

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Engenharia Química**

**Departamento de Processos Biotecnológicos**

**Separação da Mistura Binária Protéica de  $\alpha$ -Lactalbumina e  
 $\beta$ -Lactoglobulina por Cromatografia de Exclusão Molecular  
Utilizando Reciclo Externo Estacionário**

**Autor**

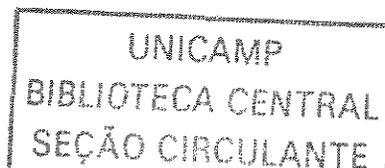
**Elcimar da Silva Nóbrega**

**Orientador**

**Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

**Campinas – SP  
2004**



Nº CHAMADA	
UNICAMP	
N665s	
V	EX
TOMBO BC/	61391
PROC.	16-86-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
REÇO	11.00
DATA	14.1.05
CPD	

3.6 Id 335866

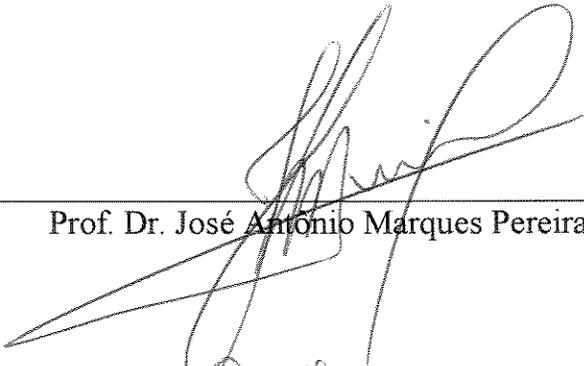
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

N665s Nóbrega, Elcimar da Silva  
Separação da mistura binária protéica de  $\alpha$  -  
Lactalbumina e  $\beta$ -Lactoglobulina por cromatografia de  
exclusão molecular utilizando reciclo externo  
estacionário / Elcimar da Silva Nóbrega.--Campinas, SP:  
[s.n.], 2004.

Orientador: Cesar Costapinto Santana.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

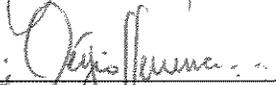
1. Cromatografia em gel. 2. Leite-Proteínas. 3. Soro  
do leite. 4. Proteínas - Separação. I. Santana, Cesar  
Costapinto. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese de Doutorado defendida e aprovada em 28 de junho de 2004  
pela banca examinadora constituída pelos Professores Doutores:



---

Prof. Dr. José Antônio Marques Pereira



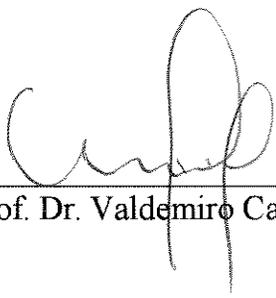
---

Prof. Dr. Sérgio Luiz de Lucena



---

Dr. Luiz Tadeu Furlan



---

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri

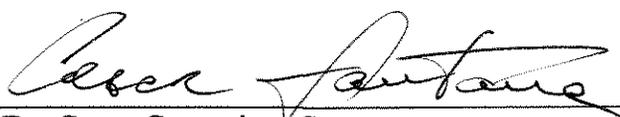


---

Prof. Dr. Cesar Costantino Santana

2004.06.28

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Elcimar da Silva Nóbrega e aprovada pela comissão julgadora em 28 de julho de 2004.



---

Prof<sup>o</sup> Dr. Cesar Costapinto Santana  
Orientador

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Eliomar (*in memorium*)

À minha mãe Maria José, minha  
esposa Consuelo e ao meu filho Riann.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença permanente;

Ao Professor Dr. César Costapinto Santana, pela orientação, idealização do projeto indispensável apoio e a oportunidade do desenvolvimento deste trabalho;

A CNPq pelo apoio financeiro referente à concessão da bolsa;

Aos colegas do Laboratório de Biosseparação da FEC/UNICAMP que me deram grande apoio na realização deste trabalho, em especial à Líbia de Sousa Conrado e Vinícius Veredas;

Aos Companheiros de laboratório, José Antônio Marques Pereira, Eduardo Arruda, Fábio Ribeiro Campos, Sérgio Luiz de Lucena e Marisa Beppu, foram com eles que aprendi os primeiros passos na manipulação com biomoléculas;

Ao Professor Dr. Valdemiro Sgarbieri pela contribuição do concentrado protéico do soro do leite liofilizado que serviu de matéria prima em uma das etapas deste trabalho;

À Professora Maria Helena Andrade Santana e ao Eng. Luís Tadeu Furlan pelas valiosas sugestões quando estes participaram da qualificação deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Processos Biotecnológicos, Éverson Miranda, Sônia Maria Alves Bueno e Angela Maria Moraes pelo apoio, incentivo, aulas ministradas; tenham meu profundo respeito e admiração;

Aos Amigos Frede de Oliveira Carvalho e ao Eduardo Urso pelas valiosas contribuições quando estava montando a metodologia de simulação;

Ao amigo Marco Antônio Garcia, pela indispensável ajuda na leitura e correção final da Tese;

Aos Colegas de Faculdade que ao longo desta caminhada sorrimos juntos, trabalhamos juntos e sonhamos juntos, em especial: Ana Carolina, Marcos, Ivanildo, Roberta, Maria Helena, Luciana, Elaine, Carolina, Sandra, Cristiane.

## RESUMO

O uso da técnica de separação cromatográfica de componentes por reciclo apresenta alguns aspectos relevantes como melhorar o rendimento da separação, diminuir o uso de solvente e o aumento da produtividade. O uso do reciclo na forma de Reciclo Externo Estacionário (REE) é usualmente comparado à técnica cromatográfica de separação binária por Leito Móvel Simulado (LMS), diferente desta que opera em regime estacionário e é verdadeiramente contínuo, o REE é um sistema repetitivo, porém descontínuo. No presente trabalho foi utilizada a técnica de Reciclo Externo Estacionário para separação e purificação de uma mistura binária de proteínas em colunas cromatográficas com resinas de exclusão de tamanho G200. As proteínas utilizadas foram a  $\alpha$ -Lactalbumina e  $\beta$ -Lactoglobulina. O processamento de uma mistura binária dessas proteínas no REE forma um perfil cromatográfico onde no início e no final deste perfil é verificado a presença das respectivas proteínas puras e no meio do perfil encontra-se a mistura das duas proteínas, esta região é recirculada ao mesmo tempo em que uma nova amostra é injetada no processo. As frações de proteínas retiradas foram analisadas por HPLC utilizando uma coluna de troca iônica. Os resultados mostram que as aplicações do REE na separação e purificação das proteínas em questão apresentaram purezas e rendimentos elevados, mas também foi observado um fator de concentração menor que 1,0 o que justifica o complemento por outra etapa de processo de purificação para a obtenção das proteínas individuais mais concentradas. Os modelos matemáticos aplicados à filtração em gel em coluna cromatográfica foram discretizados através do método da colocação ortogonal. Os sistemas de equações diferenciais e algébricas resultantes foram solucionados através da rotina RUNGE-KUTTA GIL, o modelo matemático serviu para descrever por simulação a técnica de separação por exclusão de tamanho destas proteínas utilizando o Reciclo Externo Estacionário. Este modelo matemático poderá ser usado para o desenvolvimento de métodos de aumento de escala e otimização do processo de separação do REE.

## ABSTRACT

The chromatographic separation techniques by recycle exhibit important aspects: improvement of the separation efficiency, lower use of solvent and the increase of the productivity. The use of the recycle in the form of Stead State Recycle (SSR) is usually compared to the chromatographic technique of binary separation by Simulated Moving Bed (SMB). Different from this technique which operates in steady state and is truly continuous, SSR is a repetitive although discontinuous system. In the present work the Steady State Recycle was used for the separation and purification of a binary mixture of proteins in chromatography columns using G200 size exclusion resins. Proteins mixture of  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin were used for the processing in Stead State Recycle and forms a chromatographic profile which shows, in its initial and final parts, presence of the respective pure proteins. In the middle section of the profile there is a mixture of those two proteins, that is recirculated at the same time a new sample is injected in the process. The fractions of the protein solution taken out were analyzed by HPLC using a ion exchange column. The results show that the application of the Stead State Recycle (SSR) in protein purification and separation leads to high purity and efficiency. It was observed a decrease of purification factor to less than 1.0, which justifies the complement for another stage of the purification process to obtain more concentrated individual protein. The methods orthogonal collocation and Runge-Kutta Gil ware applied to solve the mathematical models for gel filtration in chromatography column using SSR. These mathematical models can be used for the scale-up and optimization of the separation process by SSR.

**NOMENCLATURA**

$\alpha$ -La	$\alpha$ -lactoalbumina
$\beta$ -Lg	$\beta$ -lactoglobulina
BSA	Albumina do Soro Bovino
L	Altura de coluna
H	Altura de pratos teóricos
h	Altura do leito de partículas
$D_p$	Coefficiente de difusão do soluto na fase sólida
$D_b$	Coefficiente de dispersão axial na fase líquida da coluna
$K_e$	Coefficiente de distribuição
$k_f$	Coefficiente de transferência de massa
$C_b$	Concentração do soluto na fase líquida da coluna
$C_s$	Concentração do soluto na fase sólida
$D_m$	Difusividade de proteínas globulares
DTR	Distribuição de tempo de residência
$FC^n_{\alpha-La}$	Fator de concentração para o experimento n para a $\alpha$ -lactalbumina
$FC^n_{\beta-Lg}$	Fator de concentração para o experimento n para a $\beta$ -lactoglobulina
$\lambda$	Fator de forma
k	Fator de forma, esferas = 5
$\gamma_s$	Fator de obstrução nos poros
$\tau$	Fator de tortuosidade

<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<i>Ig's</i>	<i>Imunoglobulinas</i>
<i>Lf</i>	<i>Lactoferrina</i>
<i>Lp</i>	<i>Lactoperoxidase</i>
$W_{1/2}$	Largura do pico do pico de eluição à 50% da sua altura
<b>LMS</b>	Leito Móvel Simulado
<i>Lz</i>	<i>Lisozima</i>
<b>MM</b>	Massa molecular
$mt_{\alpha-La}^{A1}$	Massa total coletada da Fração A1 para $\alpha$ -lactalbumina
$mt_{\beta-Lg}^{A1}$	Massa total coletada da Fração A1 para $\beta$ -lactoglobulina
$mt_{\alpha-La}^{A2}$	Massa total coletada da Fração A2 para $\alpha$ -lactalbumina
$mt_{\beta-Lg}^{A2}$	Massa total coletada da Fração A2 para $\beta$ -lactoglobulina
$mr_{\alpha-La}^0$	Massa total de $\alpha$ -lactalbumina na alimetação
$mr_{\beta-Lg}^0$	Massa total de $\beta$ -lactoglobulina na alimetação
$mr_{\alpha-La}^{A2}$	massa total recirculada do processo para $\alpha$ -lactalbumina
$mr_{\beta-Lg}^{A2}$	Massa total recirculada do processo para $\beta$ -lactoglobulina
$MI_{\alpha-La}^n$	Massas de $\alpha$ -lactalbumina na Fração I
$MR1_{\alpha-La}^n$	Massas de $\alpha$ -lactalbumina na Fração R1
$MR2_{\alpha-La}^n$	Massas de $\alpha$ -lactalbumina na Fração R2
$MI_{\beta-Lg}^n$	Massas de $\beta$ -lactoglobulina na Fração I
$MR1_{\beta-Lg}^n$	Massas de $\beta$ -lactoglobulina na Fração R1
$MR2_{\beta-Lg}^n$	Massas de $\beta$ -lactoglobulina na Fração R2

$\frac{A_{2n}}{m_{\alpha-La}}$	Média das massas das seis últimas frações A2 coletadas de $\alpha$ -La
$d_p$	Média do diâmetro das partículas do leito
$Mo_n$	Momento de ordem $n$
$nc$	Número de ciclos
$N$	Número de pratos por altura de coluna
$km$	Ordem do momento da DTR
$\Delta P$	Perda de carga
$\varepsilon_p$	Porosidade da fase sólida
$\varepsilon_p^a$	Porosidade da partícula acessível à proteína
$\varepsilon_b$	Porosidade do leito
$\varepsilon_p$	Porosidade total da partícula
$r$	Raio da partícula
$\lambda$	Razão do diâmetro molecular do soluto com o diâmetro do poro da partícula
$REE$	Reciclo Externo Estacionário
$C_i/C_0$	Relação da concentração de proteína coletada com a concentração da mesma proteína na alimentação
<b>SMB</b>	<b>Simulated Moving Bed</b>
$V_i$	Sinal de mV
$t_R$	Tempo de residência
$t_o$	Tempo morto relativo ao volume morto
$\sigma^2$	Variância da DTR
$Q$	Vazão volumétrica
$u_p$	Velocidade real

$u$	Velocidade superficial do fluido
$u_{otm}$	Velocidade superficial ótima
$\eta$	Viscosidade do solvente
$V_{an}$	Volume da alimentação por ciclo para o experimento $n$
$V_{A2n}$	Volume da fração A2 coletada para o experimento
$I$	Volume da fração que é recirculada ao mesmo tempo em que é feita uma nova alimentação em um ciclo em REE
$A1$	Volume da primeira fração de amostra coletada em um ciclo em REE
$R1$	Volume da primeira fração recirculada em um ciclo em REE
$A2$	Volume da segunda fração de amostra coletada em um ciclo em REE
$R2$	Volume da segunda fração recirculada em um ciclo em REE
$V_e$	Volume de eluição
$V_i$	Volume de poro
$V_r$	Volume de retenção ou eluição
$V_t$	Volume líquido total do leito
$V_0$	Volume total dos espaços vazios entre as partículas

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>7</b>
3.1	O Soro do Leite Bovino .....	7
3.2	Características das Principais Proteínas do Soro do Leite Bovino .....	9
3.3	Separação de Proteínas por Técnicas Cromatográficas .....	11
3.4	Cromatografia por Exclusão de Tamanhos.....	13
3.4.1	Seletividade e Resolução de Separação.....	14
3.4.2	Volume de Poro do Suporte.....	16
3.4.3	Eficiência de Separação.....	17
3.4.4	Altura de Pratos Teóricos.....	18
3.4.5	Taxa Ótima de Escoamento.....	20
3.4.6	Sistemas de Cromatografia Contínua .....	22
3.5	Alternativa aos Sistemas de Cromatografia Contínua Usando Sistemas de Reciclo Externo Estacionário (REE) .....	25
3.6	Distribuição do tempo de Residência (DTR).....	29
3.6.1	Análise da Distribuição dos Tempos de Residência .....	31
3.6.2	Aplicação do Método dos Momentos.....	33
3.6.3	Modelo de Escoamento com Dispersão para Coluna Cromatográfica de Exclusão de Tamanhos .....	33
3.6.4	Determinação do Coeficiente de Dispersão Axial da Coluna ( $D_b$ ) e do Coeficiente de Difusão do Solute na Partícula ( $D_p$ ) .....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	Empacotamento das Colunas Utilizadas no REE .....	39
4.2	Porosidade do Leito e da Partícula.....	40
4.3	Número de Pratos Teóricos das Colunas .....	45
4.4	Solução do Modelo de Adsorção em Colunas Cromatográficas. ....	46

4.5	Reciclo Externo Estacionário (REE) .....	47
4.6	Alimentação do Sistema REE .....	52
4.7	Identificação das Frações Protéicas .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>57</b>
5.1	Porosidade da Resina Sephadex G200® e do Leito Empacotado .....	57
5.2	Número de Pratos Teóricos das Colunas .....	62
5.3	Cálculo do Coeficiente de Distribuição $k_e$ para as Colunas Utilizadas. ....	64
5.4	Determinação dos Coeficientes de Dispersão Axial na Fase Líquida da Coluna ( $D_b/v$ ) e Difusão do Solute na Fase Sólida ( $D_p$ ) .....	65
5.5	Processamento de Misturas Protéicas de $\beta$ -lactoglobulina e $\alpha$ -lactalbumina em REE. ....	74
5.6	Modelagem Matemática.....	94
5.6.1	Formulação do Modelo Matemático .....	95
5.6.2	Resultado da Simulação do Sistema de Reciclo Externo Estacionário na Separação da $\alpha$ -Lactalbumina e $\beta$ -Lactoglobulina.....	99
5.7	Processamento de uma Mistura Protéica de Soro do Leite Bovino em REE. ....	105
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....</b>	<b>121</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>123</b>

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO

O soro do leite bovino, que é descartado como efluente de alta carga orgânica, pode ser obtido na fabricação do queijo pela coagulação da caseína do leite. As proteínas presentes no lactosoro apresentam um excelente valor nutritivo e farmacológico, porém o seu uso no enriquecimento de produtos alimentícios é limitado devido à sua baixa concentração.

As principais proteínas do soro do leite bovino são:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, albumina sérica bovina (BSA), imunoglobulinas, lactoferrina,  $\beta$ -Lactoglobulina, lactoperoxidase, lisozima e outras em menor proporção. A maioria apresenta propriedades fisiológico-funcionais importantes, tais como: a  $\beta$ -lactoglobulina parece estar relacionada aos mecanismos de transporte de adsorção de vitamina A (retinol), enquanto que a  $\alpha$ -lactalbumina, a BSA e as imunoglobulinas têm ação importante sobre o sistema imunológico, estimulando a síntese de agentes imunológicos como a glutathione, (Brinks, 1996).

O uso da técnica de separação cromatográfica de componentes por reciclo apresenta alguns aspectos relevantes como um maior rendimento da separação, menor consumo de solvente e maior produtividade em relação às técnicas tradicionais de cromatografia em batelada. O uso do reciclo na forma de Reciclo Externo Estacionário (REE) é usualmente comparado à técnica cromatográfica de separação binária por Leito Móvel Simulado (LMS), porém, diferente desta última que opera em regime estacionário e é verdadeiramente contínuo, o REE é um sistema repetitivo, porém

descontínuo. A relevância do estudo da técnica de separação binária de proteínas por REE poderá viabilizar sua competitividade operacional com o aumento da produtividade. Esta técnica pode ser aplicada não somente à separação binária, mas também nas etapas de polimento, descontaminação ou concentração em uma seqüência de “downstream”.

No presente trabalho foi utilizada a técnica de Reciclo Externo Estacionário para separação e purificação de misturas binárias de proteínas em colunas cromatográficas com resinas de exclusão de tamanho G200. As proteínas utilizadas foram a  $\alpha$ -Lactalbumina e  $\beta$ -Lactoglobulina em uma mistura sintética onde suas concentrações foram aproximadas as existente no lactosoro bovino sendo aproximadamente 1,0 mg/mL e 2,5 mg/mL, respectivamente. O processamento da mistura binária dessas proteínas no REE forma um perfil cromatográfico onde no início e no final do mesmo é verificada a presença das respectivas proteínas puras enquanto que no meio do perfil encontra-se a região de eluição onde as duas proteínas não apresentam separação. Esta região é recirculada ao mesmo tempo em que uma nova amostra da mistura sintética original é injetada no processo.

Um modelo matemático foi desenvolvido para descrever a técnica de separação destas proteínas por exclusão de tamanho utilizando o Reciclo Externo Estacionário. Este modelo matemático poderá ser usado para o desenvolvimento de métodos de aumento de escala e otimização do processo de separação do REE.

## CAPÍTULO 2

### 2 OBJETIVOS

Este trabalho apresenta como objetivo o estudo da técnica de Reciclo Externo Estacionário aplicada à separação de misturas protéicas binárias em colunas cromatográficas com resinas de exclusão de tamanho. Em especial foi usado o par binário das proteínas que podem ser isoladas do lactosoro:  $\alpha$ -lactalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina. O trabalho foi desenvolvido conforme as seguintes fases:

- Montagem do equipamento experimental para o uso da técnica de Reciclo Externo Estacionário.
- Empacotamento de duas colunas cromatográficas com uma resina de exclusão por tamanho molecular.
- Caracterização das partículas de resina quanto à porosidade, diâmetro médio e distribuição de tamanhos; caracterização do leito empacotado com resina quanto à sua capacidade hidrodinâmica, porosidade do leito e da partícula e coeficiente de dispersão axial nas colunas.
- Realização dos experimentos usando tempos de reciclo diferentes para avaliar o comportamento dos resultados obtidos em termos da pureza e rendimento das proteínas em estudo nas frações coletadas durante o processo.
- Modelagem matemática do sistema, considerando as fases sólida e fluida, empregando os parâmetros experimentais de caracterização e separação obtidos.

## CAPÍTULO 3

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 O SORO DO LEITE BOVINO

Carboidratos, lipídeos, sais minerais e proteínas são os principais componentes do leite, que juntos com a água, formam misturas de sólidos dissolvidos, dispersões coloidais e emulsões.

A lactose é o principal carboidrato do leite. Outros carboidratos incluem monossacarídeos, oligossacarídeos ácidos e básicos e grupo glicosil ligados a proteínas e lipídeos. Cerca de 98% dos lipídeos presentes no leite são triglicerídeos, havendo pequena quantidade de ácidos graxos livres, fosfolipídeos, e esteróis. Os sais minerais contribuem de forma importante no balanço e equilíbrio iônico do leite.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$  são os principais cátions e os componentes aniônicos se apresentam na forma de fosfatos, citratos, cloretos, carbonatos e sulfatos (James, 1994). A Tabela 3.1 mostra comparativamente a composição média do leite bovino e humano.

**Tabela 3.1** – Composição média do leite bovino e humano.

<b>Componentes</b>	<b>g/100g leite bovino</b>	<b>g/100g leite humano</b>
H <sub>2</sub> O	87,3	87,1
Lactose	4,6	7,1
Lipídeos	3,9	4,5
Caseínas	2,6	0,4
Proteínas do lactosoro	0,6	0,5
Cinzas	0,7	0,2

*Fonte: James, 1994*

Davis (1965) afirma que o lactosoro se apresenta sob a forma de um líquido verde-amarelado contendo sais minerais, lactose e proteínas. De acordo com o método de produção do queijo, os tipos de lactosoro podem ser classificados em dois tipos: o lactosoro doce, onde o leite é coagulado por ações enzimáticas, apresentando pH em torno de 6,5, e o lactosoro ácido que é obtido como subproduto de queijos produzidos pela precipitação do leite usando ácido láctico ou ácidos minerais como o ácido clorídrico.

Pelo fato de ser um subproduto em abundância na fabricação de queijos, o soro do leite vem tendo amplo interesse econômico como fonte de proteínas, nas aplicações médicas, na indústria alimentícia e como suprimento para crescimento de culturas microbiológicas (Hahn et al., 1997). A Tabela 3.2 mostra a composição das principais proteínas do soro do leite bovino.

