modificar a estrutura da alfa-lactalbumina é interessante que seja investigado a possibilidade de mudança estrutural da mesma através de técnicas de caracterização que permita confirmar tal fato como, por exemplo, dicroísmo circular.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- Ascharffernburg, R., Drewry, J. Genetics of the β -Lactoglobulin of Cow's milk. Nature. **180** (1957) 376-378.
- Ascharffernburg, R. Preparation of α -Lactalbumin from Cow's or Goat's Milk: a Method Improving the Yield. Journal. Dairy Science. **51** (1968) 291-296.
- A.O.A.C, Association of Analytical Chemistry, Official Methods of Analysis, 15 th Edition, 1990, Washington, DC.
- Bascoul, A., Benaija, E. H., Berthaud, Y., Torrenti, J. M., Zizi, Z. Movents des Particules Solids en Fluidisation Liquide Solide. The Chemical Engineering Journal. **6** (1993) 1340-1350.
- Barker, C. M., Morr, C. V. Composition and Properties of Spherosil-QMA Whey Protein Concentrate. Journal of Food Science. **51** (1986) 919-923.
- Barnfield-Frej, A-K., Hjorth, R., Hammarström, A. pilot Scale Recovery of Recombinant Annexin V from Unclarified *Escherichia coli* Homogenate Using Expanded Bed Adsorption. Biotechnonology and Biogineering. **44** (1994) 922-929.
- Barros, B., I., S., Scarminio, Bruns, R. E. Como Fazer Experimentos. Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência, Editora Unicamp, Campinas-SP (2001).
- Batt, B. C., Yabannavar, V. M., Singh, V. Expanded Bed Adsorption for Protein Recovery from whole Mammalian Cell Culture Broth. Bioseparation. **5** (1995) 41-52.

- Bertrand-Harb, C., Ivanova, I., V., Dalgalarrrondo, M., Haertllé, T. Evolution of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin Content During Yoghurt Fermentation. International Dairy Journal. **13** (2003) 39-45.
- Blingh, E., G., Dyer, W.,J. A Rapid Method of Total Lipids Extraction, and Purification. Canada Journal Biochemical Physiological. **37** (1959) 911-917.
- Box, G., E., P., Hunter, W., G., Hunter, J., S. Statistics for Experiments. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. John Wiley & Sons (1978).
- Boye, J., I., Alli, I. Thermal Denaturation of Mixtures of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin: A Differential Scanning Calorimetric Study. Food Research International. **33** (2000) 673-682.
- Braumad, C., Aimar, P., Daufin, G. Whey Protein Fractionation: Isoelectric Precipitation of α -Lactalbumin under Gentle Heat Treatment. Biotechnology and Bioengineering. **56** (1997) 391-397.
- Brink, W. The Life Extension Protein: That Fights Disease and Extends Lifespan. Life Extension Report, (1996) 21-28.
- Buijs, J. Wesselingh, J. A. Batch Fluidized Ion-Exchange Column for Streams Containing Suspend Particles. Scientific Publishing Company Amsterdam (1980).
- De Luca, L., Hellenbroich, Titchener-Hooker, N. J., Chase, H. A. A Study of the Expansion Characteristics and Trasient Behavior of Expanded Beds of Adsorbent Particles Suitable for Bioseparations. Bioseparation. **4** ((1994) 311-318.