**Tabela 3.2 - Composição média das principais proteínas do soro do leite bovino.**

Proteína	Concentração (g/l)	kDa	PI
$\beta$ -lactoglobulina	3-4	18,4	5,2
$\alpha$ -lactalbumina	1,5	14,2	4,7-5,1
BSA	0,3-0,6	69	4,9
IgG, IgA, IgM	0,6-0,9	150-900	5,8-7,3
Lactoperoxidase	0,06	78	9,6
Lactoferrina	0,05	78	8,0
Protease-peptona	0,5	4,20	-

*Fonte: Hahn et al., 1997*

### 3.2 CARACTERÍSTICAS DAS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE BOVINO

*$\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La)* – segundo Fox (1989), a  $\alpha$ -La é uma das principais proteínas do leite humano. A  $\alpha$ -La se apresenta na forma esférica com massa molar de aproximadamente  $1,4 \times 10^4$  Kg/Kg-mol e ponto isoelétrico em torno de 4,8. A  $\alpha$ -La é conhecida por ter alto poder nutricional para crianças, devido à sua composição de aminoácidos. Tem uma configuração estável entre pH 5,4 a 9 e apresenta uma forte ligação com o  $\text{Ca}^{++}$ . A pH 4 a proteína se desnatura de forma reversível diminuindo sua capacidade de agregação pela perda dos íons  $\text{Ca}^{++}$  (De Wit, 1989).

*$\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg)* - é a proteína de maior concentração no leite bovino. Apresenta duas grandes variedades genéticas, a  $\beta$ -LgA e  $\beta$ -LgB. Apesar de não existir uma definição concreta, estudos levam a crer que o seu papel biológico estar associado na ligação e transporte do retinol e que resulta na forte proteção contra oxidações enzimáticas. A  $\beta$ -Lg tem sido encontrada com pontos isoelétricos entre 5,35 e 5,49 e devido a esta propriedade tem sido sujeita a vários estudos físico-químicos (Fox, 1989).

*Albumina do Soro Bovino (BSA)* - esta proteína apresenta um massa molar de  $6,6 \times 10^4$  Kg/Kg-mol e ponto isoelétrico em torno de 4,9. A BSA tem alta solubilidade em água mas apresenta intensa precipitação em temperaturas na faixa entre 40 e 45°C. A um pH 4,0 a molécula de BSA sofre desnaturação ácida (De Wit, 1989). A molécula possui 17 ligações dissulfeto e contém três grandes domínios, com funções de ligações bem definidas, as quais incluem ligações por íon metálico, lipídeos e nucleotídeos. A BSA também transporta ácidos graxos insolúveis no sistema circulatório. No leite sua função ainda não está bem definida. Provavelmente essa capacidade de transporte pela habilidade de se ligar a ácidos graxos pode promover a lipólise (Fox, 1989).

**Imunoglobulinas (Ig's)** – São um grupo muito complexo de proteínas. No leite bovino promovem uma imunidade passiva e são encontradas nas classes IgG, IgA e IgM. No leite bovino, a IgG apresenta duas formas, IgG1 e IgG2, sendo a primeira a principal classe de Ig no leite bovino podendo apresentar concentrações de 100g/L no colostro bovino. As IgG's têm uma massa molecular de  $1,5 \times 10^5$  Kg/Kg-mol e ponto isoelétrico entre 6,2 e 7,0. A IgA se apresenta como um monômero de  $1,6 \times 10^5$  Kg/Kg-mol, mas é excretada como dímeros. As IgM's ocorrem como pentâmeros no quais cinco monômeros são ligados pela componente J e apresentam massa molar de  $9,0 \times 10^5$  Kg/Kg-mol, (Fox, 1989).

**Lisozima (Lz)** – é uma proteína pequena de ponto isoelétrico 9,5 e massa molecular de 18000 Da, quando encontradas no leite bovino. Já as encontradas no leite humano apresentam valores de  $1,5 \times 10^4$  Kg/Kg-mol. A Lz também é conhecida por apresentar atividade antibactericida, causando a lise celular através da quebra das ligações glicosídicas entre a ácido acetilmurâmico e o N-acetilglicosamina, que constituem a maior parte das paredes das células bacterianas (James, 1994).

**Lactoferrina (Lf)** – é um membro da família das proteínas com ligações com o íon ferro, conhecida também como transferrina. A Lf é uma forte glicoproteína de caráter básico composta de dois domínios. Possui dois sítios de ligação metálica que podem ligar-se ao íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) na presença do íon bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). O citrato pode trocar o íon quelatado pela Lf, formando apo-lactoferrina e íon citrato (Reiter, 1985). A Lf tem massa molecular de aproximadamente  $7,6 \times 10^4$  Kg/Kg-mol  $\pm$   $1,6 \times 10^3$  Kg/Kg-mol e apresenta ponto isoelétrico na faixa de 8,7 a 9,3. Infere-se que a Lf possui dois diferentes mecanismos que influenciam no crescimento bacteriano. O primeiro envolve a capacidade de se ligar aos íons de ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e inibindo a bactéria pela necessidade deste elemento para promover seu crescimento. O segundo, menos compreendido, consiste na interação da Lf com as paredes celulares da bactéria afetando de forma significativa sua estrutura e/ou sua permeabilidade (Oram, 1968).

*Lactoperoxidase (Lp)* – Apresenta massa molar de  $7,8 \times 10^4$  Kg/Kg-mol e ponto isoelétrico 9,6. A Lp sozinha não apresenta efeito antibacteriano, mas em combinação com o peróxido de hidrogênio e o tiocianato formam o sistema lacoperoxidase (LPS) – potente sistema antimicrobiano que inibe o metabolismo bacteriano pela produção do  $\text{OSCN}^-/\text{O}_2\text{SCN}^-$  o qual oxida essencialmente os grupos sulfídricos  $\text{SH}^-$  de proteínas e enzimas (James, 1994).

### 3.3 SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Os produtos de origem biotecnológica possuem grande diversidade e estão geralmente presentes em baixas concentrações em caldos de fermentação e sobrenadante de culturas de células. A alta diluição dos produtos de interesse, assim como a grande variedade de espécies químicas que interferem nos processos de recuperação, fracionamento e purificação final tornam essas tarefas difíceis e onerosas, respondendo na maioria dos processos pelo maior percentual dos custos de produção de biomolécula. No caso especial das proteínas as percentagens dos custos de purificação atingem valores da ordem de 60% em relação aos custos totais do processo de produção, podendo se situar na faixa de até 80% a 90% para produtos de fermentação originários de DNA recombinante (Blanch e Clark, 1997).

Ultimamente os procedimentos mais utilizados para a separação de proteínas consistem no uso de técnicas e procedimentos cromatográficos. Um sistema cromatográfico compreende duas fases, uma fase estacionária fixa e uma fase móvel. O princípio da separação se baseia na existência de interações entre os constituintes da fase móvel e a fase estacionária. As moléculas possuem interações diferentes com a fase estacionária, sendo transportadas a velocidades diferentes separando-se assim

umas das outras. A Tabela 3.3 associa o tipo de cromatografia com o princípio no qual é baseada.

**Tabela 3.3 – Técnicas e princípios da cromatografia**

<b>Técnica</b>	<b>Princípio</b>
Cromatografia de adsorção	Forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, momento dipolar
Cromatografia Hidrofóbica	Interações hidrofóbicas
Cromatografia de afinidade	Interações biológicas específicas
Cromatografia de exclusão	Diferenças de tamanho Molecular
Cromatografia de troca iônica	Diferenças de cargas

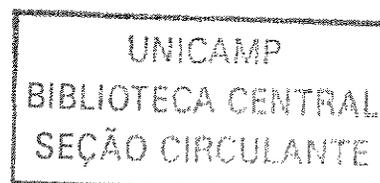
Valendo-se das diferenças entre os pontos isoelétricos, na maioria delas bem definidos, a cromatografia de troca iônica ultimamente tem sido amplamente usada na separação das proteínas. A vantagem do uso da cromatografia de troca iônica para proteínas é que a adsorção pode ser facilmente reversível com a mudança das condições de processo. O desempenho do processo de cromatografia de troca iônica segue uma seqüência específica de estágios que incluem adsorção, lavagem, dessorção e regeneração. Durante o estágio de adsorção uma solução tampão contendo a proteína a ser separada é aplicada à resina de troca iônica. Proteínas tendo alta afinidade com os grupos funcionais carregados da resina são adsorvidas enquanto que as moléculas não ligadas são lavadas com o tampão original e passam através da coluna. Durante a etapa de dessorção as proteínas seletivas à resina são dessorvidas pelo aumento da força iônica (aumento da concentração de sal) ou pela alteração do pH.

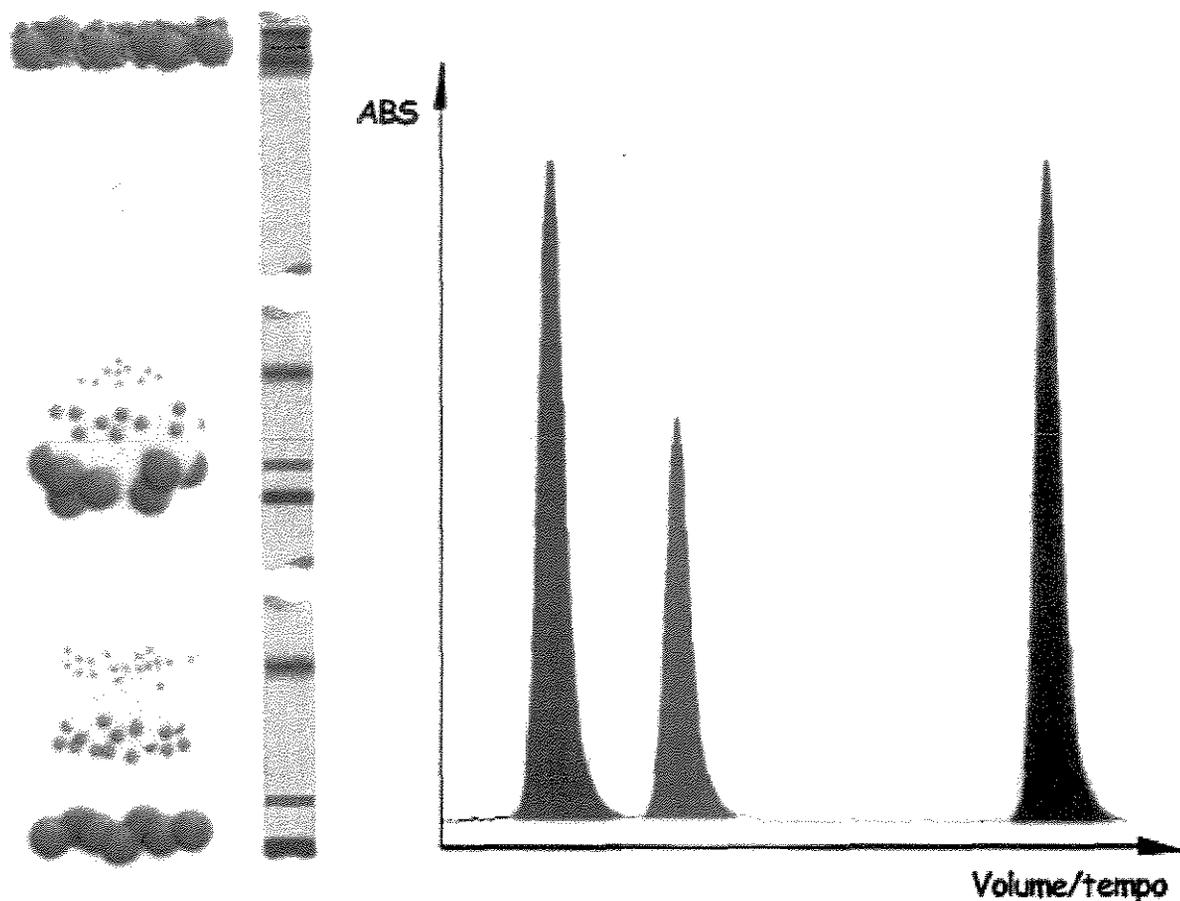
Variações do pH reduzem a relação de carga das proteínas, e decrescem as afinidades da resina de troca iônicas desde que ligações eletrostáticas são formadas. A regeneração da resina é feita permeando o leito de resina com uma solução contendo um gradiente de íons presentes originalmente na resina.

### 3.4 CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHOS

Na separação de macromoléculas a técnica de cromatografia de exclusão de tamanhos, também chamada de filtração em gel, é baseada na diferença de tamanhos ou volumes hidrodinâmicos. Uma mistura protéica contendo componentes com diferentes massas moleculares, quando permeado em um leito de resinas de exclusão de tamanhos, o tempo de eluição é inversamente proporcional a massa molecular. Proteínas com diâmetros pequenos penetram nos poros das partículas do leito de resinas diminuindo suas velocidades médias relativas e aumentando seus tempos de eluição, as moléculas ou proteínas maiores, por sua vez, recebem uma menor influência dos poros, como não conseguem penetrar em todo o volume dos poros das partículas, são eluídas primeiro. A cromatografia por exclusão de tamanho se apresenta como um indispensável passo na separação e purificação de proteínas e biopolímeros (Zhiguo Li et al, 1998). Porém, segundo Janson (1998), o método mostra dificuldades de obtenção de frações puras ao processar misturas contendo proteínas com massa molares próximas.

A cromatografia de exclusão de tamanhos ainda é usada com uma importante ferramenta para a separação preparativa e também em larga escala de macromoléculas. Comercialmente esta etapa consiste em um ou mais ciclos em um processo de separação e purificação de biomoléculas. Devido ao fato de que os tipos de fase estacionária usada na cromatografia de exclusão de tamanhos não apresentam fortes ligações com o soluto durante a separação, o volume de líquido é bem menor comparado com outros tipos de cromatografia, como por exemplo, cromatografia em fase reversa e cromatografia de troca iônica.





**Figura 3.1** - Esquema de uma cromatografia por exclusão de tamanhos de uma mistura de macromoléculas globulares.

### 3.4.1 Seletividade e Resolução de Separação.

Diferente do que acontece com outro tipo de matriz (cromatografia de troca iônica ou fase reversa), a seletividade de matrizes de filtração em gel não é ajustável ou modifica-se mudando a composição da fase móvel (contanto que esta mudança não influencie na forma do soluto ou na estrutura de poro). Dessa forma, a seletividade do gel é uma propriedade inerente do material, e o volume de separação da coluna está limitado pelas características da matriz ou suporte usado, como por exemplo, o volume total de poros no leito.

A capacidade de separação em colunas cromatográficas por exclusão de tamanhos pode ser caracterizada por uma variável independente denominada de coeficiente de distribuição,  $K_e$ , que é calculada a partir do volume de eluição, também chamado de volume de retenção.

$$K_e = \frac{V_r - V_0}{V_i} = \frac{V_r - V_0}{V_t - V_0} \quad (3.1)$$

Onde  $V_r$  é o volume de retenção ou eluição,  $V_t$  é o volume de líquido total no leito,  $V_0$  é o volume nulo que corresponde ao valor do volume total dos espaços vazios entre as partículas e  $V_i$  é o volume de poro.

O gráfico de  $K_e$  versus o logaritmo da massa molecular ( $\log M_r$ ) resultará em uma curva de seletividade sigmoidal que segundo Janson (1998), pode ser aproximada por

$$K_e = a - b \cdot \log M_r \quad (3.2)$$

A relação  $a/b$  é relacionada ao tamanho de poro médio e uma distribuição de tamanho de poro estreita resultará em uma alta seletividade (valor alto de  $b$ ).

De acordo com Gu (1995), O coeficiente de distribuição,  $K_e$ , é semelhante ao fator de exclusão de tamanho,  $F_{ex}$ .

$$F_{ex} = \frac{\varepsilon_p^a}{\varepsilon_p} \quad (3.3)$$

Onde  $\varepsilon_p^a$  é a porosidade da partícula acessível à proteína e  $\varepsilon_p$  é a porosidade total da partícula.

### 3.4.2 Volume de Poro do Suporte

O volume de poro de material  $V_i$  pode ser calculado subtraindo-se o volume nulo  $V_0$  do volume líquido total  $V_t$ . O volume do sólido ou da matriz  $V_s$  é obtido subtraindo-se o volume líquido total do volume geométrico da coluna  $V_c$ . O volume de poro relativo do gel é expresso por:

$$V_{i,rel} = \frac{V_i}{(V_s + V_i)} = \frac{V_t - V_0}{V_c - V_0} \quad (3.4)$$

Um baixo volume de poro resultará em um baixo volume de separação da coluna. A Tabela 3.4 mostra características de algumas colunas já empacotadas com resinas comerciais de alta resolução para separação de proteínas e peptídeos.

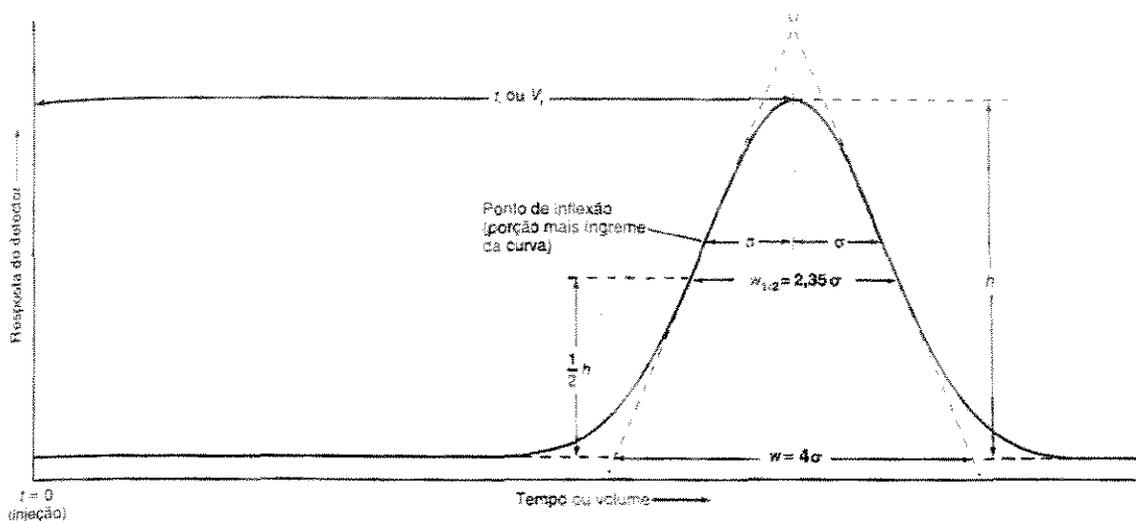
**Tabela 3.4** características de colunas empacotadas com resinas comerciais de alta resolução para separação de proteínas e peptídeos.

Matriz Coluna pré-empacotada	Material	diâmetro da partícula ( $10^3$ m)	Faixa pra solutos Globulares ( $M_r \times 10^3$ )	Porosidade da Partícula [ $V_i/(V_i+V_s)$ ]	Permeabilidade ( $V_t/V_0$ )	Fração de vazios ( $V_0/V_c$ )	Fase Móvel
Superdex peptídeo	Agarose dextrana	13	0,1-7		1,2		
Superdex 75	Agarose dextrana	13	3-70		1,6		
Superdex 200	Agarose dextrana	13	10-600		1,7		
Superose 12	Agarose	10	1-2000	0,84	1,84	0,30	
Superose 6	Agarose	13	5-40000	0,93	1,87	0,33	0,05 M fosfato + 0,15 M NaCl pH7,0
TKS SW 2000	Sílica	10	0,5-60	0,66	0,95	0,39	
TKS SW 4000	Sílica	11	5-1000	0,89	1,40	0,39	0,05 M Tris HCl + 0,15 M $\text{Na}_2\text{ClO}_4$ pH7,5
Bio-Sil SEC 125	Sílica	5,10	5-100				
Bio-Sil SEC 250	Sílica	5,11	10-300				
Fractogel TSK HW-55S	Polímero de Vinil	25-40	1-1000	0,96	2,17	0,31	0,08 M fosfato + 0,32 M NaCl pH7,0 20% Etanol 25 mM Tris-HCl +0,3 NaCl pH7,5

### 3.4.3 Eficiência de Separação.

Dois fatores contribuem para uma boa separação. Um é a diferença nos tempos de eluição entre os picos: quanto mais afastados, melhor é a separação. O outro é o alargamento dos picos: quanto mais largo for o pico, pior será sua separação.

Quando o soluto se move por uma coluna cromatográfica sua tendência é dispersar numa forma gaussiana com um desvio padrão  $\sigma$ . Quanto mais tempo um soluto fica na coluna, mais larga se torna a banda  $w$ . As medidas relativas à forma gaussiana para um pico de eluição podem ser vistos na figura 3.2.



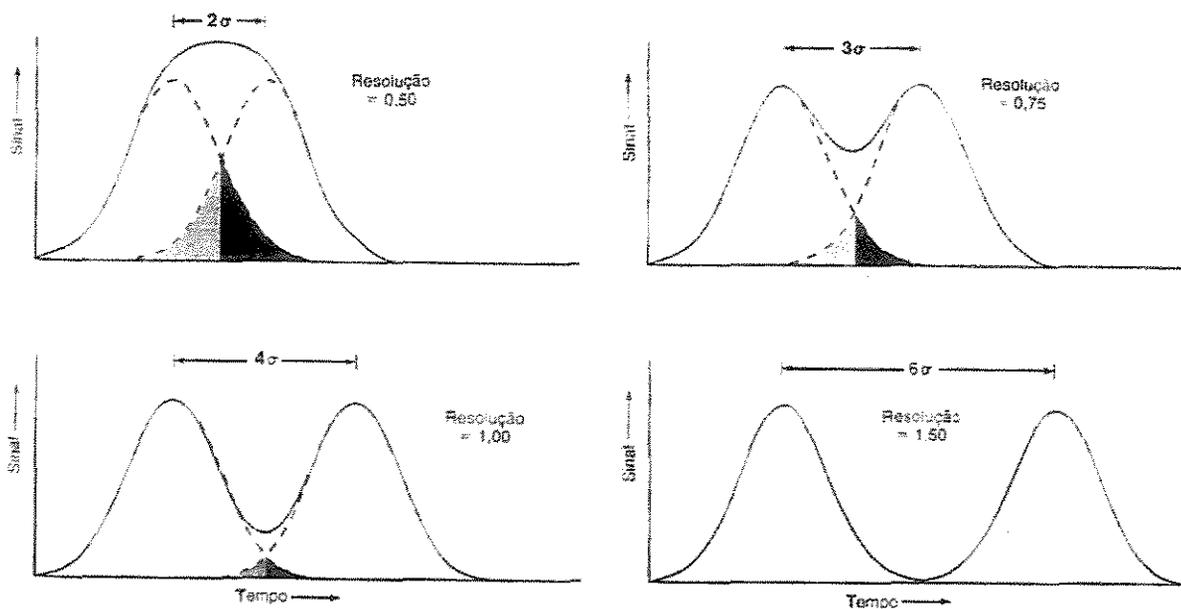
**Figura 3.2** Cromatograma gaussiano ideal mostrando como são medidos  $w$  e  $w_{1/2}$ , Harris, D. C., (1999).