- Carrere, H. Extraction des Proteines du Lactoserum par Chromatographie D' echange D' ions en Lit Fluidese. Modelisation et Optimisation. Toulouse: L' institut National Polytechnique de Toulouse (1993).
- Chetty, S. A., Burns, M. A. Continuous Proteins Separation in a Magnetically Stabilized Bed Using Nonmagnetic Supports. Biotechnology and Bioengineering. **38** (1991) 963-971.
- Challand, G. S., Rosemeyer, M. A. The Correlations Between the Apparent Molecular Weight and the Enzymic Activity of Lactose Synthetase. FEBS Leett . **47** (1974) 94-99.
- Chang, Y. K., Chase, H., A. Ion Exchange Purification of G6PDH from Unclarified Yeast Cell Homogenates Using Expanded Bed Adsorption. Biotechnology and Bioengineering. **49** (1996) 204-216.
- Chase, H., A. Prediction of the Performance of Preparative Affinity Chromatography. Journal of Chromatography. **297** (1984a) 179-202.
- Chase, H., A. Affinity Separations Utilising Immobilised Monoclonal Antibodies- A New Tool for the Biochemical Engineer. Chemical Enginnering Science. **39** (1984b) 1099-1125.
- Chase, H. A., Draeger, N.M. Affinity Purification of protein Using Expanded Beds. Journal of Chromatography . **597** (1992) 129-145.
- Chase, H. A. Purification of Proteins by Adsorption Chromatography in Expanded Bed. Trends in Biotechnology. **12** (1994) 296-303.
- Conrado, L. S., Veredas, V., Nóbrega, E. S., Santana, C.C. Expanded Bed Milk Whey Proteins. Pôsterapresentado ao Third International Conference on Expanded Bed Adsorption. Garmisch-Partenkirchen, Germany, (2000).

- Cruz, J. M., Santana, C. C. Adsorção e Eluição de Insulina em Leito Fixo e Fluidizado de Resinas Trocadoras de Íons. Anais do ENEMP. Editora Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia (1996) 568-573.
- Fernández-Lahore, H. M., Kleef, R., Kula, M-R, Thömmes, J. The Influence of Complex Biological Feedstock on the Fluidization and Bed Stability in Expanded bed Adsorption. Biotechnology and Bioengineering. **64** (1999) 484-496.
- Fernández-Lahore, H. M., Geilenkirchen, S., Boldt, K., Nagel, A., Kula, M-R, Thömmes, J. The Influence of Cell Interactions on Protein Adsorption in Expanded Bed. Journal of Chromatography A. **873** (2000) 195-208.
- Finette, G. M. S., Mao Q-M, Hearn, T. W. Examination of Protein Adsorption in Fluidized Bed and Packed Bed Columns at Different Temperatures Using Frontal Chromatography Methods. Biothechnology and Bioengineering. **58** (1998) 35-46.
- Foegeding, E. A., Davis, J. P., Doucet, D., McGuffey, M. K. Advances in Modifying and Understanding Whey Protein Functionality. Trends in Food Science & Technology. **13** (2002) 151-159.
- Guiochon, G. Preparative Liquid Chromatography. Journal of Chromatography A. **965** (2002) 129-161.
- Gopal, D., Prince, I., Hearn, M. T. W. High-performance Liquid Chromathography of Amino Acids, Peptides and Proteins. CXXIV. Physical Characterisation of Fluidized-Bed of Chromatographic Packing Materials. Journal Chromatography. **631** (1993) 115-124.

- Haezebrouck, P., Noppe, W., Dael, H. V., Hanssens, I. Hydrophobic Interaction of Lysosyme and α -Lactalbumin from Equine Milk Whey. Biochimica et Biophysica Acta. **1122** (1992) 305-310.
- Hahn, R., Schulz, P. M., Schaupp, C. Jungbauer, A. Bovine Whey Fractionation Based on Cation- Exchange Chromatography. Journal of Chromatography. **795** (1998) 277-287.
- Heine, W. E., Klein, P., D., Reeds, P. J. The Importance of α -Lactalbumin in Infant Nutrition, American Institute of Nutrition. (1990) 277-283.
- Hendrix, T., Griko, Y. V., Privalov, P. L. A Calorimetric Study of the Influence of Calcium on the Stability of Bovine α -Lactalbumin. Biophysical Chemistry. **84** (2000) 27-34.
- Hiraoka, Y., Segawa, T., Kuwajima, K., Sugai, Murai S. N. α -Lactalbumin: a Calcium Metalloprotein. Biochemical and Biophysical Research Comumunications. **95** (1980).
- Hjertén, S. Some General Aspects of Hydrophobic Interaction Chromatography. Journal Chromatography. **87** 325-331.
- Hjorth, R., Kämp, C., S. Analysis of Some Operations Parameters of Novel Adsorbents for Recovery of Proteins in Expanded Bed. Bioseparation. **5** (1995) 217-223.
- Hong, Y-H., Creamer, K. L. Changed Protein Structures of Bovine β -Lactoglobulin B and α -Lactalbumin as a Consequence of Heat Treatment. International Dairy Journal. **12** (2002) 354-359.
- Ikeguchi, M., Kuwajima, K., Sugai, S. Ca-Induced Alteration in the Unfolding Behavior of α -Lactalbumin. Journal Biochemistry. **99** (1986) 1191-1201.