A equação abaixo define a resolução de dois picos,

$$\frac{\Delta t_t}{w_{med}} = \frac{\Delta V_t}{w_{med}} \quad (3.5)$$

Onde  $\Delta t_t$  ou  $\Delta V_t$ , é a separação entre os picos, podendo ser em unidades de tempo ou volume, e  $w_{med}$  é a largura média dos dois picos nas unidades correspondentes. Para

análise quantitativa é altamente desejável uma resolução maior que 1,5, como pode ser observado na Figura 3.3.



**Figura 3.3** Resolução de picos gaussianos de áreas e amplitudes iguais, mostrando resoluções de 0,5, 0,75, 1,0 e 1,5 com completa separação, Harris, D. C., (1999).

### 3.4.4 Altura de Pratos Teóricos.

Como relatado anteriormente a máxima seletividade na filtração em gel é diretamente afetada pela distribuição dos tamanhos de poros, enquanto que a eficiência é afetada apenas pelas condições hidrodinâmicas. Por isso existe a preocupação de descrever com exatidão o fenômeno que controla o alargamento dos picos. Uma forma de quantificar a eficiência de colunas cromatográficas é a altura de pratos teóricos  $H$ .

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{(V_R / \sigma)^2} = L \left( \frac{w_b}{4V_t} \right)^2 \tag{3.6}$$

Onde:  $H$  é a altura equivalente de pratos teóricos,  $N$  é o número de pratos por altura de coluna  $L$  e  $w_b$  é a base do pico correspondente a uma distribuição gaussiana relativa a  $4\sigma$ .

Uma das equações mais aplicadas à medição da altura de pratos em colunas cromatográficas é a equação de van Deemter que foi apresentada por Giddings and Mallik (1966), adaptada para cromatografia por exclusão de tamanhos. A equação é apresentada na forma:

$$H = A + B/u + Cu \quad (3.7)$$

Na Equação acima o termo  $A$  reflete a influência dos múltiplos percursos difusionais do soluto. O segundo termo, o coeficiente  $B$ , descreve os efeitos da dispersão axial do soluto e finalmente o terceiro termo é referente às condições de equilíbrio no processo de separação devido às velocidades intersticiais do fluido,  $u$  é a velocidade instesticial do flúido dada em cm/min. A equação de van Deemter é apresentada com algumas modificações quando aplicada à separação protéica, devido ao baixo valor dos coeficientes de difusão destas macromoléculas. Assim a Equação (3.7) é apresentada da seguinte forma

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\left(0,6D_m + \gamma_s D_m \left(\frac{V_r}{V_0} - 1\right)\right)}{u} + \frac{V_0}{V_t} \left(1 - \frac{V_0}{V_r}\right) d_p^2 \frac{u}{30\gamma_s D_m} \quad (3.8)$$

Onde  $D_m$  é o coeficiente de difusão do soluto na fase móvel,  $V_0$  é o volume de vazios do leito de partículas,  $V_r$  é o volume de eluição,  $\lambda$  corresponde a um fator de forma,  $\lambda = 1$  para esferas,  $\gamma_s$  é um fator de obstrução nos poros e  $d_p$  é o diâmetro das partículas.

### 3.4.5 Taxa Ótima de Escoamento.

A taxa máxima de escoamento que pode ser aplicada em uma coluna cromatográfica usando resina de exclusão de tamanho é limitada pelas condições físicas e físico-químicas, tanto da coluna como da características da resina em uso. O escoamento de líquido permeado através da coluna gera uma perda de carga no leito que pode ser descrita segundo a equação de Hagen e Poiseuille:

$$\Delta P = u \cdot \frac{L \cdot \eta}{d_p^2} \cdot \frac{(1 - \varepsilon)^2}{\varepsilon^3} \cdot k \cdot 36 \quad (3.9)$$

Onde  $\Delta P$  é a perda de carga em Pa,  $u$  é a velocidade superficial do fluido em cm/min,  $\eta$  é a viscosidade do solvente,  $L$  é a altura do leito de partículas,  $d_p$  é a média do diâmetro das partículas do leito,  $\varepsilon$  é a porosidade do leito, e  $k$  corresponde a um fator de forma que para esferas pode ser considerado igual a 5.

Perdas de carga anormalmente altas podem ser causadas por saturação de filtros, conexões ou tubos devido à precipitação da amostra ou de material particulado.

A velocidade superficial ótima pode ser limitada pelos baixos coeficientes de difusão das macromoléculas. Estes coeficientes podem ser obtidos com o equilíbrio entre a fase móvel e a fase estacionária que é conseguido diminuindo a distância de transferência do soluto (reduzindo o tamanho de partícula do leito), aumentando o tempo de transferência disponível (reduzindo a taxa de fluxo do solvente), e com o aumento da velocidade de transferência (aumentando a difusividade com o aumento da temperatura). A velocidade ótima de fluido intersticial pode ser obtida pela diferenciação da equação (3.8) com relação à velocidade do fluido  $u$ , que resulta em:

$$u_{otm} = \frac{D_m \cdot \gamma_s}{d_p} \sqrt{60 \cdot \left( \frac{2}{3 \cdot \gamma_s \cdot \frac{V_0}{V_r} \cdot \left(1 - \frac{V_0}{V_r}\right)} + \left(\frac{V_R}{V_0}\right)^2 \right)} \quad (3.10)$$

Na Equação 3.10 a difusividade  $D_m$  de proteínas globulares pode ser derivada da formula dada por Tanford (1961).

$$D_{25,H_2O} \approx 2,6 \cdot 10^{-5} M_R^{-1/3} \quad (3.11)$$

A Equação (3.10) mostra que um fluxo ótimo é proporcional à difusão na fase móvel e inversamente proporcional ao tamanho da partícula. Na prática a velocidade superficial ótima  $u_{otm}$  é altamente influenciada pela velocidade intersticial no leito observando-se assim uma velocidade real  $u_p$  dada por:

$$u_p = \frac{D_m \cdot \gamma_s}{d_p} \cdot \frac{60 \cdot \lambda}{\frac{V_0}{V_r} \cdot \left(1 - \frac{V_0}{V_r}\right)} \quad (3.8)$$

Onde  $\lambda$  corresponde a um fator de forma,  $\lambda = 1$ ,  $\gamma_s$  é um fator de obstrução nos poros,  $\gamma_s = K_e/4$  e  $V_0/V_r(1-V_0/V_r) = 0,23$ , assim a equação (3.8) pode ser reduzida a

$$u_p = 65 \cdot K_e \cdot \frac{D_m}{d_p} \quad (3.9)$$

A Tabela 3.5 mostra valores da velocidade nominal do fluido de acordo com a equação (3.9) para uso na cromatografia por exclusão de tamanhos.

**Tabela 3.5** Valores da velocidade nominal do fluido na cromatografia por exclusão de tamanhos para valores de massa molecular.

Massa Molecular do Solute (g/mol)	Difusividade <sup>a</sup> (cm <sup>2</sup> /s).10 <sup>7</sup>	Velocidade Nominal do Fluido <sup>b</sup> (cm/h) para partículas de tamanho na faixa de 10 <sup>3</sup> m								
		2	5	10	15	20	35	50	75	100
500	32.80	639	256	128	85	64	37	26	17	13
1000	26.00	507	203	101	68	51	29	20	14	10
5000	15.20	296	119	59	40	30	17	12	8	6
10000	12.10	235	94	47	31	24	13	9	6	5
15000	10.50	206	82	41	27	21	12	8	5	4
50000	7.06	138	55	28	18	14	8	6	4	3
75000	6.17	120	48	24	16	12	7	5	3	2
100000	5.60	109	44	22	15	11	6	4	3	2
200000	4.45	87	35	17	12	9	5	3	2	2
300000	3.88	76	30	15	10	8	4	3	2	2
400000	3.53	69	28	14	9	7	4	3	2	1
600000	3.08	60	24	12	8	6	3	2	2	1

<sup>a</sup> Calculado pela equação (3.7) assumindo o soluto como proteínas globulares

<sup>b</sup> Calculado a partir da equação (3.9) com  $K_d = 0,5$  e  $D_m \approx D$

### 3.4.6 Sistemas de Cromatografia Contínua

Ultimamente as operações de processamento na indústria de separação química têm visado a melhoria da qualidade de seus produtos, principalmente quando refere-se ao rendimento. Em todos os casos a eficiência dos processos de separação tem um impacto importante na qualidade e no custo final dos produtos. Porém, várias situações que envolvem a separação de componentes químicos similares ou a remoção de produtos que estão presentes em baixas concentrações estão sujeitos a reduzidas eficiências de separação quando são usadas as técnicas de separação como destilação, cristalização ou extração por solvente. Para estes casos de difícil separação pelas técnicas convencionais a adsorção se apresenta como uma técnica eficaz, gerando produtos de alta pureza e alta eficiência de separação.

A descoberta de novas drogas e o desenvolvimento da indústria farmacêutica levou à comercialização de vários isômeros puros. Surgiu assim a

necessidade de se produzir e purificar quantidades comerciais destes compostos a um custo razoável. A destilação não é uma opção para a separação de misturas isoméricas, e a resolução por cristalização é normalmente difícil e cara. A UOP (United Oil Products) tem aplicado industrialmente, desde os anos 60, a tecnologia de adsorção em contracorrente, em um processo conhecido como UOP Sorbex®. Esta tecnologia emprega o conceito de "Leito Móvel Simulado" (LMS) ou "Simulated Moving Bed" (SMB), existindo mais de 100 unidades licenciadas pela UOP no mundo, sendo que as principais aplicações usadas para esse processo são apresentadas na Tabela 3.6, (Gattuso, 1995). A tecnologia de LMS possui um grande potencial para solução dos problemas de separação encontrados nas áreas de fármacos, química fina e biotecnologia. As vantagens inerentes aos processos contínuos são então válidas para o SMB, tais como aumento de flexibilidade e um nível constante na qualidade dos produtos. Além, disso, o processo de LMS leva também a uma pureza e recuperação dos produtos desejados (Gattuso, 1995; Keller, 1995).

**Tabela 3.6** - Unidades industriais do processo Sorbex®.

<b>Nome comercial</b>	<b>Sistema a ser separado</b>	<b>Nº de unidades licenciadas</b>
Parex	p-xileno de misturas de xilenos	53
Molex	n-parafinas de hidrocarbonetos cíclicos	33
Olex	Olefinas de parafinas	5
Cymex	p- ou m-cymeno de misturas de cymenos	1
Cresex	p- ou m-cresol de misturas de cresois	1
Sarexz	Purificação de frutose	5
Citrex	Purificação de ácido cítrico	1

Fonte: Ganetsos e Barker, 1994.

Desde 1964, sistemas cromatográficos contínuos têm sido utilizados em escala industrial principalmente nas indústrias petroquímicas (Processos SORBEX e

PAREX, desenvolvidos pela United Oil Products), e de processamento de açúcares (Corbett e Burke, 1996). A tecnologia do LMS tem sido também estudada e aplicada a produtos de química fina Ganetsos e Barker, (1994) e de origem biotecnológica Yamamoto et al (1992), especialmente na separação de enantiômeros. O LMS apresenta vantagens econômicas em relação aos outros sistemas cromatográficos em batelada por diversas razões: é um processo contínuo e permite separar a partir de uma mistura compostos similares, permitindo altas produções e baixo consumo de solvente. Em geral nesse tipo de sistema o volume de adsorvente requerido é aproximadamente 25% do requerido na cromatografia em batelada (Gottschlich et al, 1996). Especificamente para a purificação de enzimas o LMS foi utilizado para o estudo da purificação de quimotripsina bovina por Gottschlich et al. (1996). Mais recentemente, Gottschlich e Kasche (1997) aplicaram o LMS à purificação de anticorpos monoclonais.

Como esquematizado na Figura 3.2, o LMS utiliza uma série de colunas de adsorção (oito colunas ou doze colunas, por exemplo), contendo um adsorvente apropriado. As colunas são conectadas a recipientes que contêm a solução com o soluto e o eluente e que recebem as correntes de saída do produto através de linhas controladas por um conjunto de válvulas de posições múltiplas. Esse conjunto de válvulas controladoras permite que sejam alternados, em intervalos de tempo regulares, os pontos de entrada da alimentação, do eluente e das correntes de saída. O sistema troca, portanto, as posições entre os pontos de entrada e saída, simulando assim o escoamento em contracorrente da fase líquida com a fase sólida.

A separação binária de sistemas protéicos também foi estudada com êxito utilizando técnicas de cromatografia contínua tipo LMS. Em um de seus trabalhos, Lucena (1999) simulou, utilizando técnicas computacionais a separação da  $\alpha$ -Lactalbumina e  $\beta$ -Lactoglobulina em LMS apresentando perfis de eluição que comprovam a potencialidade da técnica.

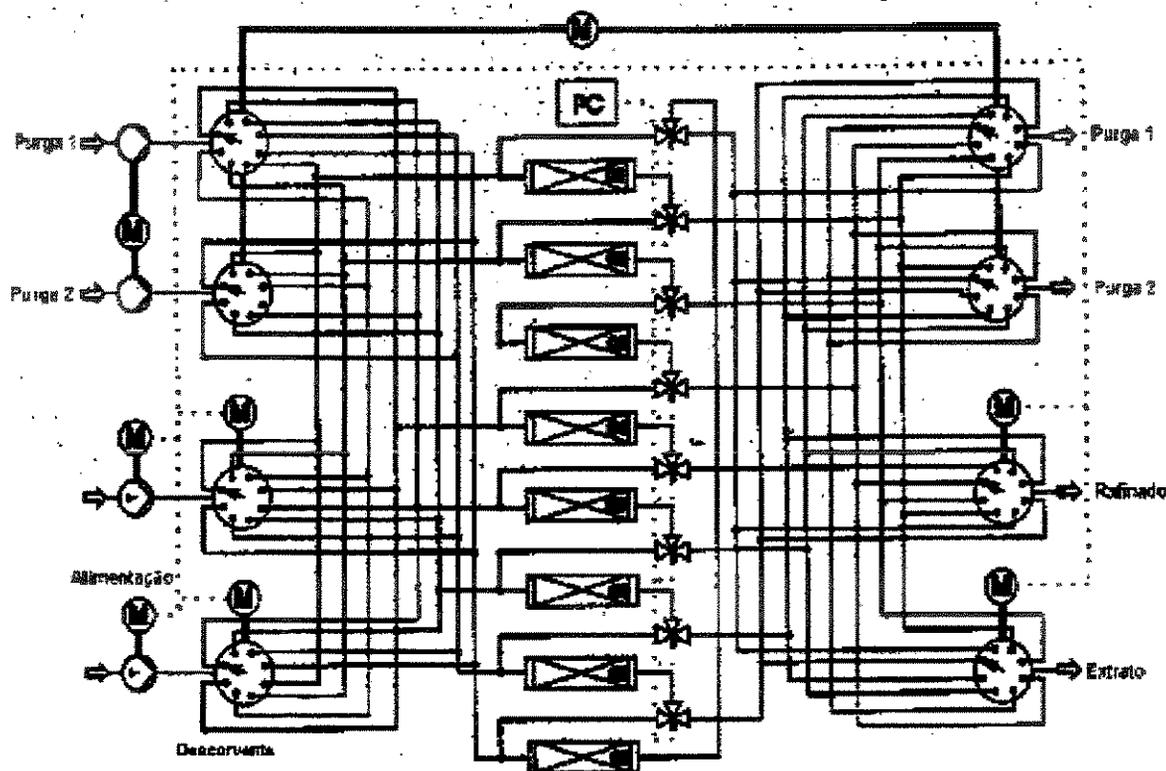


Figura 3.2 - Esquema de um sistema de Leito Móvel Simulado

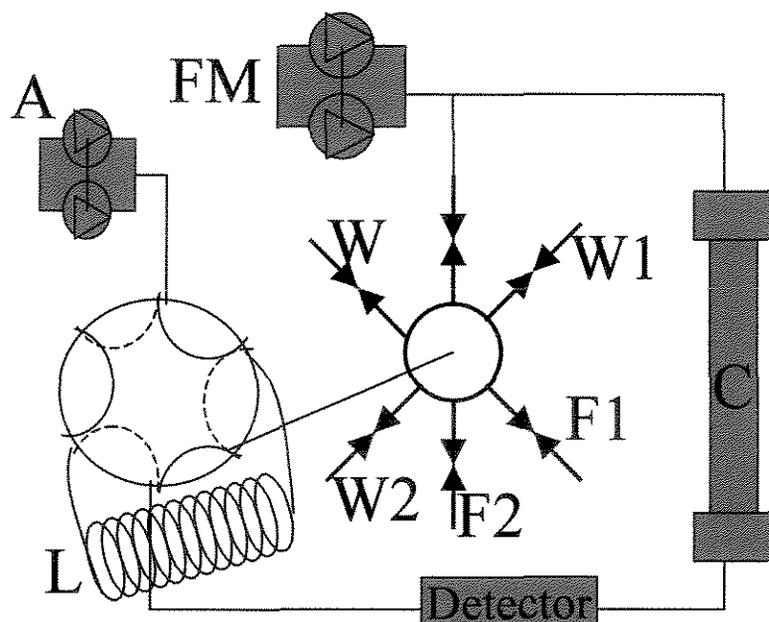
### 3.5 ALTERNATIVA AOS SISTEMAS DE CROMATOGRAFIA CONTÍNUA USANDO SISTEMAS DE RECICLO EXTERNO ESTACIONÁRIO (REE)

A cromatografia preparativa em batelada empregando técnicas de reciclo tem se mostrado um meio efetivo de separar enantiômeros intermediários visto que é grande a necessidade de intermediários quirais puros de fármacos na indústria farmacêutica. Porém, nesse tipo de cromatografia, quando é requerida alta taxa de produção, são usadas grandes quantidades de solvente. Como resultado, o custo operacional do uso da cromatografia preparativa em batelada é alto e freqüentemente se apresenta inviável economicamente (Francotte et al, 1997).

Nos últimos anos, a separação de enantiômeros em cromatografia por leito móvel simulado (LMS) cresceu em comparação à cromatografia preparativa em batelada, a principal razão, quase sempre, é devido à necessidade do maior uso de solvente na cromatografia preparativa em batelada quando comparada com a cromatografia em LMS para a separação de uma mesma quantidade de racêmicos, além disso, o custo operacional neste último é significativamente menor que no primeiro. Nos casos onde se tem a fase estacionária de baixa resolução para enantiômero, a taxa de produção, normalmente, será maior com o uso da cromatografia em SMB, Schulte et al (1997), Francotte et al (1998). A desvantagem principal do uso da cromatografia por SMB é o custo de instalação. Sistemas de SMB são significativamente mais caros o que pode, em certos casos, inviabilizar o investimento (Grill and Miller, 1998).

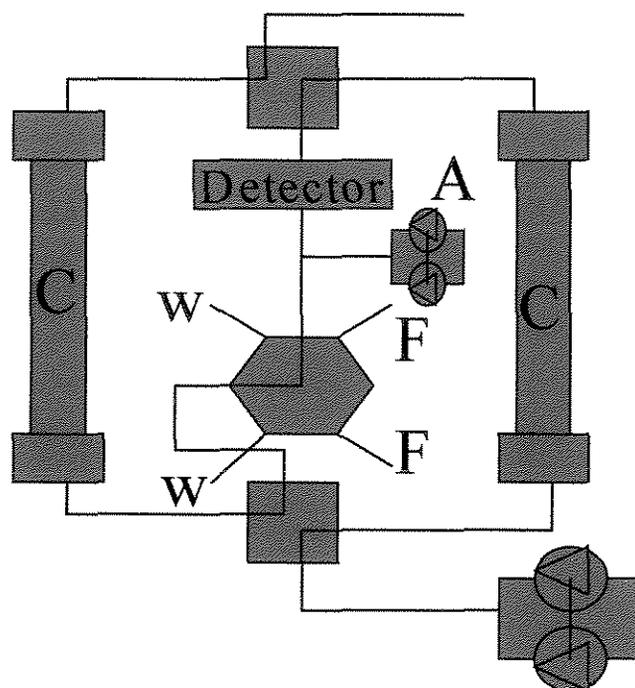
Grill and Miller (1998), apresentaram o desenvolvimento de um processo cromatográfico em estado permanente, para um sistema binário semelhante ao LMS. Neste trabalho, este novo processo é denominado reciclo externo estacionário em circuito fechado com injeção periódica intra-perfil (REE em circuito fechado). O REE e o LMS são técnicas de cromatografia binárias em estado permanente. Por outro lado o LMS é um sistema verdadeiramente contínuo enquanto o REE é um sistema repetitivo, porém descontínuo. Assim como no LMS, no REE em circuito fechado a amostra é injetada junto ao perfil cromatográfico circulante, e são coletadas duas frações no início e no final do perfil. Os eventos (tais como coleta da fração 1 na primeira extremidade do perfil, injeção de amostra e coleta da fração 2 na segunda extremidade do perfil) acontecem a cada ciclo em seqüência. O típico processo REE em circuito fechado é na verdade um processo de cromatografia preparativa em batelada de alto desempenho que foi modificado pela inclusão de uma válvula de reciclo (usada para recircular a fração ainda não separada do perfil cromatográfico através de um "loop") e uma válvula de injeção (usada para injetar amostra nova no ponto apropriado do perfil de eluição da coluna). Porém, diferente do seu trabalho anterior, Grill and Miller (1998), uma só coluna foi usada, o que limita a possibilidade

de aumento de escala, a Figura 3.3 mostra o esquema do equipamento utilizado por Grill and Miller (1998).



**Figura 3.3** - Esquema do equipamento utilizado por Grill et al (1998), para separação de enantiômeros. A - Bomba Cromatográfica de alimentação; FW - Bomba Cromatográfica de solvente; W, W1, W2 – Rejeitos; F1, F2 – Amostras.

Mecanismos subjacentes do Reciclo Externo Estacionário de circuito fechado foram estudados por Grill and Miller (1998), usando a separação de um intermediário de racêmico farmacêutico, sendo constatado que a criação de um perfil cromatográfico em estado estacionário é crucial para obter frações de alta pureza. A estrutura do perfil em estado estacionário é controlada pelo tamanho das frações coletadas e pela localização dos pontos de injeções. Os resultados obtidos por Grill em REE foram comparados a uma separação de LMS com o mesmo intermediário farmacêutico. Usando as mesmas fases estacionárias quirais e mesma fase móvel, a taxa de produção, pureza, e recuperações para as duas técnicas mostraram-se parecidas, mas com o REE foi usado um volume maior de fase móvel por grama de racêmico. Porém comparado com uma cromatografia convencional o REE apresentou menor volume de fase móvel.



**Figura 3.4** - Esquema do equipamento utilizado por Grill (1999), para separar misturas de metil e propil para hidroxibenzoatos. A - Bomba Cromatográfica de alimentação; W – Rejeitos; F – Amostras.

Em seu trabalho anterior, Grill and Miller (1998), usou o REE em duas colunas para separar misturas de metil-para-hidroxibenzoatos e propil-para-hidroxibenzoatos. O sistema SSR em duas colunas apresenta as mesmas características que os sistemas com uma coluna, porém, no lugar de um loop, onde é armazenada a fração a ser reciculada no sistema de uma coluna, no sistema de duas colunas esta fração já é enviada para a próxima coluna dando seqüência a uma nova separação e um novo ciclo. A Figura 3.4 apresenta um esquema do sistema SSR em duas colunas utilizado por Grill and Miller (1998).

Os custos de instalação de um REE de circuito fechado não se apresentam tão elevados quanto o observado na instalação de um sistema de cromatografia preparativa em batelada (HPLC). Mas eles são substancialmente abaixo dos observados na instalação de um sistema cromatográfico contínuo tipo LMS de capacidade de produção comparável.

### 3.6 DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR)

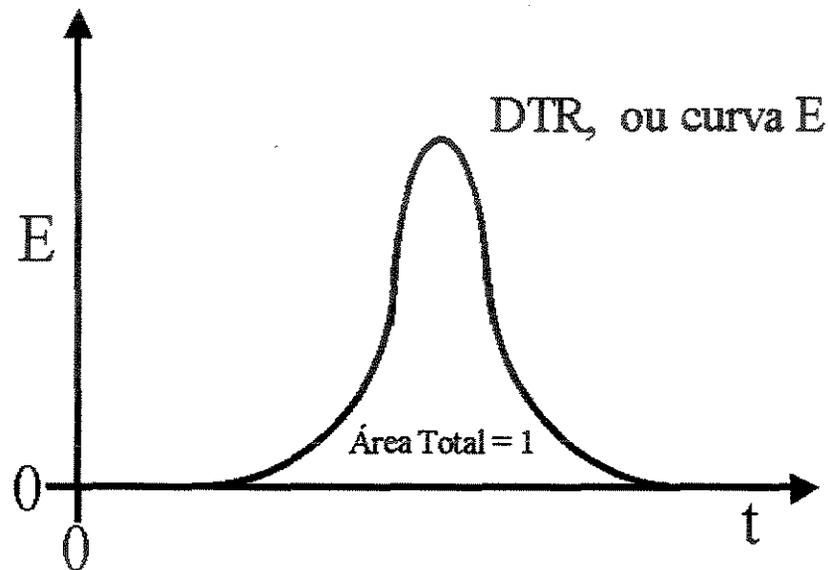
O teste de estímulo e resposta, Levenspiel (1974), é um método de investigação amplamente usado para saber por quanto tempo as moléculas individuais permanecem no interior do leito de partículas o que indica qual é a distribuição dos tempos de residência do fluido que está escoando no interior do leito de partículas numa coluna cromatográfica.

A distribuição desses diferentes tempos, que corresponde a diferentes caminhos feitos pelas moléculas do soluto no interior do leito de partículas na coluna cromatográfica, é denominada de distribuição de idade de saída,  $E$ , ou distribuição de tempo de residência (DTR) do fluido. O tempo (idade), neste caso, é utilizado para representar o intervalo de tempo que um elemento da corrente de fluido permaneceu no interior da coluna.

É conveniente representar a DTR do fluido de tal forma que a área sob a curva seja unitária, como apresentado na equação (3.10).

$$\int_0^{\infty} E(t) dt = 1 \quad (3.10)$$

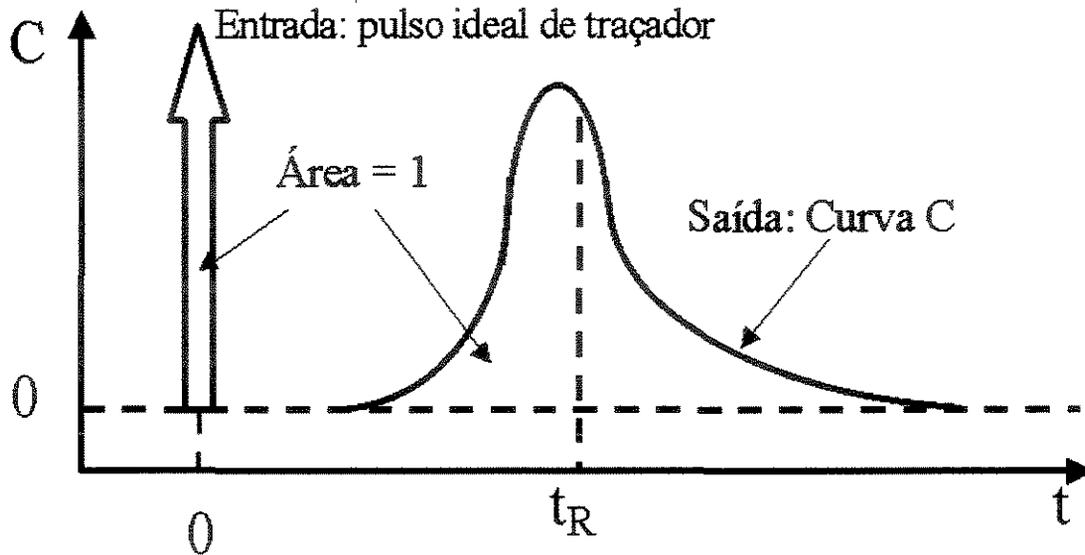
Este procedimento é denominado de normalização da distribuição. Na Figura 3.5 está representada a curva  $E$  de distribuição de tempo de residência de saída de um fluido escoando através de um leito de partículas numa coluna cromatográfica.



**Figura 3.5** - Curva de distribuição de idade de saída,  $E$ , para um fluido escoando através de um leito de partícula numa coluna cromatográfica.

Um estímulo pode ser a entrada de um traçador no fluido que entra na coluna cromatográfica, enquanto que a resposta é um registro do tempo do traçador que deixa a coluna. Qualquer substância que possa ser detectada e que não perturbe o escoamento na coluna, pode ser usada como um traçador. Alguns tipos de sinais de entrada podem ser utilizados, tais como: casual, periódico, em degrau e pulsante.

Introduzindo-se à entrada da corrente fluida o traçador na forma de um sinal pulsante ideal, tem-se o que é denominado de função delta de Dirac ou impulso. A resposta obtida na forma normalizada de curva  $C$ . A normalização é efetuada pela divisão de concentração medida pela vazão total  $Q$ . Na figura 3.6 está representada a curva  $C$  e suas propriedades.



**Figura 3.6** - Sinal típico da curva C, obtido como resposta a um sinal de entrada tipo pulso ideal.

Para relacionar E com C para o escoamento em regime permanente, é importante notar que a DTR para qualquer lote de fluido que entra deve ser a mesma que para qualquer lote que sai, para não contrariar a suposição de regime permanente. Se introduzirmos na coluna, no tempo  $t=0$ , um impulso de um fluido traçador, então a curva C registrará, para esse traçador, o instante no qual as moléculas saem da coluna. Isso quer dizer que a curva C representa a distribuição dos tempos de residência. Desde que a curva C representa a DTR para um lote particular de fluido que entra, ela pode também representar a DTR para qualquer outro lote, em particular. Dessa forma,  $C=E$ , e a curva C dá diretamente a distribuição dos tempos de residência.

### 3.6.1 Análise da Distribuição dos Tempos de Residência

Utilizando-se de procedimentos estatísticos, caracteriza-se a função de distribuição de tempos de residência (DTR) em termos de seus parâmetros tais como o tempo médio de distribuição, a dispersão do tempo médio e/ou cauda da distribuição. Os momentos da DTR são definidos da seguinte forma:

$$Mo_1 = \int_0^{\infty} t^{km} E(t) dt \quad (3.11)$$

onde  $km$  é a ordem do momento;  $km=1$  indica o tempo de retenção médio,  $t_R$ , e  $km=2$  indica a variância,  $\sigma^2$ , para o momento centrado em relação ao tempo de retenção médio. Dessa forma, o primeiro momento é representado pela expressão:

$$Mo_1 = t_R = \frac{\int_0^{\infty} tE(t) dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad (3.12)$$

o segundo por

$$\sigma^2 = Mo_2 - (Mo_1)^2 = \frac{\int_0^{\infty} (t - t_R)^2 C(t) dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad (3.13)$$

ou,

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} t^2 C(t) dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} - t_R^2 \quad (3.14)$$

onde  $\sigma^2$  é a variância, que representa o quadrado da amplitude da distribuição e tem dimensão de tempo ao quadrado.

As equações (3.13) e (3.14), podem ser representadas na forma discretizadas,

$$t_R = \frac{\sum_{i=1}^n t_i C_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n C_i \Delta t_i} \quad (3.15)$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 C_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n C_i \Delta t_i} - t_R^2 \quad (3.16)$$

### 3.6.2 Aplicação do Método dos Momentos

Pelos dados experimentais não é possível obter de forma direta a DTR, mas as respostas transientes de uma dada perturbação. A aplicação do método, se fundamenta no conhecimento dos momentos de primeira e de segunda ordem das curvas  $C(t)$ , uma obtida com a coluna sem o leito de adsorvente, e outra com a coluna contendo o leito, respectivamente.

A relação entre esses momentos nos fornece informações intrínsecas do sistema através das relações:

$$Mo_1 = Mo_{1,c} - Mo_{1,b} \quad (3.17)$$

$$\sigma_1^2 = \sigma_{1,c}^2 - \sigma_{1,b}^2 \quad (3.18)$$

As relações (3.17) e (3.18), fornecem respectivamente o tempo de retenção e a variância do sistema.

### 3.6.3 Modelo de Escoamento com Dispersão para Coluna Cromatográfica de Exclusão de Tamanhos

O modelo de dispersão é baseado no conceito de cromatografia, e envolve as fases estacionárias e móveis. A fase estacionária corresponde ao líquido no interior do adsorvente, e a fase móvel ao líquido no espaço intersticial às partículas.

O balanço de massa do soluto (traçador) na fase móvel é expresso pela equação (3.19), supondo que a geometria da partícula é esférica, e que o soluto não tem interação específica com o sólido adsorvente, Nakanishi e al (1977); Furusawa et al., (1976):

$$\varepsilon_b \frac{\partial C_b}{\partial t} = \varepsilon_b D_b \frac{\partial^2 C_b}{\partial r^2} - v \frac{\partial C_b}{\partial z} - \frac{3K_f}{R} (1 - \varepsilon_b) (C_b - C_s)_{r=R} \quad (3.19)$$

onde a equação acima descrita segue as seguintes condições de contorno

$$t = 0, z \geq 0 \Rightarrow C_b = C_s = 0 \quad (3.20)$$

$$0 \leq t \leq t_0, z = 0, C = C_0 \Rightarrow D_b \frac{\partial C_b}{\partial z} = v(C_b - C_0) \quad (3.21)$$

$$t > t_0, z = 0, C = 0 \Rightarrow D_b \frac{\partial C_b}{\partial z} = vC_b \quad (3.22)$$

$$z = L, \quad D_b \frac{\partial C_b}{\partial z} = 0 \quad (3.23)$$

onde que  $C_b$ (mg/mL) é a concentração de traçador na fase de líquido externa,  $C_s$  (mg/ml) é a concentração do traçador nos poros da fase estacionária,  $k_f$  (cm<sup>2</sup>/s) é o coeficiente de transferência de massa,  $z$  (cm) é a posição ao longo da altura do leito,  $\varepsilon_b$  é a porosidade do leito empacotado,  $D_b$  (cm<sup>2</sup>/s) é o coeficiente de difusão do soluto na partícula,  $v$  (cm/min) é a velocidade do fluido na coluna,  $r$  (cm) é a posição ao longo do raio da partícula e  $R$  (cm) é o raio da partícula . O balanço de massa na partícula é expresso por:

$$\varepsilon_p \frac{\partial C_i}{\partial t} = D_p \left( \frac{\partial^2 C_s}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_s}{\partial r} \right) \quad (3.24)$$

Do modelo físico utilizado, as seguintes condições de contorno são representativas

$$r = 0, \quad \frac{\partial C_s}{\partial r} = 0 \quad (3.25)$$

$$r = R, \quad K_f(C_b - C_s) = \varepsilon_p D_p \frac{\partial C_s}{\partial r} \quad (3.26)$$

O sistema de equações acima pode ser resolvido aplicando-se a transformada de Laplace (Furusawa et al., 1976). As derivadas de primeira e segunda ordem da solução, conforme o teorema de Van Der Laan (1957), representam os momentos de primeira e segunda ordem, de acordo com a expressão:

$$Mo_k = (-1)^k \left( \frac{\partial^k G(s)}{\partial s^k} \right)_{s=0} \quad (3.26)$$

Furusawa et al (1976) e Arnold et al (1985), apresentam como solução para os momentos as seguintes expressões:

$$Mo_1 = \frac{h}{u} (1 + \delta_0) + \frac{t_0}{2} \quad (3.27)$$

$$\sigma^2 = \frac{2h}{u} \left[ \delta_1 + \frac{D_b}{\varepsilon_b} (1 + \delta_0)^2 \frac{1}{u^2} \right] + \frac{t_0^2}{12} \quad (3.28)$$

Sendo que:

$$\delta_0 = \frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \varepsilon_p \left( 1 + \frac{\rho_p}{\varepsilon_p} K_a \right) \quad (3.29)$$

$$\delta_1 = \frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \varepsilon_p \left[ \frac{\rho_p K_a^2}{\varepsilon_p k_a} + \frac{R^2 \varepsilon_p}{15} \left( 1 + \frac{\rho_p}{\varepsilon_p} K_a \right)^2 \left( \frac{1}{D_b} + \frac{5}{k_f R} \right) \right] \quad (3.30)$$

A aplicação de um traçador que não seja adsorvido, ou seja,  $K_a=0$ , leva à simplificação das equações (18) e (19), resultando

$$MO_1 = \frac{h}{u_s} (\varepsilon_b + (1 - \varepsilon_b)\varepsilon_p) + \frac{t_0}{2} \quad (3.31)$$

$$\sigma^2 = \frac{2h}{u_s} \left\{ \frac{D_b}{(u_s)^2} [\varepsilon_b + (1 + \varepsilon_b)\varepsilon_p]^2 \right\} + \frac{t_0^2}{12} \quad (3.32)$$

Aplicando-se ao sistema (coluna empacotada com resina) dois traçadores distintos, ou seja, um que possa penetrar nos poros do adsorvente (substância com peso molecular pequeno, exemplo acetona) e outro que não possa penetrar nos poros do adsorvente (substância de alto peso molecular, exemplo dextrana-blue), pode-se obter a porosidade do leito,  $\varepsilon_b$ , e calcular a porosidade da partícula,  $\varepsilon_p$ , utilizando-se a equação (3.31).

### 3.6.4 Determinação do Coeficiente de Dispersão Axial da Coluna ( $D_b$ ) e do Coeficiente de Difusão do Solute na Partícula ( $D_p$ )

Da equação (3.16) o segundo momento central representa a variância do perfil de eluição a qual é relativo ao HETP ou à eficiência da coluna. Utilizando as transformadas de Laplace para as curvas de eluição, pode-se encontrar os valores do segundo momento na seguinte forma (Nakanishi et al, 1977)

$$M_{02} = \left( \frac{2z}{v_0} \right) \left[ \frac{D_b}{v^2} (1 + HK)^2 + \frac{HR^2K}{15} \left( \frac{1}{D_p} + \frac{5}{(K_fR)} \right) \right] \quad (3.33)$$

O valores de  $D_b/v$  e  $D_p$  são encontrados com o gráfico  $M_{02}/(2z/v)$  versus  $1/v$  com os valores dos coeficientes angular e linear respectivamente.

De acordo alguns autores o valor de  $D_p$  pode ser obtido de acordo com correlações originadas a partir dos valores da difusividade molecular ( $D_m$ ). Segundo Satterfield et al (1973), temos:

$$D_p = \frac{D_m}{\tau} (1 - 2,104\lambda + 2,09\lambda^3 - 0,95\lambda^5) \quad (3.34)$$

Onde,  $\tau$  é o fator de tortuosidade e  $\lambda$  é a razão do diâmetro molecular do soluto com o diâmetro do poro da partícula que segundo Janson e Rydém, (1998) é igual a  $(1 - \sqrt{K_f})$  considerando-se um modelo de poro cilíndrico onde o fator de tortuosidade  $\tau$  pode ser arbitrariamente substituído por  $1/\epsilon_p$ .

James (1998) mostrou que para sistemas protéicos (trabalho realizados com Lactoferrina e Lactoperoxidase) a influência do  $K_f$  na difusão nos poros de partículas adsorventes de resinas de troca iônica, pode ser desprezada, uma vez que ensaios de modelagem partindo de dados experimentais, mostram que os valores obtidos para  $D_p$  valores de  $K_f$  obtidos a partir da Equação (3.35) foram os mesmos quando admitindo  $K_f \rightarrow \infty$ , ou seja, a resistência no filme líquido para sistemas protéicos não influencia os valores obtidos para a difusão nos poros. A Tabela 3.7 e a Figura 3.7 mostram os resultados obtidos por James (1998).

$$K_f = \frac{2D_m}{d} + 0.31 \left( \frac{\mu}{\rho_c D_m} \right)^{\frac{2}{3}} \left( \frac{\Delta\rho\mu g}{\rho_c^2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (3.35)$$

$$D_m = 9.4 \times 10^{-10} \frac{T}{\mu(MM)^{\frac{1}{3}}} \quad (3.36)$$

**Tabela 3.7** Comparação dos valores de difusão nos poros assumindo que existe e que não existe resistência no filme líquido da partícula para as proteínas Lactoperoxidase e Lactoferrina.

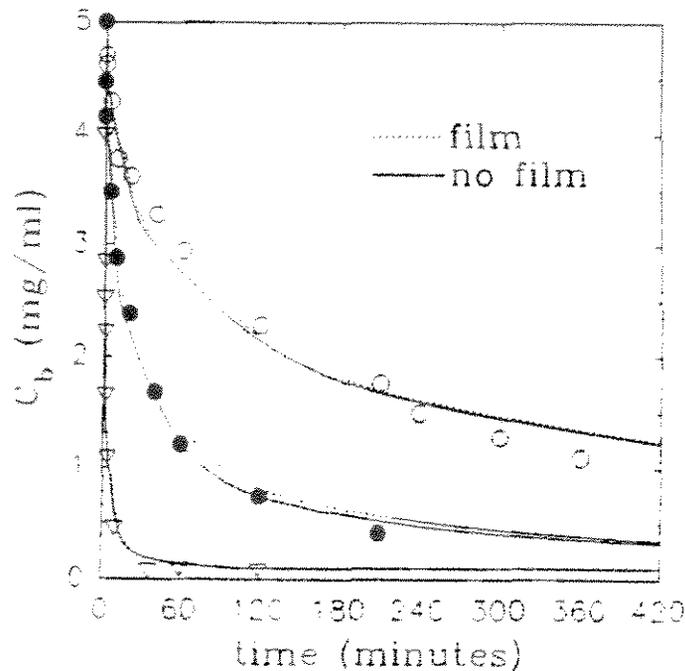
Resina	Lactoperoxidase				Lactoferrina		
	$K_m^a \times 10^4$ (cm/s)	$D_p^b \times 10^7$ (cm <sup>2</sup> /s)	$D_p^c \times 10^7$ (cm <sup>2</sup> /s)	Biot	$D_p^b \times 10^7$ (cm <sup>2</sup> /s)	$D_p^c \times 10^7$ (cm <sup>2</sup> /s)	Biot
Sepharose Big Beads	3,90	2,00	2,00	39,00	5,50	5,50	142,00
Sepharose Fast Flow	4,40	3,00	2,50	16,00	5,00	5,00	93,00
Sepharose High Performce	8,90	2,50	3,50	10,00	6,00	6,00	56,00

<sup>a</sup>  $K_m$  calculado a partir da equação (3.35)

<sup>b</sup> valor obtido assumindo que não existe resistência no filme líquido na partícula admitindo  $K_f \rightarrow \infty$

<sup>c</sup> valor obtido assumindo que existe resistência no filme líquido na partícula.

\* Valores obtidos através da referencia James (1998).



**Figura 3.7** Influência do  $K_f$  na difusão nos poros de partículas adsorventes de resinas de troca iônica

Figura obtida através da referencia James (1998).