- Imafidon, G. I., Farkye, N. Y., Spanier, A M. Isolation, Purification and Alteration of Some Functional Groups of Major Milk Proteins: a Review. Food Science and Nutrition. **37** (1997) 663-689.
- Jacobucci, H., B., Sgarbieri, V., C., Dias, N., F., G., P., Borges, P., Tanikawa, C. Impact of Different Dietary Protein on Rat Growth, Blood Serum Lipids and Protein and Liver Cholesterol. Nutrition Research. **21** (2001) 905-915.
- James, E. A. The Application of Multicomponent Adsorption Theory to an Ion Exchange Chromatography System for Recovery of Whey Proteins. Brisbane: Department of Chemical Engineering, Thesis. The University of Queensland (1994).
- Janson, J-C, Rydén, L. Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications. Wiley-VCH, 2ª Edição (1998).
- Jottran, R. Etude de Quelques Aspects de La Fluidisation Dans Les Liquids. Chemical Engineering Science. **3** (1954) 12-16.
- Kalil, S. J. Produção de Inulinase por *Kluyveromyces marximux* e Purificação da Enzima por Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de Leito Expandido. Tese. FEA, Unicamp, Campinas-SP (2000).
- Karau, A., Benken, C., Thömmes, J., Kula, M-R. The Influence of Particle Size Distribution and Operation Conditions on the Adsorption Performance in Fluidized Beds. Biotechnology and Bioengineering. **55** (1996) 54-64.
- Kronman, J. M., Sinha, S. K., Brew, K. Characteristics of the Binding of Ca and Other Divalent Metal Ions to Bovine α -Lactalbumin. The Journal of Biological Chemistry. **256** (1981) 8582-8587.

- Laemmli, U., K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. **227** (1970) 680-685.
- Langmuir, I. The constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. Journal American Chemical Society. **38** (1916) 2263-2295.
- Lindahl, L., Vogel, H. J. Metal Ion Dependent Hydrophobic Interaction Chromatography of α -Lactalbumins. Analytical Biochemistry. **140** (1984) 394-402.
- Low, P., P., L., Rutherford, H., S., Gill, H., S., Cross, M., L. Effect of Dietary Whey Protein Concentrate on Primary and Secondary Antibody Responses in Immunized BALB/c Mice. International Immunopharmacology. **432** (2003) 1-9.
- McKenzie, H. A. Milk Proteins-Chemistry and Molecular Biology. Academic Press. **1** (1970) 50-53.
- Morr, C. V., Ha, E. Y. W. Whey Protein Concentrates and Isolates: Processing and Functional Properties. Food Science and Nutrition. **33** (1993) 431-476.
- Morrissey, J., H., Silver Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels: A Modified Procedure with Enhanced Uniform Sensitivity. Analytical Biochemistry. **117** (1981) 307-310.
- Mullick, A., M. G., Colleen, Flickinger, M. C. Expanded and Packed Bed Albumin Adsorption on Fluoride Modified Zirconia. Biotechnology and Bioengineering. **60** (1998) 333-340.
- Murakami, K., Andree, P. J., Berliner, L. J. Metal Ion Binding To α -Lactalbumin Species. Biochemistry. **21** (1982) 5488-5494.