## CAPÍTULO 4

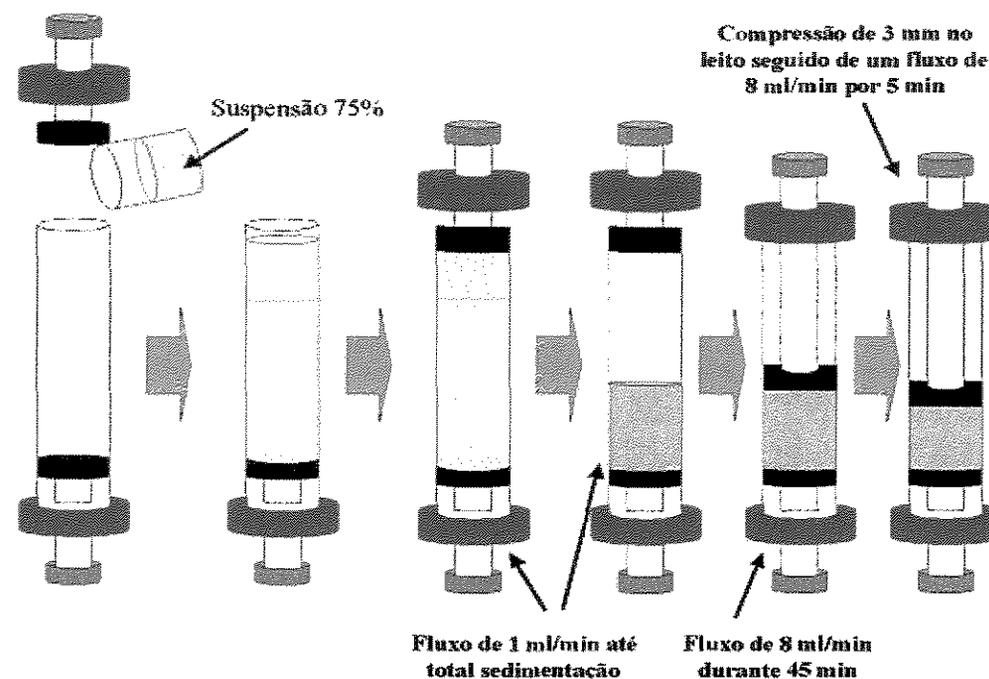
### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 EMPACOTAMENTO DAS COLUNAS UTILIZADAS NO REE

Os empacotamentos das colunas seguiram as instruções do manual do fabricante (Pharmacia Biotec-EUA) com algumas modificações.

- a) Com o pistão superior das colunas desmontados, foi medido o volume útil da coluna.
- b) Uma suspensão de 75% da resina em água foi preparada e homogeneizada.
- c) Essa suspensão foi colocada de uma única vez dentro da coluna.
- d) A base superior da coluna juntamente com o pistão superior foi colocada de forma a não comprimir a suspensão.
- e) Foi conectada na parte superior da coluna uma bomba de média pressão P-500 da Pharmacia Biotec-EUA, e foi mantido uma vazão de 1 ml/min até que toda a suspensão decantasse. Essa operação durou em média 2 hrs.
- f) O pistão foi acomodado na superfície do leito sedimentado, a vazão da bomba foi modificado para 8,0 mL/min (suficiente para manter um leitura de 3500 pa na bomba) durante 45 min.
- g) Após os 45 min, o pistão foi ajustado para comprimir 3 mm a partir da superfície do leito.
- h) Para finalizar, foi mantido uma vazão de 8 mL/min durante 5 min.
- i) O mesmo procedimento foi feito para a segunda coluna.

A figura 4.1 mostra um esquema da seqüência dos passos de empacotamento das colunas usada no sistema de REE.



**Figura 4.1:** esquema da seqüência dos passos de empacotamento das colunas usada no sistema de REE

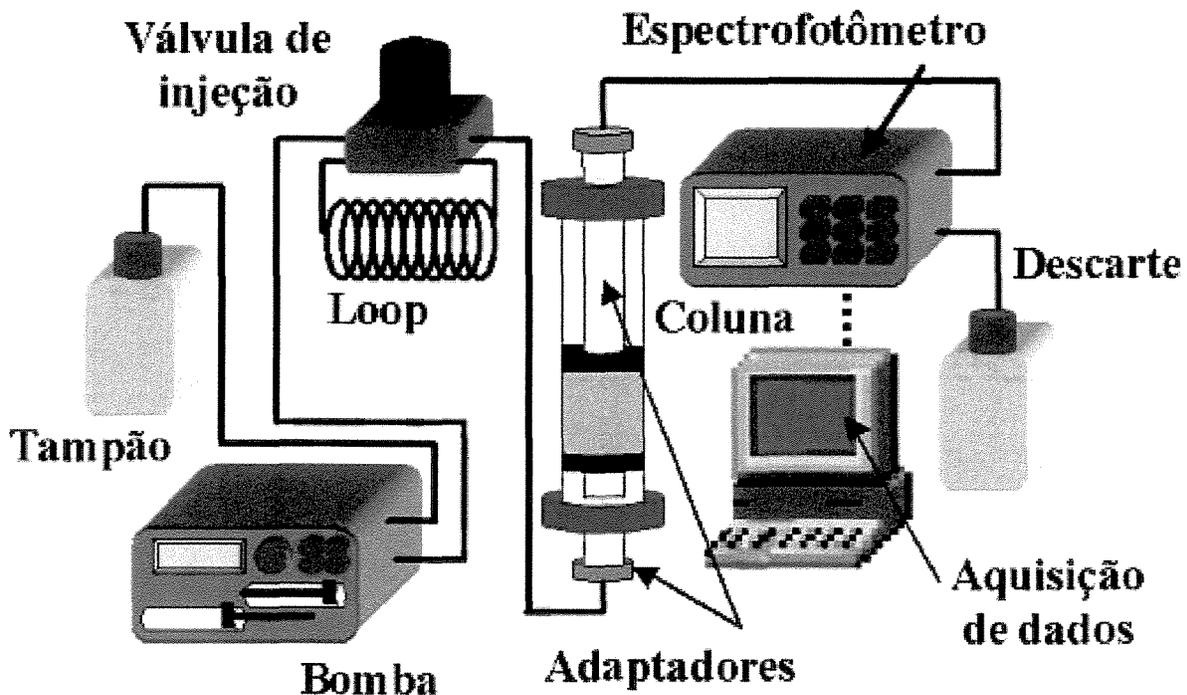
## 4.2 POROSIDADE DO LEITO E DA PARTÍCULA

Para um bom desempenho do sistema um dos principais pontos a ser avaliado é a boa condição das colunas cromatográficas. Assim, para não se ter grandes diferenças no perfil cromatográfico ao longo dos ciclos de processo, as semelhanças entre as colunas devem ser as melhores possíveis, considerando a altura do leito, forma de empacotamento, massa de resina e números de pratos teóricos.

Para a determinação da porosidade da partícula da matriz Sephadex G200<sup>®</sup>, utilizou-se o sistema mostrado na Figura 4.2. Utilizou-se o tampão fosfato 50 mM pH

6,5 com 1 M de NaCl, e os traçadores acetona (1%) e dextransa-blue de massa molar 2000000 g/g-mol (0,2%).

Após a montagem do sistema mostrado na Figura 4.3, mantendo-se os adaptadores móveis encostados (sem o leito de resina), e com o sistema de aquisição de dados e espectrofotômetro operando, injetou-se 200  $\mu\text{L}$  do traçador acetona 1%, para uma determinada vazão volumétrica  $Q$  (mL/min). Coletou-se o sinal  $V(\text{mV})$  de saída no espectrofotômetro correspondente à absorvância medida no comprimento de onda  $\lambda=265$  nm. Repetiu-se esta operação para um total de 5 vazões volumétricas. O mesmo procedimento foi executado com o traçador dextransa-blue, para as mesmas vazões volumétricas. A mesma coluna usada anteriormente foi empacotada com a resina sephadex G200<sup>®</sup>, formando-se um leito de altura  $h(\text{cm})$ . Condicionou-se a resina no tampão fosfato 50 mM com 1M de NaCl. Com o sistema de dados e espectrofotômetro operando, executou-se o mesmo procedimento anterior para os dois traçadores. As vazões volumétricas utilizadas também foram as mesmas.



**Figura 4.2** - Equipamentos utilizados para obtenção de dados relativos à técnica dos momentos

As absorvâncias medidas são proporcionais à concentração para valores menores que a injetada. Dessa forma, o primeiro momento foi calculado pela expressão:

$$M_{01}^v = \frac{\int_0^{\infty} tC(t)dt}{\int_0^{\infty} C(t)dt} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i C_i}{\sum_{i=1}^n C_i} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i (\Omega V_i)}{\sum_{i=1}^n t_i V_i} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i V_i}{\sum_{i=1}^n t_i V_i} \quad (4.1)$$

Onde  $M_{01}^v$  é o primeiro momento para o sistema sem a resina (coluna vazia com os dois adaptadores móveis encostados),  $t_i$  (min) é o tempo em que se mediu  $C(t)$ , a concentração de traçador na saída da coluna,  $\Omega$  é a constante de proporcionalidade entre a concentração do traçador e o valor do sinal  $V_i$  (mV) medido no espectrofotômetro no tempo  $t_i$ . Não há necessidade de construir-se uma curva de calibração relacionando absorvância do traçador versus a concentração do mesmo; basta utilizar a tensão medida.

O primeiro momento para o leito,  $M_{01}^S$ , quando a coluna está empacotada com a resina, foi calculado pela expressão:

$$M_{01}^S = \frac{\int_0^{\infty} tC(t)dt}{\int_0^{\infty} C(t)dt} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i C_i}{\sum_{i=1}^n C_i} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i (\Omega V_i)}{\sum_{i=1}^n t_i V_i} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i V_i}{\sum_{i=1}^n t_i V_i} \quad (4.2)$$

O primeiro momento para o leito,  $M_{01}^L$ , foi calculado fazendo-se a diferença entre os primeiros momento do sistema com a coluna empacotada,  $M_{01}^S$ , e *aquele sem a*

resina,  $M_{01}^V$ . De acordo com Arnold et al (1985) e Furusawa et al (1976). O primeiro momento é calculado pela expressão:

$$M_{01}^L = M_{01}^S - M_{01}^{vL} - \frac{t_0}{2} = \frac{h}{v_s} [\varepsilon_e + (1 - \varepsilon_e) \varepsilon_i] \quad (4.3)$$

Determinou-se a porosidade do leito de resina utilizando-se os dados obtidos com o traçador de alto peso molecular, dextrana-blue, visto que esta molécula não pode penetrar nos poros da partícula de resina. Neste caso a porosidade da partícula é tomada virtualmente como sendo  $\varepsilon_p=0$ , e a expressão para o primeiro momento do leito fica:

$$M_{01}^L = M_{01}^S - M_{01}^{vL} - \frac{t_0}{2} = \frac{h}{v_s} \varepsilon_e \quad (4.4)$$

que é a equação de uma reta com inclinação  $\varepsilon_e$ , e que representa a própria porosidade do leito de resina, que pode ser obtida a partir do gráfico de  $M_{01}^L$  versus  $h/v_s$ .

Dessa forma, a porosidade da partícula foi obtida com a utilização dos dados do traçador acetona, visto que este pode penetrar nos poros da partícula. O valor de  $[\varepsilon_b + (1 - \varepsilon_b) \varepsilon_p]$  corresponde à inclinação da reta obtida no gráfico de  $M_{01}^L$  versus  $h/v_s$ .

O mesmo procedimento usado para avaliar a porosidade do leito e da partícula foi utilizado para determinar os valores de  $D_b$  e  $D_p$  da Equação (3.33). Com o sistema de aquisição de dados e espectrofotômetro operando, injetou-se 200  $\mu\text{L}$  da proteína  $\alpha$ -lactalbumina para uma determinada vazão volumétrica  $Q$  (mL/min). Coletou o sinal  $V(\text{mV})$  de saída no espectrofotômetro. O sinal corresponde à absorbância medida no comprimento de onda  $\lambda=280$  nm. Repetiu-se esta operação para um total de 5 vazões

volumétricas. O mesmo procedimento foi executado com a proteína  $\beta$ -lactoglobulina, para as mesmas vazões volumétricas. A mesma coluna, já empacotada com a resina Sephadex G200<sup>®</sup>, formando-se um leito de altura  $h(\text{cm})$ . Condicionou-se a resina no tampão fosfato 50 mM pH 6,5. Com o sistema de dados e espectrofotômetro operando, executou-se o mesmo procedimento anterior para as duas proteínas. As vazões volumétricas utilizadas também foram às mesmas.

As absorbâncias, ou concentrações, medidas são proporcionais à variância do sistema de acordo com a equação (3.16), dessa forma temos:

$$M_{0_2}^P = \frac{\int_0^{\infty} (t - Mo_1)^2 C(t) dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} = \frac{\sum_{i=1}^n (t_i - Mo_1)^2 C_i}{\sum_{i=1}^n C_i} = \frac{\sum_{i=1}^n (t_i - Mo_1)^2 (\Omega V_i)}{\sum_{i=1}^n t_i (\Omega V_i)} = \frac{\sum_{i=1}^n (t_i - Mo_1)^2 V_i}{\sum_{i=1}^n t_i V_i} \quad (4.5)$$

$$M_{0_2}^P = \left( \frac{2z}{v_0} \right) \left[ \frac{D_b}{v^2} (1 + HK)^2 + \frac{HR^2 K}{15} \left( \frac{1}{D_p} + \frac{5}{(K_f R)} \right) \right] \quad (4.6)$$

Com o gráfico  $M_{0_2}^P/(2z/v)$  versus  $1/v$  temos valores que se aproximam de um modelo linear do tipo  $M_{0_2}^P/(2z/v) = a.1/v + b$ . Com os valores dos coeficientes angular (a) e linear (b) são calculados os valores de  $D_b/v$  e  $D_p$  pelas equações.

$$a = \frac{D_b}{v} (1 + HK)^2 \quad (4.7)$$

$$b = \frac{HR^2 K}{15} \left( \frac{1}{D_p} + \frac{5}{(K_f R)} \right) \quad (4.8)$$

Os valores de  $K_f$  foram encontrados de acordo com Geankoplis, (1993), com a seguinte equação usada para predizer a transferência de massa de uma fase líquida para a superfície de sólidos em sistemas agitados, Polson (1949).

$$K_f = \frac{2D_m}{d} + 0.31 \left( \frac{\mu}{\rho_c D_m} \right)^{\frac{2}{3}} \left( \frac{\Delta\rho\mu g}{\rho_c^2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (4.7)$$

$$D_m = 9.4 \times 10^{-10} \frac{T}{\mu(MW)^{\frac{1}{3}}} \quad (4.8)$$

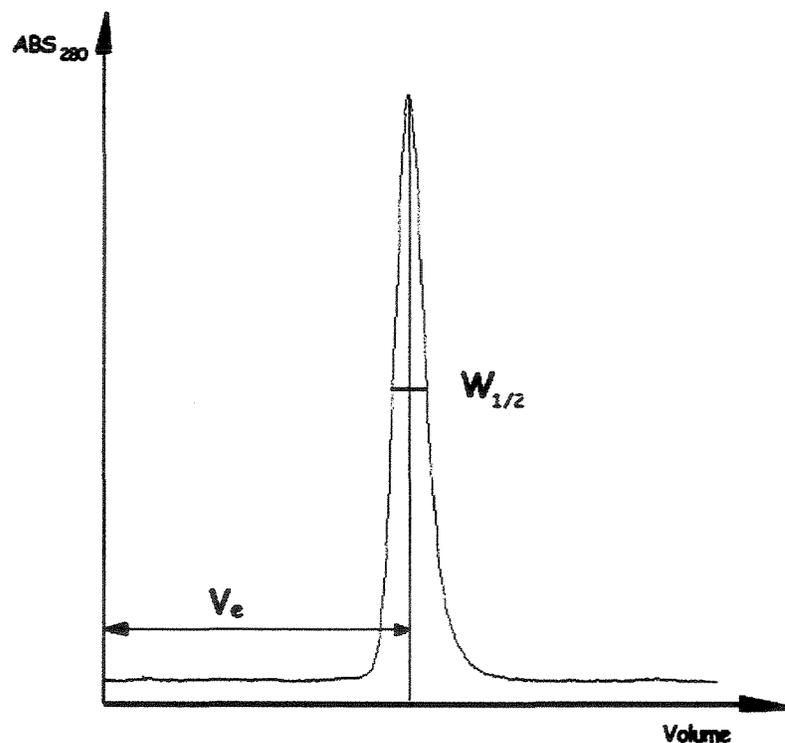
### 4.3 NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS DAS COLUNAS

Seguindo orientações do fabricante da resina (Pharmacia Biotec-EUA), após o empacotamento da coluna esta deverá ser submetida a um teste para identificação do número de pratos teóricos que corresponde à eficiência da coluna. Este procedimento determina se o empacotamento foi bem sucedido.

O teste foi realizado para as duas colunas empacotadas, utilizando a bomba P-6000, com uma velocidade superficial de 60 cm/h e uma injeção de um pulso de 0,20 ml de acetona. A resposta foi um pico, obtido pelo detector UV a 280 nm.

O número de pratos teóricos foi calculado segundo a equação abaixo de acordo com a Figura 4.3:

$$\frac{N}{m} = 5.54 \left( V_e / W_{\frac{1}{2}} \right)^2 \cdot \frac{1000}{L} \quad (4.9)$$



**Figura 4.3** - Exemplo de um resultado obtido da avaliação da eficiência da coluna usando o método descrito no manual do fabricante Pharmacia Biotech para a resina Shepadex G200<sup>®</sup>.  $V_e$  é o volume de eluição em mL,  $W_{1/2}$  é a largura do pico à 50% da sua altura em mm.

#### 4.4 SOLUÇÃO DO MODELO DE ADSORÇÃO EM COLUNAS CROMATOGRÁFICAS.

O modelo de escoamento em uma coluna cromatográfica com resina de exclusão de tamanhos, representados pelas Equações 3.19 e 3.24, juntamente com as respectivas condições de contorno (Equações 3.20 a 3.23, 3.25 e 3.26), foram reduzidas a um sistema de equações diferenciais ordinárias e algébricas, utilizando-se o método de colocação ortogonal conforme Finlayson (1980), Villadsen e Michelsen (1978), e Yao e Tien (1992) e Neves (1995).

De forma simplificada, a aplicação do método da colocação ortogonal envolve a escolha de um polinômio ortogonal para o qual são calculadas as raízes  $z_i$  e as matrizes de discretização  $A_{ij}$  e  $B_{ij}$ . A solução obtida para o sistema corresponde apenas a pontos discretos ao longo da dimensão radial da partícula de adsorvente, pontos estes que são definidos pelas raízes do polinômio ortogonal. O polinômio ortogonal usado foi o de Jacobi, cuja expressão é descrita em Villadsen e Michelsen (1978),

$$(1-x)^\alpha x^\beta P_n^{(\alpha,\beta)}(x) = \frac{(-1)^n \Gamma(\beta+1)}{\Gamma(n+\beta+1)} \frac{d^n [(1-x)^{n+\alpha} x^{n+\beta}]}{dx^n} \quad (4.10)$$

em que o índice  $n$  corresponde ao grau do polinômio,  $\Gamma(n)$  à função gama, e  $\alpha$  e  $\beta$  aos parâmetros da função peso definida pela equação:

$$W(x) = x^\beta (1-x)^\alpha \quad (4.11)$$

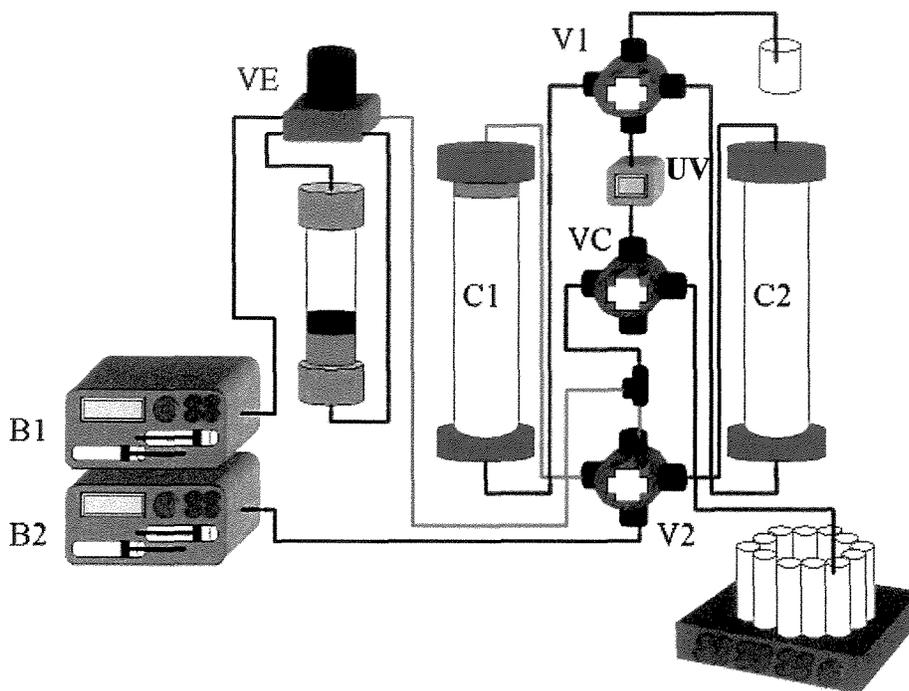
Dessa forma, para cada par de parâmetros  $(\alpha, \beta)$  escolhidos, corresponde uma série de polinômios ortogonais denotada por  $P_n^{(\alpha,\beta)}(x)$ .

A solução deste sistema de equações diferenciais e algébricas foi obtida simultaneamente, utilizando o método RUNGE KUTTA - GILL. A aplicação do método ortogonal e a solução do sistema de equações diferenciais foram implementadas num programa computacional em linguagem Fortran.

#### 4.5 RECICLO EXTERNO ESTACIONÁRIO (REE)

O reciclo externo em duas colunas já é conhecido desde 1974. A Figura 4.4 apresenta um esquema do sistema REE utilizado para o processamento de uma mistura

binária de  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, proteínas presentes no soro do leite bovino. Foi utilizado a resina de exclusão de tamanho, Gel Superdex 200<sup>®</sup> da Pharmacia Biotech que segundo Janson e Rydém (1998), apresenta resolução em uma faixa de massa molecular considerando proteínas globulares de massa molar 5 - 600000 g/g-mol. Os leitos fixos das colunas cromatográficas foram preparados segundo o fabricante e tendo ambas apresentadas  $N > 10000$  pratos teóricos por metro, de acordo com os cálculos realizados através da Equação 4.9.



**Figura 4.4:** Esquema do equipamento experimental usado para o processamento da mistura binária das proteínas  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina em REE. B1 e B2 são bombas cromatográficas líquidas de baixa e média pressão C1 e C2 são colunas de leito fixo de resina Sephadex G200 com 6,4 cm de altura e 2,6 cm de diâmetro V1 e V2 são válvulas de 4 vias para recirculação, VC é uma válvula de coleta de frações, VE é um válvula eletrônica para injeção de amostra e UV é um analisador em linha por absorvância de ultravioleta 280 nm.

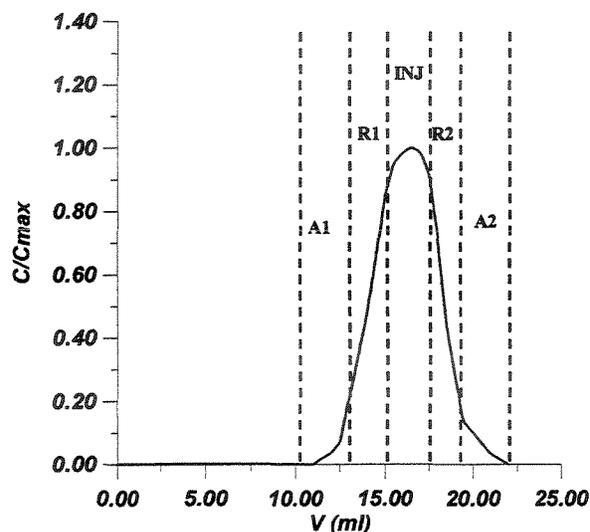
A seguir temos a seqüência de passos para um ciclo de processamento no REE:

- a) Inicialmente a solução tampão é bombeada pela bomba B1 para as colunas C1 e C2 interligadas em série pelas válvulas V1, VC e V2.
- b) A bomba B2 é acionada e a injeção da mistura binária é feita pelo acionamento da válvula VE, e as posições das válvulas V1 Vc e V2 dão as condições para a amostra ser introduzida na coluna C1. A válvula V1 também dá condições para direcionar o fluxo de saída da coluna C2 para o rejeito.
- c) No início do perfil cromatográfico a válvula V1 toma a posição para direcionar o fluxo de saída da coluna C1 para o analisador. A válvula VC toma a posição de coleta da 1º fração. A Bomba B2 é acionada mantendo o fluxo na coluna C2.
- d) Após a coleta da 1º fração, a válvula VC toma a posição inicial e envia o fluxo que sai da coluna C1 para a coluna C2, esta fração recirculada corresponde à primeira fração de reciclo. Neste momento a bomba B2 é desligada.
- e) Após o reciclo da 1º fração a V2 é colocada na posição de injeção do fluxo de amostra que vem bombeada pela bomba B2 através da válvula VE. A posição da válvula V1 esta ligando a fluxo que sai da coluna C1 para o analisador e ligando a saída da C2 para o rejeito.
- f) Após a injeção, a bomba B2 é desligada e tem início do 2º reciclo que corresponde ao fluxo que vem da coluna C1 e direciona para a coluna C2.
- g) Após o segundo reciclo a válvula VC é colocada na posição de coleta e tem-se o início da coleta da 2º fração que corresponde ao final do perfil cromatográfico que sai da coluna C1. Neste momento a bomba B2 é acionada mantendo o fluxo constante na coluna C2.
- h) Após a coleta da 2º fração, a V1 é posicionada para direcionar o fluxo da coluna C2 para o analisador; dessa forma a válvula VC mantém a mesma posição para coletar a 1º fração vinda da coluna C2 proveniente da 2º injeção (item “e”).
- i) No início do perfil cromatográfico da coluna C2 a válvula V1 toma a posição para direcionar o fluxo de saída da coluna C2 para o analisador. A válvula VC toma a posição de coleta da 1º fração. A Bomba B2 é acionada mantendo-se o fluxo na coluna C1.

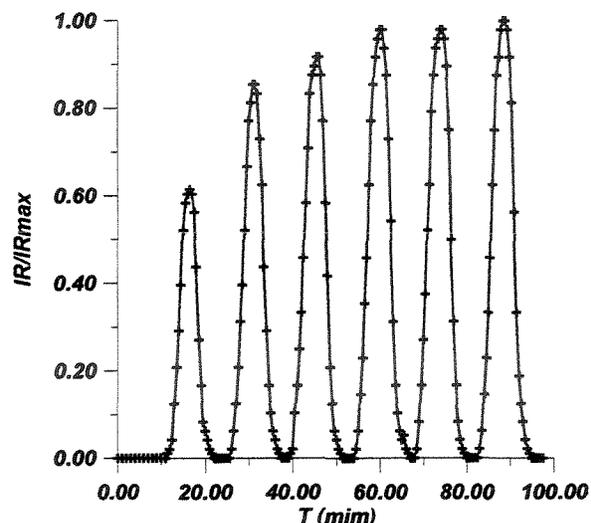
- j) Após a coleta da 1<sup>o</sup> fração, a válvula VC toma a posição inicial e envia o fluxo que sai da coluna C2 para a coluna C1, esta fração recirculada corresponde a primeira fração de reciclo. Neste momento a bomba B2 é desligada.
- k) Após o reciclo da 1<sup>o</sup> fração a V2 é colocada na posição de injeção do fluxo de amostra que vem bombeada pela bomba B2 através da válvula VE. A posição da válvula V1 esta ligando a fluxo que sai da coluna C2 para o analisador e ligando a saída da C1 para o rejeito.
- l) Após a injeção, a bomba B2 é desligada e tem-se o início do 2<sup>o</sup> reciclo que corresponde ao fluxo que vem da Coluna C2 que é direcionada para a coluna C1.
- m) Após o segundo reciclo a válvula VC é colocada na posição de coleta e tem-se o início da coleta da 2<sup>o</sup> fração que corresponde ao final do perfil cromatográfico que sai da coluna C2. Neste momento a bomba B2 é acionada mantendo-se o fluxo constante na coluna C1.
- n) Após a coleta da 2<sup>o</sup> fração, a V1 é posicionada para direcionar o fluxo da coluna C1 para o analisador, dessa forma a válvula VC mantém a mesma posição para coletar a 1<sup>o</sup> fração vinda da coluna C1 proveniente da 3<sup>o</sup> injeção (item “k”).
- o) A seqüência de passos a partir do passo 3 é repetida, trocando a seqüência das colunas de acordo com o número de ciclos desejados. Neste trabalho para cada experimento foram repetidos 16 vezes.
- p) Ao final de cada processo experimental foi mantido o fluxo da solução tampão nas colunas para retirar todo o excesso de material protéico. Após a estabilização do sinal do analisador, a solução foi trocada por água desionizada com 20% de etanol para acondicionamento das colunas.

A Figura 4.5 mostra um cromatograma característico de um ciclo de processamento da mistura das proteínas  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina no sistema de REE. É possível observar que a forma do cromatograma corresponde a uma distribuição normal, característica de cromatogramas obtidos por componentes puros.

A semelhança se deve ao fato das proteínas apresentarem características semelhantes e possuírem seus cromatogramas individuais intercalados e apresentando baixa resolução, como já discutido em 3.4.3.



**Figura 4.5** Cromatograma característico de um ciclo no processamento da mistura binária de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina em REE. Os valores são apresentados em concentração adimensional (Concentração total/concentração total máxima) em relação ao volume eluído em mL.



**Figura 4.6** Cromatograma característico de uma seqüência de 6 ciclos no processamento da mistura binária de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina em REE. Os valores são apresentados em porcentagem de Absorbância em relação ao tempo de eluição em min.

No cromatograma apresentado na Figura 4.5 são mostradas divisões por linhas tracejadas que identificam frações distintas, cada uma apresentando características diferentes.

Na Figura 4.6 é mostrado um exemplo do cromatograma das duas proteínas individuais onde a absorbância total resulta no cromatograma apresentado pela Figura 4.5. Dessa forma, as frações coletadas A1 e A2 são as frações mais ricas em  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, respectivamente.

As frações R1 e R2 são as frações onde as proteínas se apresentam misturadas, sendo que na fração R1 a concentração de  $\beta$ -lactoglobulina se apresenta em maior proporção. Da mesma forma, a fração onde a concentração de  $\alpha$ -lactalbumina tem maior proporção é a R2. Essas duas frações são recirculadas no processo, ou seja, elas são transferidas do ciclo(n) para o ciclo(n+1). Este procedimento é feito no passo 4 apresentado anteriormente.

A fração denominada por "T" também é recirculada do ciclo(n) para o ciclo(n+1). Porém, essa fração entra na próxima coluna juntamente com uma nova injeção de amostra não processada com o mesmo volume e mesma concentração da injeção anterior. Este procedimento é feito no passo 5 apresentado anteriormente.

#### 4.6 ALIMENTAÇÃO DO SISTEMA REE.

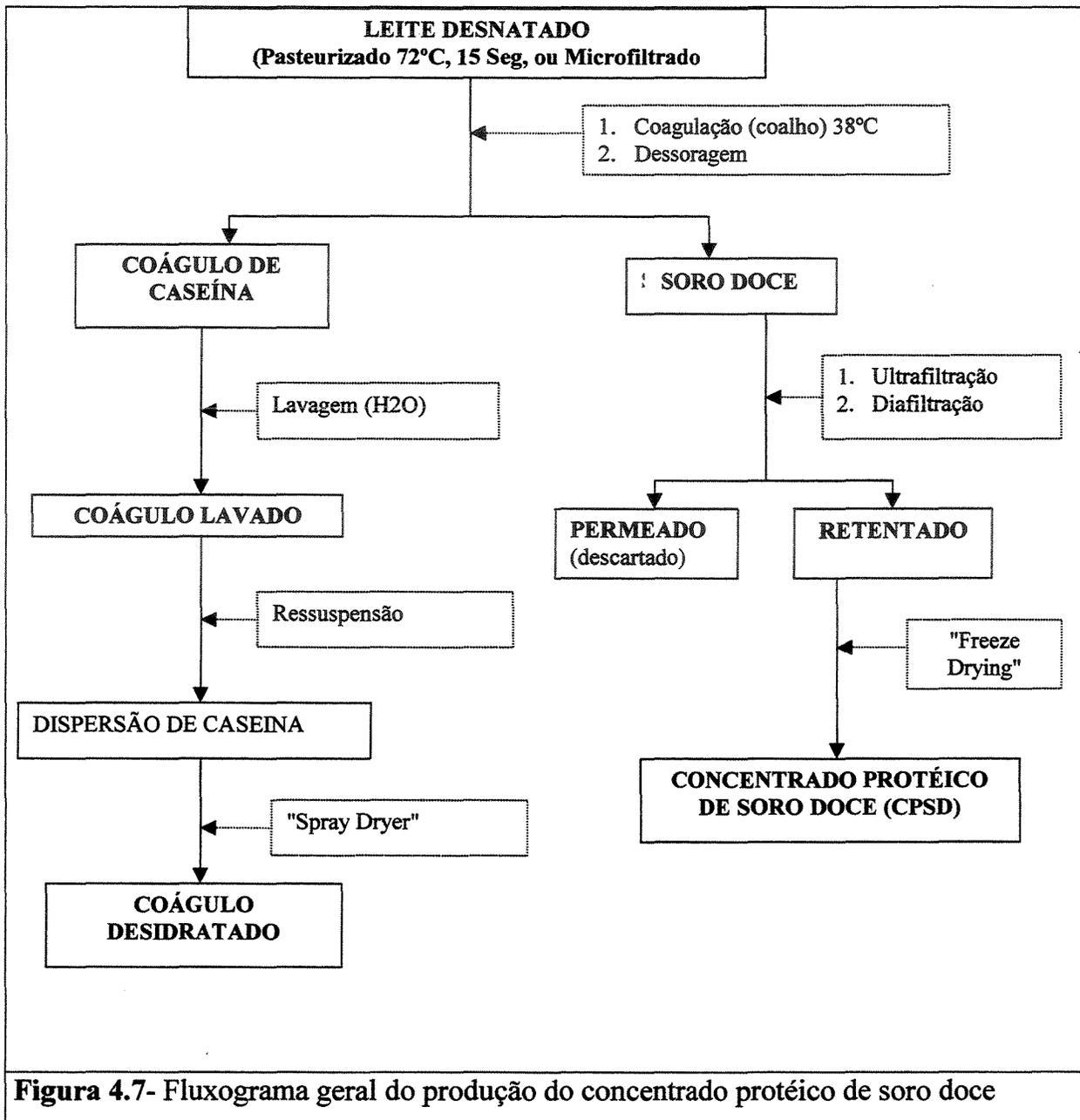
A alimentação dos testes experimentais no sistema de REE foi produzida sinteticamente por uma mistura das proteínas  $\alpha$ -Lactalbumina e  $\beta$ -Lactoglobulina, ambas produzidas comercialmente pela SIGMA<sup>®</sup>. Procurou-se manter a concentração dessas proteínas na alimentação similar aos valores de concentração encontrados no soro do leite bovino que é em média 1,5 mg/mL para a  $\alpha$ -Lactalbumina e 3,0 mg/mL para a  $\beta$ -Lactoglobulina.

Ainda sob forma experimental com o objetivo de obter frações puras de  $\alpha$ -Lactalbumina e de  $\beta$ -Lactoglobulina, foi testado como alimentação, um concentrado protéico do soro do leite bovino. O soro do leite e também seu respectivo concentrado foram produzidos em uma planta piloto do TECNOLAT, órgão do Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas. O leite já desnatado e pasteurizado a 72°C por 15 seg. foi estocado em tanques encamisados de aço inox e aquecido de 30°C para 35°C para uma coagulação prévia.

A adição do coalho (enzima quimosina) foi feita a uma concentração de 30 mL/100L leite juntamente com uma solução de 50% de  $\text{CaCl}_2$  em uma concentração de 25 mL/100L de leite. Após uma homogeneização deixava-se em repouso por um período de 40 min a 60 min para a coagulação.

O coágulo foi cortado para separação do soro, que foi estocado em um tanque inox de 200L, onde era aquecido a 37°C. Mantido a essa temperatura o soro foi submetido ao processo de ultrafiltração através de membranas de 10kDa de diâmetro de poro. Na ultrafiltração utilizou-se um fator de concentração de 8 a 10, o que era seguido de 12 ciclos de diafiltração. Após o término do processo, o soro concentrado foi acondicionado em bandejas, congelado em câmaras a -20°C e posteriormente submetido a desidratação por liofilização.

A Figura 4.7 mostra um fluxograma geral da produção do concentrado protéico de soro doce.



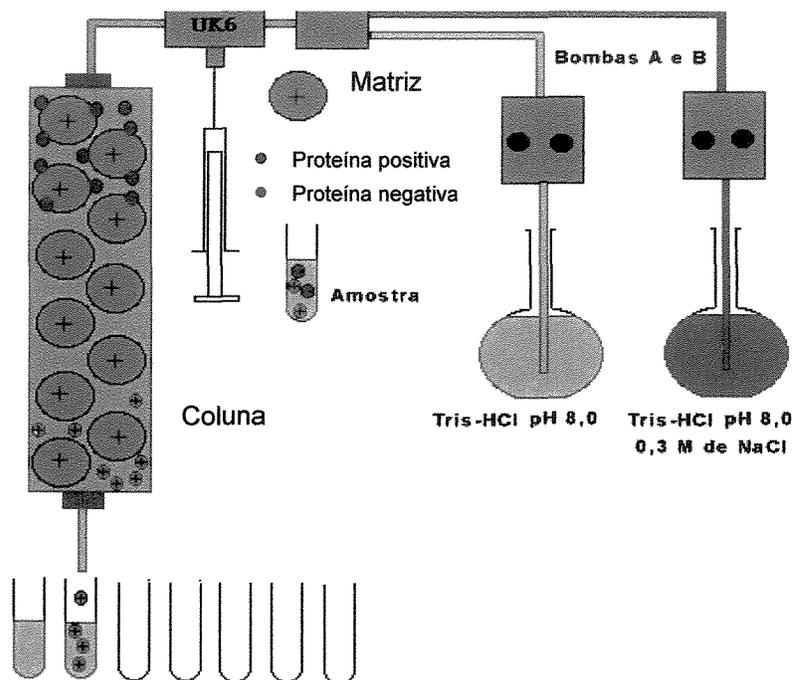
**Figura 4.7-** Fluxograma geral do produção do concentrado protéico de soro doce

#### 4.7 IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS

A pureza e o rendimento das frações coletadas foram medidas por cromatografia analítica em um HPLC modelo SHIMADZU. Amostras de 20 µl foram aplicadas em uma coluna de troca iônica analítica Mono Q 5/5 (Pharmacia Biotec-

EUA), equilibrada com tampão Tris-HCl a pH 8,0. A eluição foi feita com um gradiente linear partindo de zero a 0,30 M de NaCl no tampão original durante 25 min com vazão de 1 mL/min. As frações foram monitoradas por absorbância no UV a 280 nm.

A Figura 4.8 mostra um esquema do sistema cromatográfico para identificação das proteínas nas frações de  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina.



**Figura 4.8** - Esquema do sistema cromatográfico na identificação de proteínas

## CAPÍTULO 5

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 5.1 POROSIDADE DA RESINA SEPHADEX G200® E DO LEITO EMPACOTADO

Determinou-se a porosidade das partículas da Resina Sephadex G200 e do leito das duas colunas usadas através do método dos momentos, utilizando-se vazões volumétricas na faixa de 1,0 mL/min a 3,0 mL/min. Foram utilizadas duas colunas Pharmacia®, modelo XK-26 (2,6 cm de diâmetro). Procurou-se manter as duas colunas com um máximo de similaridade entre si, mantendo-se o leito de resina com altura  $h=6,4$  cm para ambas. Exemplos dos sinais  $V(mV)$  coletados no espectrofotômetro para a coluna 1, quando injetou-se o traçador, com a coluna vazia e com a coluna com o leito, é apresentado na Figuras 5.1 e 5.2, juntamente com os respectivos tempos de retenção medidos. Como era esperado, o tempo de retenção ( $t_r=1245,0$ ) para a coluna com o leito de resina é bem maior que o obtido quando a coluna estava vazia ( $t_r=49,9$ ). A Tabela 5.1 mostra os resultados das outras taxas volumétricas na obtenção dos valores do tempo de retenção para a coluna vazia. A tabela 5.2 apresenta os valores dos tempos de retenção obtidos para os traçadores acetona e Dextrana Blue seguindo o método dos momentos.

Nas Figuras 5.3 e 5.4 estão plotados os dados experimentais para as duas colunas usadas respectivamente, obtidos para os primeiros momentos relativos ao leito de resina usando os dois traçadores, bem como a equação da reta ajustada aos dados experimentais.

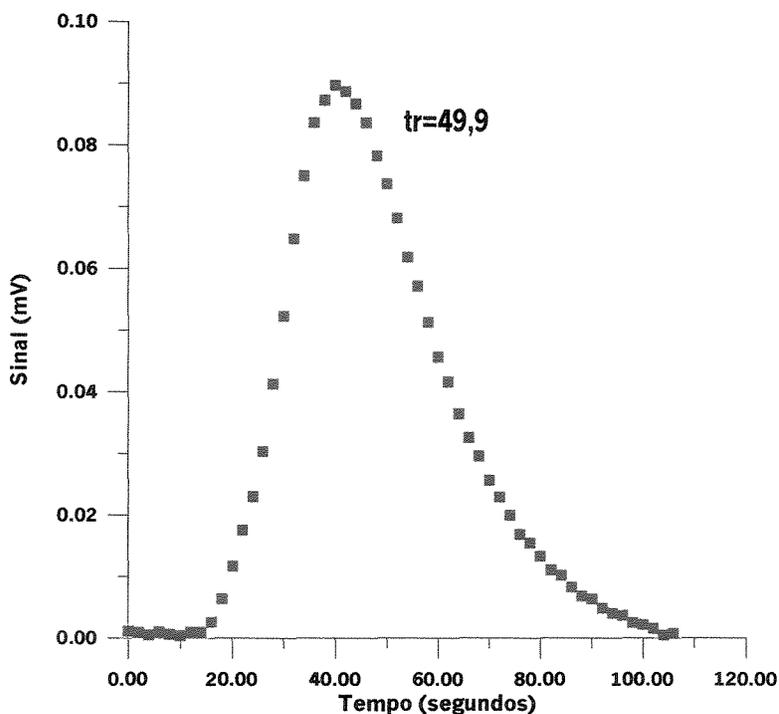


Figura 5.1 - Sinal (mV) coletado em função do tempo (s), para uma coluna vazia, usando o traçador acetona, e vazão volumétrica  $Q = 1,5 \text{ mL/mim}$ .

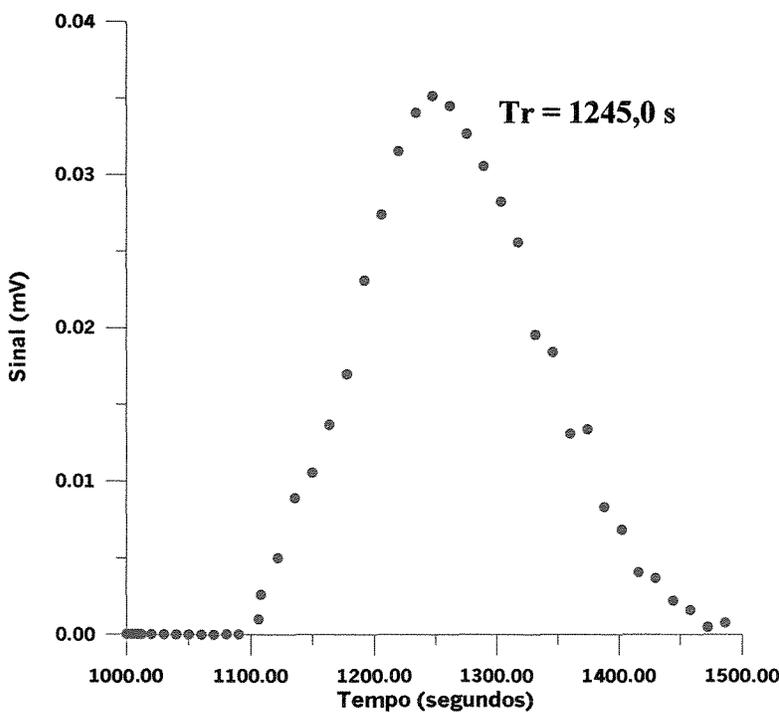


Figura 5.2 - Sinal (mV) coletado em função do tempo (s), para a coluna 1 com esta coluna empacotada com um leito de resina com  $h = 6,4 \text{ cm}$ , usando o traçador acetona, e vazão volumétrica  $Q = 1,5 \text{ mL/mim}$ .