- Noyelle, K., Van Dael, H. Kinetics of Conformational Changes Induced by the Binding of Various Metal Ions to Bovine α -Lactalbumin. Journal of Inorganic Biochemistry. **88** (2002) 69-76.
- Noppe, W., Haezebrouck, P., Hanssens, I., De Cuyper, M. A Simplified Purification Procedure of α -Lactalbumin from Milk Using Ca^{2+} -dependent Adsorption in Hydrophobic Expanded Bed Chromatography. Bioseparation. **8** (2000) 153-158.
- Ortin, A., Muo-Blanco, T., Calvo, M., Lopez-Perez, M., J., Cebrian-Perez, J., A. Extraction of β -Lactoglobulin from Bovine Milk by Affinity Counter-Current Distribution in Aqueous Two-Phase System. Journal of dairy Science. **75** (1992) 711-717.
- Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., Cabral, J. M. S. Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins. Journal of Biotechnology. **87** (2001) 143-159.
- Rao, K.R., Brew, K. Calcium Regulates Folding and Disulfide-bond Formation in α -Lactalbumin. Biophysical Research Communications. **163** (1989) 1390-1395.
- Richardson, J., H., Zaki, W. N. Sedimentation and Fluidization: Part I. Trans. Instr. Chem. Engrs. **32** (1954) 35-53.
- Ruthven, D., M. Principles of Adsorption & Adsorption Process. New York, John Wiley & Sons (1984).
- Sienkiewicz, J. M., Ridel, C. L. In Whey and Whey Utilization. Life Extension Report (1994) 48-56.
- Sgarbieri, V. C. Alimentação e Nutrição: Fator de Saúde e Desenvolvimento. Editora. Unicamp, Campinas-SP (1987) 254-255.

- Terranova, B. E., Burns, A. M. Continuous Cell Suspension Processing Using Magnetically Stabilized Fluidized Beds. Biothechnology and Bioengineering. **37** (1991) 110-120.
- Theodossiou, I., Elsner, Thomas, R. T. O., Timothy, J. H. Fluidisation and Dispersion Behaviour of Small High Density Pellicular Expanded Bed Adsorbents. Journal of Chromatography A. **964** (2002) 77-89.
- Thömmes, J., Bader, A., Halfar, M., Karau, A., M-R. Isolation of Monoclonal Antibodies from Cell Containing Hybridoma Broth Using a Protein A Coated Adsorbent in Expanded Beds. Journal Chromatography A. **752** (1996) 111-122.
- Tong, X-D, Dong, X-Y, Sun, Y. Lysozyme Adsorption and Purification by Expanded Bed Chromatography with a Small-sized Dense Adsorbent. Biochemical Engineering Journal. **12** (2002) 117-124.
- Veredas, V. Purificação da α -Lactalbumina a Partir do Soro do Leite em Leito Fixo e Expandido de Resinas. Dissertação, FEQ, Unicamp, Campinas-SP (2000).
- Voute, N. e Boschetti, E. Highly Dense Beded Sorbents Suitable for Fluidized bed Applications. Bioseparation. **8** (1999) 115-120.
- Villermaux, J., Swaaij, W. P. M. Modèle Représentatif de la Distribution des Temps de Séjour dans un Réacteur Semi-infini à Dispersion Axiale Avec Zones Stagnantes. Application à L'écoulement Ruisselant dans des Colonnes D'anneaux Rasching. Chemical Engineering Science. **24** (1969) 1097-1111.

- Ye, X., Yoshida, S., Ng, T., B. Isolation of Lactoperoxidase, Lactoferrin, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin B and β -Lactoglobulin A from Bovine Rennet whey Using ion Exchange Chromatography. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. **32** (2000) 1143-1150.
- Yoshida, S. Isolation of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin by Gel Filtration Using Sephacryl S-200 and Purification by Diethylaminoethyl Ion-exchange Chromatography. Journal Dairy Science. **73** (1990) 2292-2298.