**Tabela 5.1** - Valores do tempo de retenção para a coluna vazia

<b>Coluna Vazia (traçador acetona)</b>	
<b>F(ml/min)</b>	<b>M<sub>01</sub> (segundos)</b>
1.00	63
1.25	55
1.50	50
1.75	42
2.00	35
2.50	29
3.00	24

**Tabela 5.2** - Valores dos tempos de retenção obtidos para os traçadores acetona e Dextrana Blue seguindo o método dos momentos para as colunas 1 e 2 com  $h = 6,4$  cm

<b>v<sub>s</sub>(cm/s)</b>	<b>h/v<sub>s</sub> (s)</b>	<b>Coluna 1</b>		<b>Coluna 2</b>	
		<b>traçador acetona</b>	<b>traçador dextrana blue</b>	<b>traçador acetona</b>	<b>traçador dextrana blue</b>
		<b>M<sub>01</sub> (s)</b>	<b>M<sub>01</sub> (s)</b>	<b>M<sub>01</sub> (s)</b>	<b>M<sub>01</sub> (s)</b>
0.0031	2039	1868	734	1831	771
0.0039	1631	1494	587	1464	605
0.0047	1359	1245	503	1232	513
0.0055	1165	1067	420	1057	433
0.0063	1019	934	368	909	375
0.0078	816	747	289	685	292
0.0094	680	623	222	553	244

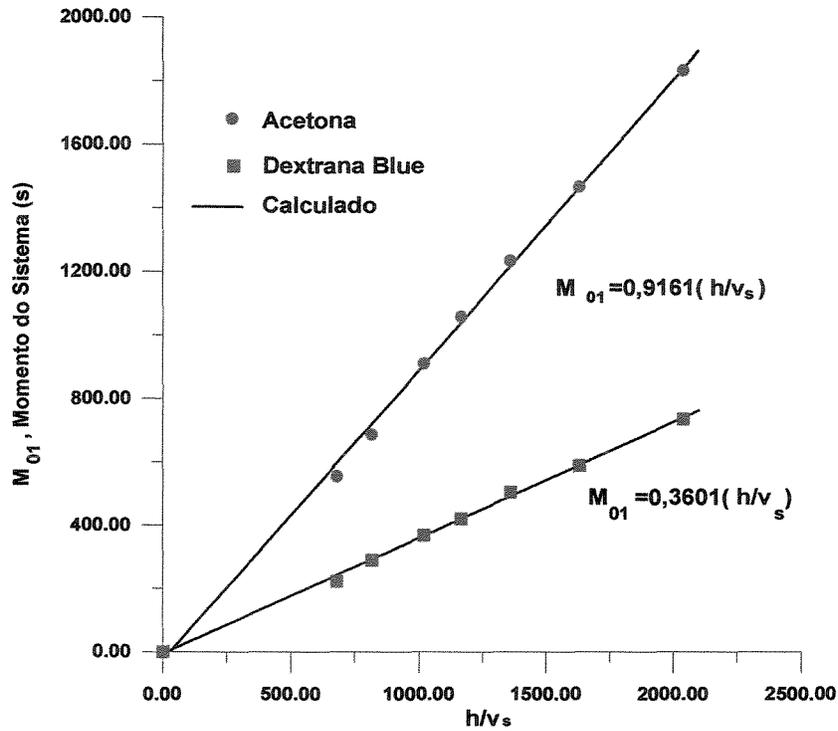


Figura 5.3 - Dados experimentais e calculados para os momentos do leito de resina, utilizando-se os traçadores acetona e dextrana blue para a coluna 1.

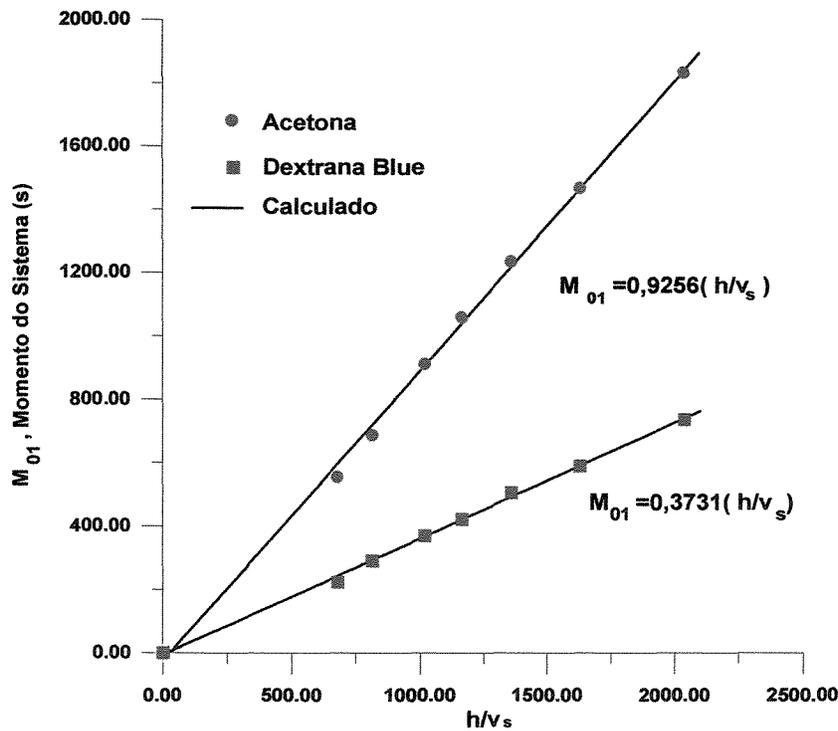


Figura 5.4 - Dados experimentais e calculados para os momentos do leito de resina, utilizando-se os traçadores acetona e dextrana blue para a coluna 2.

Para a coluna 1 a equação da reta ajustada aos dados experimentais dos momentos para o leito, usando o traçador dextrana blue, é:

$$M_{01} = 0,3601 \left( \frac{h}{v_s} \right) \tag{5.1}$$

onde a inclinação representa a própria porosidade do leito de resina,  $\varepsilon_e = 0,3601$ .

Para o traçador acetona, a equação da reta ajustada aos dados experimentais é:

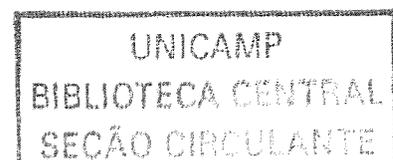
$$M_{01} = 0,9161 \left( \frac{h}{v_s} \right) \tag{5.2}$$

onde o valor da inclinação 0,9161 é equivalente a  $[\varepsilon_e + (1 - \varepsilon_e) \varepsilon_i]$ . Assim, com o valor obtida da porosidade do leito  $\varepsilon_e = 0,36$ , calcula-se o valor da porosidade da partícula de sendo  $\varepsilon_i = 0,87$ .

A Tabela 5.3 mostra todos os resultados calculados obtidos pelo método dos momentos para o cálculo da porosidade da partícula e do leito para as duas colunas empacotadas, assim como as equações da reta ajustada para cada caso.

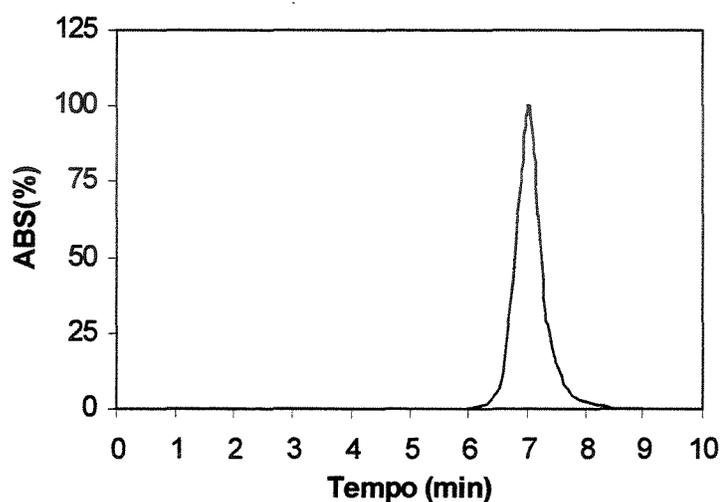
**Tabela 5.3** - Resultados do cálculo da porosidade da partícula e do leito para as duas colunas empacotadas mostrando as equações da reta ajustada.

	Coluna 1	Coluna 2
<b>Modelo dextrana Blue</b>	$M_{01}=0,3601(h/v_s)$	$M_{01}=0,3731(h/v_s)$
<b>Modelo Acetona</b>	$M_{01}=0,9161(h/v_s)$	$M_{01}=0,9256(h/v_s)$
<b>Porosidade do Leito (<math>\varepsilon_e</math>)</b>	0,36	0,37
<b>Porosidade da Partícula (<math>\varepsilon_i</math>)</b>	0,87	0,88

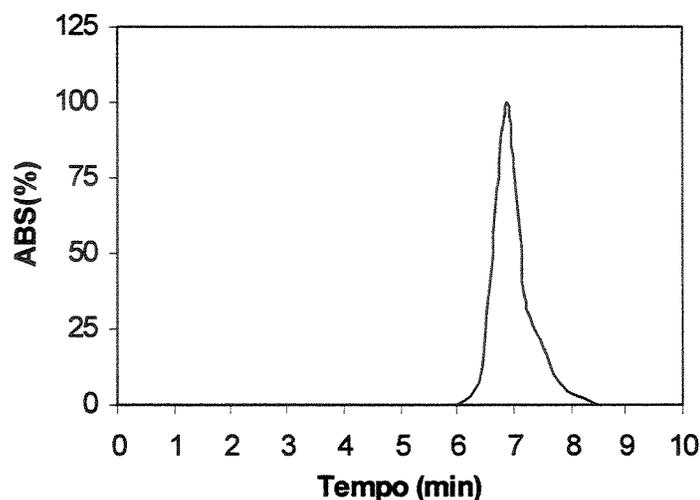


## 5.2 NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS DAS COLUNAS

O número de pratos teóricos foi calculado segundo a equação (4-9) de acordo com o manual do fabricante da resina. As Figuras 5.5 e 5.6 mostram o resultado desta avaliação onde os valores foram medidos em porcentagem de absorbância.



**Figura 5.5** Resultado da avaliação de eficiência com o cálculo do número de pratos teóricos por metro para a coluna 1. Onde ABS(%) corresponde a porcentagem de absorbância em ultravioleta 280 nm.



**Figura 5.6** Resultado da avaliação de eficiência com o cálculo do número de pratos teóricos por metro para a coluna 2. Onde ABS(%) corresponde a porcentagem de absorvância em ultravioleta 280 nm.

Os valores obtidos pelo teste de eficiência utilizando a equação (4-9) foram  $N \cong 13000$  e  $N \cong 11300$  para a coluna 1 e coluna 2, respectivamente. Apesar de apresentarem volumes de eluição  $V_e$  bem aproximados para ambas colunas, o valor de  $W_{1/2}$  para a coluna 2 mostrou-se um pouco maior que o encontrado para a coluna 1, fazendo com que o valor de  $N/m$  para a coluna 2 fosse menor que o encontrado para a coluna 1. Porém, segundo o fabricante, para valores de  $N/m$  acima de 10000 a coluna encontra-se bem empacotada, isenta de distúrbios que possam comprometer a separação. Na Tabela 5.4 encontra-se o resultado total do ensaio.

**Tabela 5.4** - Resultados do ensaio para cálculo do número de pratos teóricos por metro para as duas colunas usadas

	Coluna 1	Coluna 2
$H$ (cm)	6,4	6,4
$V_e$ (cm <sup>3</sup> )	7,0	6,9
$W_{1/2}$ (cm <sup>3</sup> )	1,7	1,8
$N/m$	13045	11306

### 5.3 CÁLCULO DO COEFICIENTE DE DISTRIBUIÇÃO $k_e$ PARA AS COLUNAS UTILIZADAS.

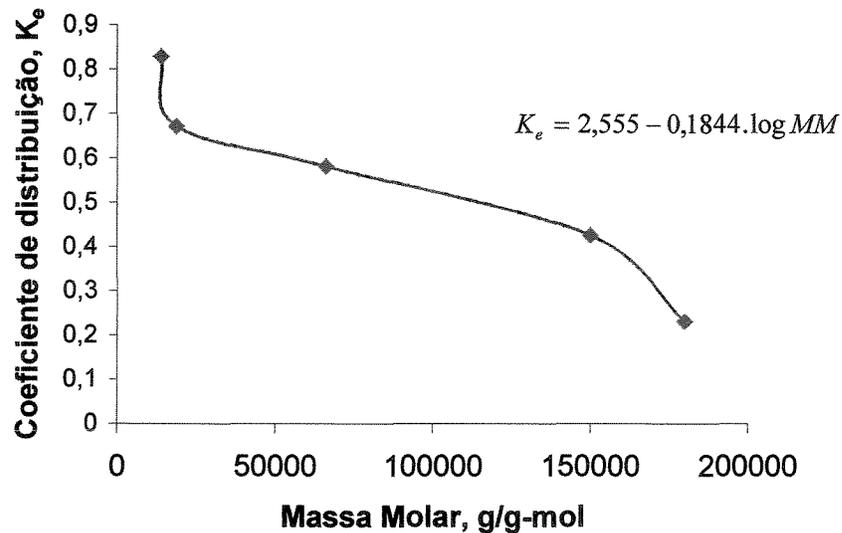
Amostras de proteínas foram injetadas na coluna 1 em três vazões volumétricas diferentes (1,0 mL/min, 1,5 mL/min e 2,0 mL/min) para obter um valor representativo do volume de eluição, a média dos três volumes obtidos nas três vazões volumétricas diferentes. As proteínas utilizadas foram  $\alpha$ -lactalbumina MM  $1,4 \times 10^4$  g/g-mol,  $\beta$ -lactoglobulina MM  $1,86 \times 10^4$  g/g-mol, BSA MM  $6,6 \times 10^4$  g/g-mol, Imunoglobulina G MM  $1,5 \times 10^5$  g/g-mol e a Lactoferrina MM  $8,0 \times 10^4$  g/g-mol, todas proteínas puras lactosoro bovino padrão Sigma. Da mesma forma que as proteínas foram injetados amostras de Dextran e Acetona para obter os valores de volume nulo  $V_0$  da coluna e volume total  $V_t$ , respectivamente. Os valores de  $K_e$  foram obtidos segundo a Equação (3.1). A Tabela 5.5 mostra os valores obtidos para o cálculo do  $K_e$ .

**Tabela 5.5** - Valores obtidos para o cálculo do  $K_e$  para as proteínas  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, BSA, Imunoglobulina G e Lactoferrina

Proteína	$V_t$	$V_0$	MM	Kd	Log(MM)
$\alpha$ -lactalbumina	31,60	13,92	14000	0,82	4,14
$\beta$ -lactoglobulina			18600	0,67	4,27
BSA			66000	0,58	4,82
Imunoglobulin G			150000	0,42	5,17
Lactoferrina			180000	0,23	5,25

Com os dados da Tabela 5.5 foi possível obter um ajuste dos valores gerando os parâmetros da Equação 3.2 que pode ser observado na Figura 5.7. Assim, temos:

$$K_e = 2,555 - 0,1844 \cdot \log MM \quad (5.3)$$



**Figura 5.7** Representação gráfica dos valores do  $K_e$  para as proteínas  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, BSA, Imunoglobulina G e Lactoferrina, apresentando o valor de  $K_e$  na forma de um modelo log linear.

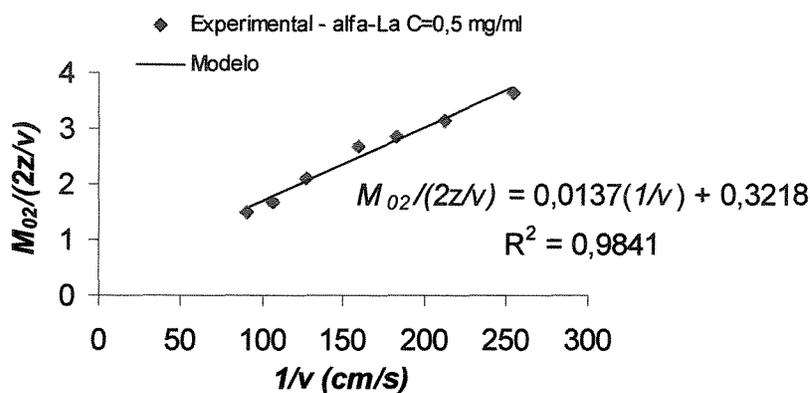
#### **5.4 DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DISPERÇÃO AXIAL NA FASE LIQUIDA DA COLUNA ( $D_f/v$ ) E DIFUSÃO DO SOLUTO NA FASE SÓLIDA ( $D_p$ )**

As Figuras 5.8 a 5.12 e a tabela 5.6 mostram os experimentos e resultados dos métodos dos momentos aplicados a  $\alpha$ -lactalbumina realizados na coluna 1 em concentrações variando de 0,5 mg/mL a 2,5 mg/mL. Para cada concentração diferente o experimento teve a vazão volumétrica variada de 1,25 a 3,5 mL/min e o mesmo procedimento foi aplicado à  $\beta$ -lactoglobulina. Os valores são apresentados nas Figuras 5.13 a 5.17 e na tabela 5.10. Os pontos experimentais geraram comportamento linear com valores aproximados de coeficiente angular e linear, o que implica na aplicabilidade da Equação (3.33). No entanto segundo Nakanishi, et al (1977) considerando que o coeficiente de transferência de massa ( $k_f$ ) é razoavelmente grande, o termo  $5/K_f R$  é muito pequeno, o que faz com que a Equação tome a forma:

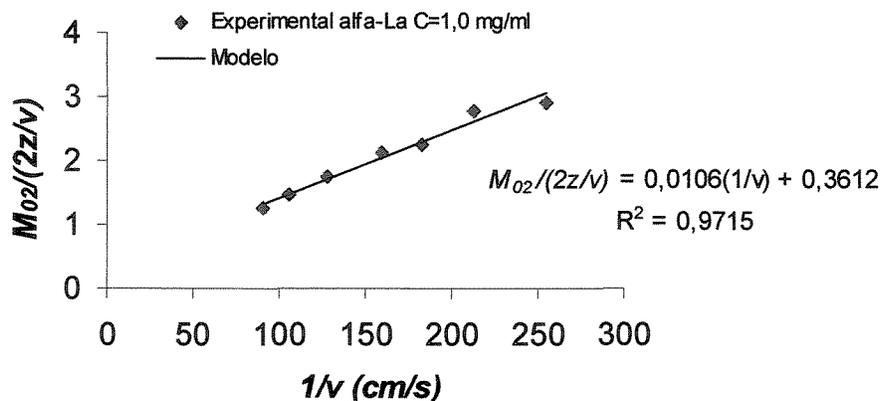
$$M_{02} = \left( \frac{2z}{v_0} \right) \left[ \frac{D_b}{v^2} (1 + HK)^2 + \frac{HR^2 K}{15} \left( \frac{1}{D_p} \right) \right] \quad (5.4)$$

E como consequência o coeficiente linear do modelo que representa os dados experimentais toma a forma:

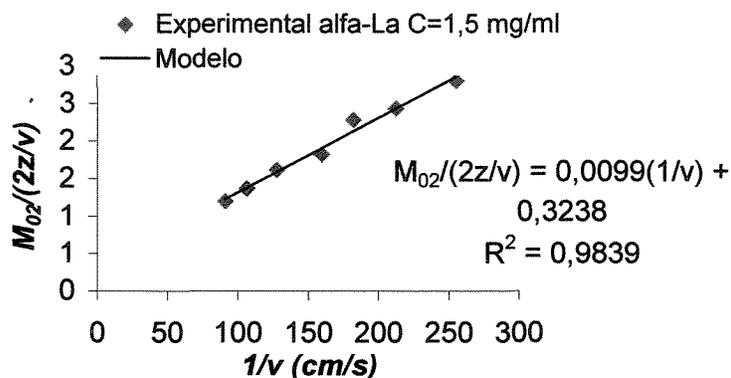
$$b = \frac{HR^2 K}{15} \left( \frac{1}{D_p} \right) \quad (5.5)$$



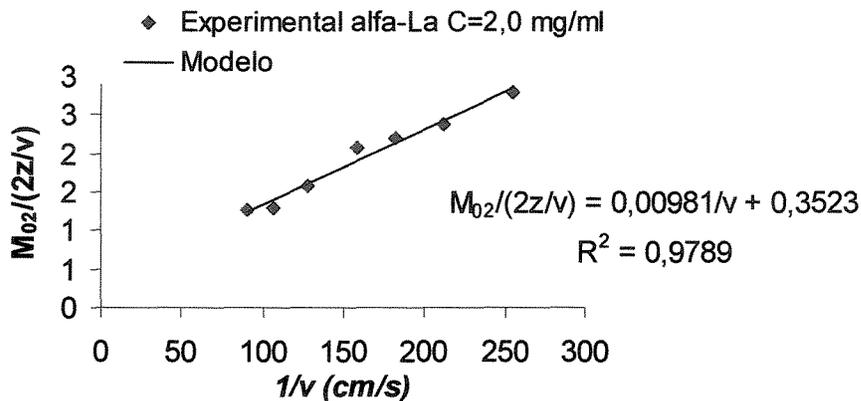
**Figura 5.8** Resultados experimentais obtidos para o segundo momento para a  $\alpha$ -lactalbumina com concentração de 0,5 mg/mL em um leito de resina com  $h = 6,4$  cm apresentando o ajuste linear proposto pela Equação (5.4).



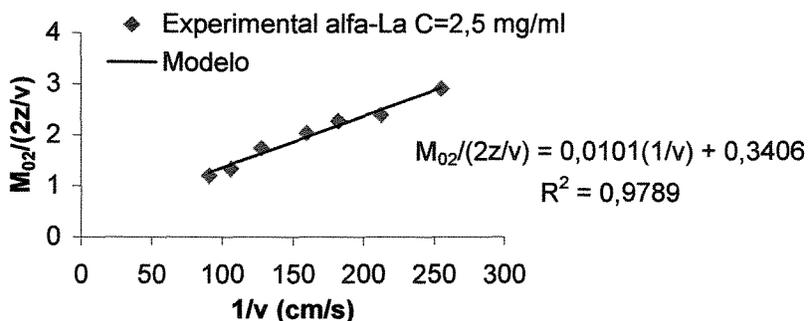
**Figura 5.9** Resultados experimentais obtidos para o segundo momento para a  $\alpha$ -lactalbumina com concentração de 1,0 mg/mL em um leito de resina com  $h = 6,4$  cm apresentando o ajuste linear proposto pela Equação (5.4).



**Figura 5.10** Resultados experimentais obtidos para o segundo momento para a  $\alpha$ -lactalbumina com concentração de 1,5 mg/mL em um leito de resina com  $h = 6,4$  cm apresentando o ajuste linear proposto pela Equação (5.4).