APÊNDICE I – Programa Computacional

```

PROGRAM Libia
  USE global
  !-----Especificação das Variáveis-----
  IMPLICIT NONE
  CHARACTER(256) Nome_Arqui
  REAL*8, DIMENSION(:), ALLOCATABLE :: tempo, dados
  INTEGER N, i
  !-----Definição do Arquivo de Dados-----
  WRITE(*,*) 'Entre com o nome do arquivo'
  READ(*,*) Nome_Arqui
  OPEN(2, file=Nome_Arqui)
  !-----Definições iniciais e entrada de dados-----
  WRITE(*,*) 'Entra com o Número de Amostra'
  READ(*,*) N
  N_Pontos = N
  ALLOCATE(tempo(N), dados(N))
  DO i=1, N
    READ(2,*) tempo(i), dados(i)
    Fexp(i) = dados(i)
    tmedio(i) = tempo(i)
  END DO
  CALL Optime()
  !-----Saida de Dados-----
  WRITE(3, 11) Phy, NUT, P
11  FORMAT(20x,'Resultados do Programa'//
        2x,'Fração de Fluido (phy):', F20.10 / &
        2x,'Número de Unidades de Transferência: ', F8.4 / &
        2x,'Número de Péclet:', F10.4)
  DO i = 1, N_Pontos
    WRITE(9,'(4(F12.8,2x))')Tempo(i), Fexp(i), Fcalc(i), Fexp(i)-Fcalc(i)
  END DO
  DEALLOCATE(tempo, dados)
END

```

```

MODULE Global
  REAL*8  NUT, PHY, P, M1, M2, M3, Var, tmedio(200),Fexp(200), Fcalc(200)
  INTEGER N_Pontos
END MODULE

```

```
SUBROUTINE Optime()
USE Msimsl
USE Global
```

C-----Declaração das variáveis-----

```
INTEGER LDFJAC, M, N, IPARAM(7), ITP
REAL*8 FJAC(N_Pontos,3), FSCALE(N_Pontos), FVEC(N_Pontos), RPARAM(7), X(3),
+ XGUESS(3), XLB(3), XS(3), XUB(3)
EXTERNAL ROSBCK
```

C-----Compute the least squares for the Rosenbrock function-----

```
DATA XS/3*1.0d0/
DATA XLB/0.0d0, 0.0d0, 0.0d0/, XUB/0.99999d0, 50.0d0, 400.0d0/
```

C-----All the bounds are provided-----

```
LDFJAC=N_Pontos
M=N_Pontos
N=3
```

C-----Estimativas iniciais-----

```
XGUESS(1) = 0.9d0
XGUESS(2) = 0.0d0
XGUESS(3) = 40d0
CALL DU4LSF (IPARAM, RPARAM)
IPARAM(3) = 10000
IPARAM(4) = 10000
DO i = 1, N_pontos
    FSCALE(i)=1.0d0
END DO
ITP = 0
RPARAM(3) = 1.0D-14
RPARAM(4) = 1.0D-14
```

C-----Chamada da subrotina do IMSL para início dos cálculos-----

```
CALL DBCLSF (ROSBCK, M, N, XGUESS, ITP, XLB, XUB, XS, FSCALE,
+ IPARAM, RPARAM, X, FVEC, FJAC, LDFJAC)
```

C-----Atribuição dos resultados-----

```
Phy = x(1)
nut = x(2)
P = x(3)
END
```

C-----Chamada da Subrotina-----

```
SUBROUTINE ROSBCK (M, N, X, F)
USE Global
INTEGER M, N
REAL*8 X(N), F(M)
```

C-----Início dos cálculos-----

```
Phy = x(1)
nut = x(2)
P = x(3)
WRITE(3,*) x(1), x(2), x(3)
CALL laplace()
DO i = 1, N_pontos
    F(i) = Fcalc(i) - Fexp(i)
END DO
RETURN
END
```

```

SUBROUTINE Laplace()
C-----Definições das subrotinas do Microsoft IMSL-----
  USE Msimsl
  USE Global
C-----Especificações das Variáveis-----
  INTEGER I, KMAX, N
  REAL*8 ALPHA, FINV(N_Pontos), RELERR, T(N_Pontos)
  COMPLEX(8) F
  EXTERNAL F
C-----Definições Iniciais-----
C-----Passagem dos Tempos Médios para T usado na Subrotina INLAP-----
  DO I=1, N_Pontos
    T(I) = tmedio(I)
  END DO
C-----Definições Iniciais para a subrotina INLAP do IMSL-----
  N = N_Pontos
  ALPHA = 0
  KMAX = 500000
  RELERR = 1.0D-8
  CALL DINLAP (F, N, T, ALPHA, RELERR, KMAX, FINV)
C-----Impressão dos Tempos e dos valores das funções Inversas de Laplace-----
  DO i = 1, N_Pontos
    Fcalc(i) = FINV(I)
  END DO
END

C
COMPLEX(8) FUNCTION F (S)
  USE Global
  REAL*8 a1, a2, a3, a4, a5, a6, a7
  COMPLEX(8) s, num, den
  a1 = 0.5d0*(P/phy)**0.5d0
  a2 = P/2.d0
  a3 = (P*phy)**0.5d0
  a4 = nut/(phy)
  a5 = P/(4.d0*phy)
  a6 = Nut**2/(phy*(1.d0-phy))
  a7=phy**0.5
  Num = 2.d0*a1*dexp(a2)*cdexp(-a3*((s+a4+a5-a6/(s+a4))**0.5d0))
  den = 0.5*Pe**0.5 + a7*(s+a4+a5-a6/(s+a4))
  F = Num/den
  RETURN
END

```

APÊNDICE II

TABELAS DOS BALANÇOS DE MASSA PARA ALFA-LACTALBUMINA

Tabela II.1- Balanço de massa para alfa-lactalbumina a partir do soro de leite *in natura* nas seguintes condições: $T = 24^{\circ}\text{C}$, $G_{\text{exp}} = 1,71$ e $C_{\alpha 0} = 1,05 \text{ mg. mL}^{-1}$.

α -actalbumina	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Perdas	Recuperação
Massa (mg)	334,99	256,90	31,34	0,00		288,24
%	100	76,69	9,35	0,00	0,00	86,04

Tabela II.2- Balanço de massa para alfa-lactalbumina a partir do soro de leite *in natura* nas seguintes condições: $T = 22^{\circ}\text{C}$, $G_{\text{exp}} = 2,25$ e $C_{\alpha 0} = 1,05 \text{ mg. mL}^{-1}$.

α -lactalbumina	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Perdas	Recuperação
Massa (mg)	368,73	310,30	34,24	0,00		344,54
%	100	84,15	9,28	0,00	0,00	93,44

Tabela II.3- Balanço de massa para alfa-lactalbumina a partir do soro de leite *in natura* nas seguintes condições: $T = 28^{\circ}\text{C}$, $G_{\text{exp}} = 3,0$ e $C_{\alpha 0} = 1,02 \text{ mg. mL}^{-1}$.

α -lactalbumina	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Perdas	Recuperação
Massa (mg)	326,30	261,07	26,85	1,78		289,70
%	100	80,00	6,25	0,54	6,66	86,80

Tabela II.4- Balanço de massa para alfa-lactalbumina a partir do soro de leite *in natura* nas seguintes condições: T= 28°C, G_{exp}=1,5 e C_{α0}=1,09 mg. mL⁻¹.

α-lactalbumina	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Perdas	Recuperação
Massa (mg)	219,08	188,67	17,75	0,00		206,42
%	100	86,11	8,10	0,00	0,00	94,22

Tabela II.5- Balanço de massa para alfa-lactalbumina a partir do soro de leite *in natura* nas seguintes condições: T=24 °C, G_{exp}=2,75 e C_{α0}=1,12 mg. mL⁻¹.

α-lactalbumina	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Perdas	Recuperação
Massa (mg)	358,58	291,21	23,08	0,00		314,29
%	100	81,21	6,43	0,00	0,00	87,64

Tabela II.6- Balanço de massa para alfa-lactalbumina a partir do soro de leite *in natura* nas seguintes condições: T= 32°C, G_{exp}=1,71 e C_{α0}=1,07 mg. mL⁻¹.

α-lactalbumina	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Perdas	Recuperação
Massa (mg)	342,40	298,34	26,63	2,99		327,96
%	100	87,13	7,77	0,87	11,26	94,78

Tabela II.7- Balanço de massa para alfa-lactalbumina a partir do soro de leite *in natura* nas seguintes condições: T= 28°C, G_{exp}=2,25 e C_{α0}=1,09 mg. mL⁻¹.

α-lactalbumina	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Perdas	Recuperação
Massa (mg)	365,15	276,75	27,59	0,00		304,34
%	100	75,79	7,55	0,00	0,00	83,84

Tabela II.8- Balanço de massa para alfa-lactalbumina a partir do soro de leite *in natura* nas seguintes condições: $T = 28^{\circ}\text{C}$, $G_{\text{exp}} = 2,25$ e $C_{\alpha 0} = 1,07 \text{ mg. mL}^{-1}$.

α -lactalbumina	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Perdas	Recuperação
Massa (mg)	342,37	283,80	26,46	0,00		310,26
%	100	82,89	7,73	0,00	0,00	90,62

Tabela II.9- Balanço de massa para alfa-lactalbumina a partir do soro de leite *in natura* nas seguintes condições: $T = 34^{\circ}\text{C}$, $G_{\text{exp}} = 2,25$ e $C_{\alpha 0} = 1,05 \text{ mg. mL}^{-1}$.

α -actalbumina	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Perdas	Recuperação
Massa (mg)	368,06	279,58	28,21	4,01		311,08
%	100	76,00	7,66	1,09	14,21	84,71

Tabela II.10- Balanço de massa para alfa-lactalbumina a partir do soro de leite *in natura* nas seguintes condições: $T = 28^{\circ}\text{C}$, $G_{\text{exp}} = 2,25$ e $C_{\alpha 0} = 1,49 \text{ mg. mL}^{-1}$.

α -actalbumina	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Perdas	Recuperação
Massa (mg)	373,94	288,90	29,03	0,00		317,93
%	100	77,26	7,76	0,00	0,00	85,02

Tabela II.11- Balanço de massa para alfa-lactalbumina a partir do soro de leite *in natura* nas seguintes condições: $T = 32^{\circ}\text{C}$, $G_{\text{exp}} = 2,75$ e $C_{\alpha 0} = 1,11 \text{ mg. mL}^{-1}$.

α -lactalbumina	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Perdas	Recuperação
Massa (mg)	332,65	281,04	24,77	4,01		309,82
%	100	84,50	7,44	1,20	16,20	93,14

APÊNDICE III

TABELAS ESTATÍSTICAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL

Tabela III.1- Análise de variância para a pureza da alfa-lactalbumina

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	686,731	5	137,346
Resíduo	71,977	5	14,396
Falta de ajuste	65,977	4	16,494
Erro puro	6,00	2,0	3,00
Total	758,709	10,0	75,59

Tabela III.2 - Análise de variância para a recuperação da alfa-lactalbumina

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	3,714	5	0,743
Resíduo	0,552	5	0,110
Falta de ajuste	0,527	4	0,131
Erro puro	0,025	2,0	0,012
Total	4,266	10,0	0,427

Tabela III.3 - Análise de variância para a eficiência da coluna

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	590,705	5	458,077
Resíduo	22,022	5	4,404
Falta de ajuste	17,356	4	4,339
Erro puro	4,666	2,0	2,333
Total	612,727	10,0	61,273

Tabela III.4 - Análise de variância para o número de Peclet

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	2290,388	5	458,077
Resíduo	4,521	5	0,904
Falta de ajuste	2,521	4	0,630
Erro puro	2,000	2,0	1,000
Total	2294,909	10,0	229,491

Tabela III.5 - Análise de variância para o parâmetro N do modelo PDE

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	0,041	5	0,008
Resíduo	0,004	5	0,0008
Falta de ajuste	0,003	4	0,00075
Erro puro	0,00047	2,0	0,0002
Total	0,044	10,0	0,0044

Tabela III.6 - Análise de variância para o parâmetro ϕ do modelo PDE

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	312,969	5	62,594
Resíduo	21,976	5	4,395
Falta de ajuste	17,309	4	4,327
Erro puro	4,666	2,0	2,333
Total	317,636	10,0	31,764