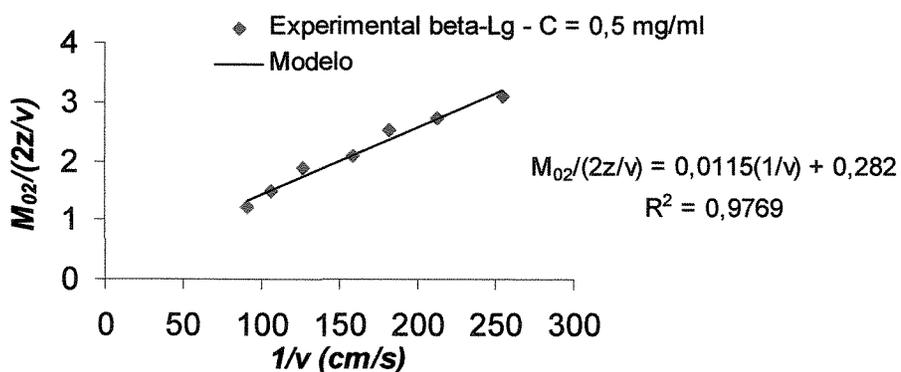
**Figura 5.11** Resultados experimentais obtidos para o segundo momento para a  $\alpha$ -lactalbumina com concentração de 2,0 mg/mL em um leito de resina com  $h = 6,4$  cm apresentando o ajuste linear proposto pela Equação (5.4).



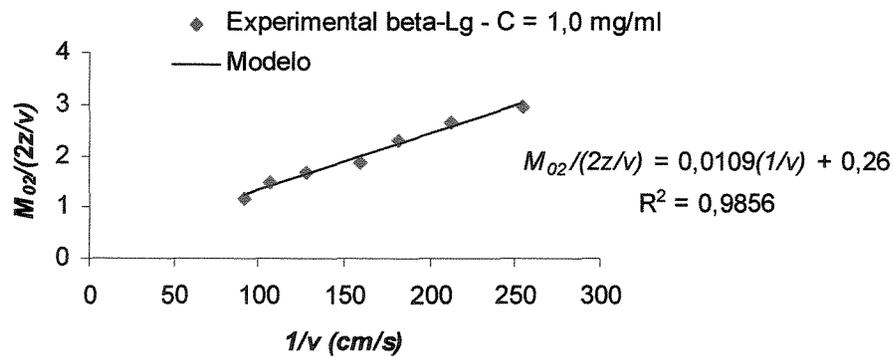
**Figura 5.12** Resultados experimentais obtidos para o segundo momento para a  $\alpha$ -lactalbumina com concentração de 2,5 mg/mL em um leito de resina com  $h = 6,4$  cm apresentando o ajuste linear proposto pela Equação (5.4).

**Tabela 5.6** Resultados experimentais obtidos para o segundo momento para a  $\alpha$ -lactalbumina com concentração variando de 0,5 a 2,5 mg/mL em um leito de resina com  $h = 6,4$  cm.

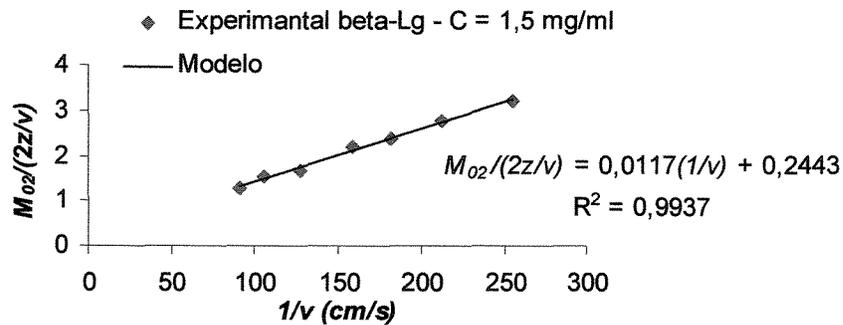
$v$ (cm/s)	$1/v$	$M_{02}/(2z/v)$				
		0,5 mg/mL	1,0 mg/mL	1,5 mg/mL	2,0 mg/mL	2,5 mg/mL
0,0039	254,85	3,66	2,91	2,80	2,80	2,90
0,0047	212,37	3,16	2,78	2,43	2,39	2,39
0,0055	182,03	2,87	2,25	2,28	2,21	2,27
0,0063	159,28	2,70	2,13	1,82	2,06	2,03
0,0078	127,42	2,11	1,74	1,61	1,57	1,74
0,0094	106,19	1,69	1,48	1,37	1,29	1,33
0,0110	91,02	1,50	1,24	1,20	1,26	1,20



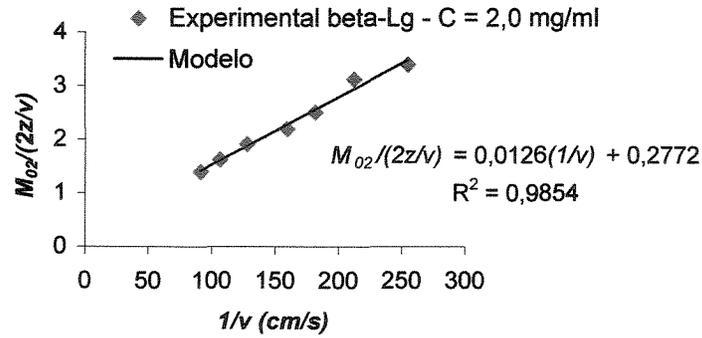
**Figura 5.13** Resultados experimentais obtidos para o segundo momento para a  $\beta$ -lactoglobulina com concentração de 0,5 mg/mL em um leito de resina com  $h = 6,4$  cm apresentando o ajuste linear proposto pela Equação (5.3).



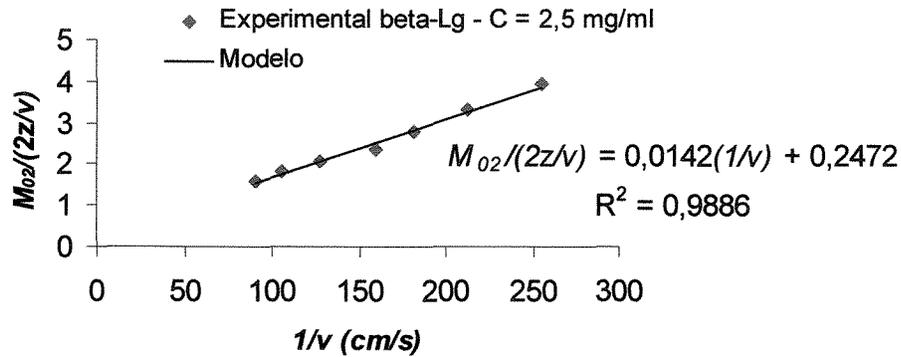
**Figura 5.14** Resultados experimentais obtidos para o segundo momento para a  $\beta$ -lactoglobulina com concentração de 1,0 mg/mL em um leito de resina com  $h = 6,4$  cm apresentando o ajuste linear proposto pela Equação (5.3).



**Figura 5.15** Resultados experimentais obtidos para o segundo momento para a  $\beta$ -lactoglobulina com concentração de 1,5 mg/mL em um leito de resina com  $h = 6,4$  cm apresentando o ajuste linear proposto pela Equação (5.3).



**Figura 5.16** Resultados experimentais obtidos para o segundo momento para a  $\beta$ -lactoglobulina com concentração de 2,0 mg/mL em um leito de resina com  $h = 6,4$  cm apresentando o ajuste linear proposto pela Equação (5.3).



**Figura 5.17** Resultados experimentais obtidos para o segundo momento para a  $\beta$ -lactoglobulina com concentração de 2,5 mg/mL em um leito de resina com  $h = 6,4$  cm apresentando o ajuste linear proposto pela Equação (5.3).

**Tabela 5.7** Resultados experimentais obtidos para o segundo momento para a  $\beta$ -lactoglobulina com concentração variando de 0,5 a 2,5 mg/mL em um leito de resina com  $h = 6,4$  cm.

$v(\text{cm/s})$	$1/v$	$M_{02}/(2z/v)$				
		0,5 mg/mL	1,0 mg/mL	1,5 mg/mL	2,0 mg/mL	2,5 mg/mL
0,0039	254,85	3,10	2,97	3,20	3,40	3,92
0,0047	212,37	2,73	2,64	2,76	3,12	3,34
0,0055	182,03	2,51	2,30	2,36	2,51	2,77
0,0063	159,28	2,09	1,88	2,18	2,20	2,34
0,0078	127,42	1,88	1,65	1,66	1,92	2,07
0,0094	106,19	1,47	1,49	1,55	1,62	1,81
0,0110	91,02	1,20	1,18	1,28	1,40	1,60

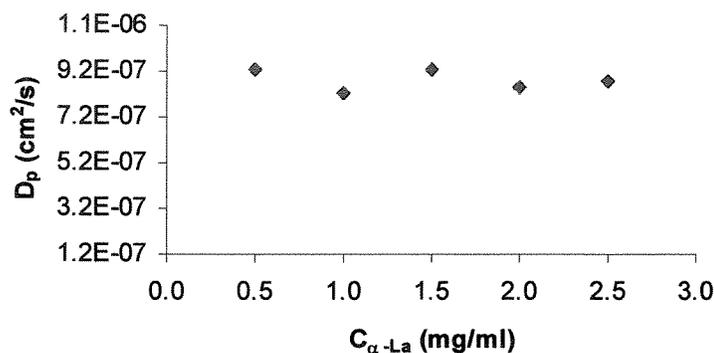
A partir dos valores do segundo momento obtido experimentalmente para ambas proteínas e com o uso do modelo descrito pela Equação (5.4) temos os valores de  $D_p$  para cada concentração usada, ou seja, 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; e 2,5 mg/mL. A Tabela 5.8 e a Tabela 5.9 mostra os valores de  $D_p$  para cada concentração usada para as proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, respectivamente.

**Tabela 5.8** valores de  $D_p$  (Coeficiente de difusão do soluto na fase sólida) para diferentes concentrações para  $\beta$ -lactoglobulina em resinas de exclusão de tamanho Sephadex G-200, valores obtidos através da aplicação do método dos momentos em uma coluna com altura de leito  $z = 6,4$  cm.

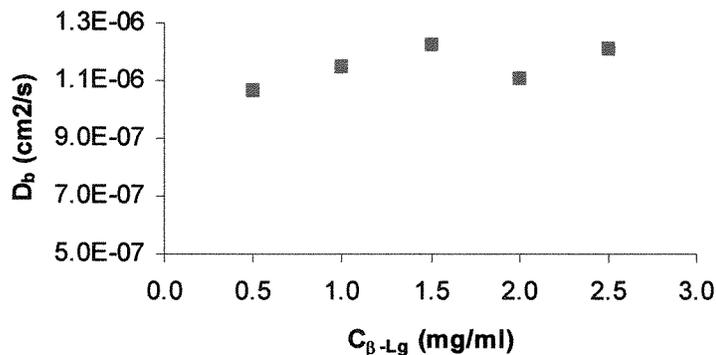
$C_{\beta\text{-Lg}} (\text{mg/mL})$	$M_{02}/(2z/v) = a(1/v) + b$				
	$a$	$b$	$r^2$	$D_p (\text{cm}^2/\text{s})$	$D_b (\text{cm}^2/\text{s})$
0,5	1,15E-02	0,28	0,97	1,07E-06	1,11E-05
1,0	1,09E-02	0,26	0,98	1,15E-06	1,05E-05
1,5	1,17E-02	0,24	0,99	1,22E-06	1,13E-05
2,0	1,26E-02	0,27	0,98	1,11E-06	1,22E-05
2,5	1,42E-02	0,25	0,98	1,21E-06	1,37E-05

**Tabela 5.9** valores de  $D_p$  (Coeficiente de difusão do soluto na fase sólida) para diferentes concentrações para  $\alpha$ -lactalbumina em resinas de exclusão de tamanho Sephadex G-200, valores obtidos através da aplicação do método dos momentos em uma coluna com altura de leito  $z = 6,4$  cm.

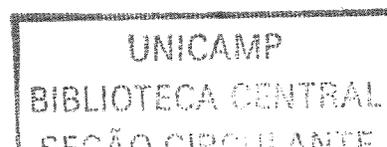
$C_{\alpha-La}$ (mg/mL)	$M_{0z}/(2z/v) = a(1/v) + b$				
	$a$	$b$	$r^2$	$D_p$ (cm <sup>2</sup> /s)	$D_b$ (cm <sup>2</sup> /s)
0,5	0,0138	0,32	0,98	9,33E-07	1,33E-05
1,0	0,0106	0,36	0,97	8,26E-07	1,02E-05
1,5	0,0099	0,32	0,98	9,33E-07	9,56E-06
2,0	0,0098	0,35	0,97	8,47E-07	9,47E-06
2,5	0,0101	0,34	0,97	8,76E-07	9,78E-06



**Figura 5.18** valores de  $D_p$  para diferentes concentrações de  $\alpha$ -lactalbumina  $\blacklozenge$ , em resinas de exclusão de tamanho Sephadex G-200, valores obtidos através da aplicação dos métodos dos momentos em uma coluna com altura de leito  $z = 6,4$  cm.



**Figura 5.19** valores de  $D_p$  para diferentes concentrações de  $\beta$ -lactoglobulina  $\blacksquare$ , em resinas de exclusão de tamanho Sephadex G-200, valores obtidos através da aplicação dos métodos dos momentos em uma coluna com altura de leito  $z = 6,4$  cm.



### 5.5 PROCESSAMENTO DE MISTURAS PROTÉICAS DE $\beta$ -LACTOGLOBULINA E $\alpha$ -LACTALBUMINA EM REE.

Os experimentos se seguiram variando os volumes das frações recirculadas R1 e R2 em cinco valores diferentes, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 mL. Na Tabela 5.10 são mostradas as condições de processo para cada experimento realizado.

**Tabela 5.10** Condições de processo para os experimentos realizados no reciclo externo estacionário utilizando uma mistura binária de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina .

Experimento	Volume R1-R2 (mL)	Tempo Total de Ciclo (min)	Volume de Injeção (mL)	Concentração Inicial de $\beta$ -lactoglobulina (mg/mL)	Concentração Inicial de $\alpha$ -lactalbumina (mg/mL)
1	1,0-1,0	14	1,9	6,56	2,85
2	1,5-1,5			5,96	3,19
3	2,0-2,0			6,49	2,98
4	2,5-2,5			6,87	2,80
5	3,0-3,0			5,35	2,57

Nos primeiros testes realizados para definir as condições de processamento das proteínas em estudo no REE, foi verificado que com um volume de injeção de 2,0 mL, com um fluxo de 2 mL, 14 mim foram suficiente para que ocorresse toda a eluição da amostra, em um perfil cromatográfico equivalente ao observado pela Figura 4.5, porém devido às condições operacionais e principalmente devido à distribuição das válvulas de controle de direcionamento de fluxo no sistema, na prática o volume de injeção foi correspondente a 1,9 mL. Esse valor é relativo a aproximadamente 5,5 % do volume total do leito das colunas empregadas no sistema de REE, que é igual a 34,0 mL.

Segundo Janson e Ryden (1998), para obter uma máxima resolução em separação cromatográfica convencional por colunas de exclusão de tamanhos, os volumes de injeção deverão ser de 2% a 6% do volume da coluna quando processado respectivamente de 0,5 a 5,0% do volume da coluna por hora. Em termos físicos, isso

significa que para se ter uma máxima eficiência de separação usando-se as colunas utilizadas no REE, para processar 6% do volume do leito em amostra, só teríamos uma completa eluição em 6,8 h de processamento. Hagel et al (1992), para separar IgG de transferrina em Superdex® 200, utilizou 2 e 3% do volume do leito em volume de injeção aplicando essas taxas de escoamento, e obteve respectivamente 99,5 e 95,0% de recuperação com 99,99% de pureza.

A utilização do REE permite que se possa aumentar a taxa de fluxo nas colunas uma vez que apenas as regiões de alta pureza do perfil de eluição (referentes ao início e final do perfil de eluição) é que são coletadas, ou seja, as frações A1 e A2. O volume das frações de reciclo R1 e R2 tem como papel manter no sistema a parte do perfil cromatográfico que apresenta as duas proteínas em estudo, de certa forma “retardando” a separação desta fração, uma vez que novos ciclos de eluição serão gerados e essas frações serão incorporadas a esses novos ciclos.

Com a formação de ciclos repetidos pela recirculação das frações R1, R2 e INJ, juntamente com a injeção de volumes e concentrações constantes de novas amostras, a concentração das amostras coletadas A1 e A2, frações que apresentam alta pureza de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, respectivamente, mostram uma tendência de atingir uma relação  $C_i/C_0$  igual a 1, ou seja, a soma da massa das proteínas individuais corresponde ao valor das mesmas presente na alimentação, o que caracteriza o estado estacionário.

Os resultados dos experimentos de processamento no REE foram apresentados mostrando a relação de concentração adimensional  $C_i/C_0$  (massa de proteína coletada sobre a massa de proteína na alimentação obtida ao longo dos ciclos de eluição) e da pureza das frações coletadas.

$$\text{Para } \beta\text{-lactoglobulina} \quad \left( \frac{C_{\beta-Lg}}{C_0} \right) \cdot 100 \quad (5.6)$$

$$\text{Para } \alpha\text{-lactalbumina} \quad \left( \frac{C_{\alpha-La}}{C_0} \right) \cdot 100 \quad (5.7)$$

Quanto à pureza, a relação de porcentagem utilizada foi a massa da proteína individual sobre a massa total da fração.

$$\text{Para } \beta\text{-lactoglobulina} \quad \left( \frac{C_{\beta-Lg}}{C_T} \right) \cdot 100 \Rightarrow \left( \frac{C_{\beta-Lg}}{C_{\beta-Lg} + C_{\alpha-La}} \right) \cdot 100 \quad (5.8)$$

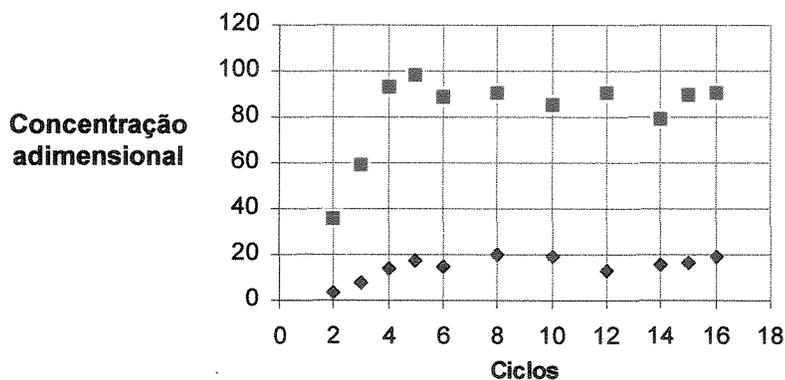
$$\text{Para } \alpha\text{-lactalbumina} \quad \left( \frac{C_{\alpha-La}}{C_T} \right) \cdot 100 \Rightarrow \left( \frac{C_{\alpha-La}}{C_{\beta-Lg} + C_{\alpha-La}} \right) \cdot 100 \quad (5.9)$$

As Figuras apresentadas a seguir mostram os experimentos realizados com a variação do volume das frações R1 e R2, seguindo as condições de processo apresentadas na Tabela 5.10.

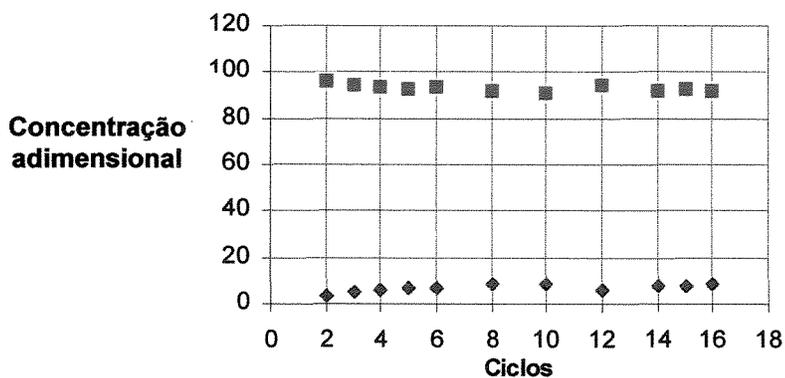
As Figuras 5.20 a 5.23 mostram o perfil de rendimento e pureza obtido pelas concentrações das proteínas em estudo, para o processamento em REE de uma amostra de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina com concentrações iniciais de 6,56 e 2,85 mg/mL e volumes de reciclo R1 e R2 de ambos 1,0 mL.

A relação de porcentagem da concentração de proteína referente à Equação (5.6) para  $\beta$ -lactoglobulina atinge valores próximo a 100% a partir do 6º ciclo de processamento. A Figura 5.20 mostra que a partir deste ciclo, o estado estacionário é atingido.

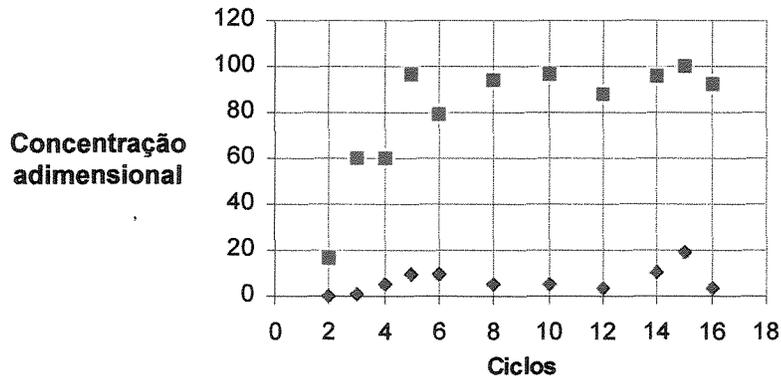
Na Figura 5.21, que mostra valores de pureza de acordo com a Equação 5.8, valores próximos a 100% são atingidos logo a partir dos primeiros ciclos de processamento.



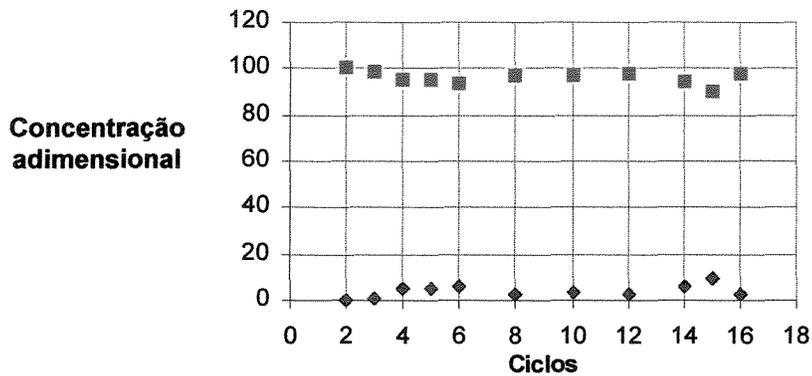
**Figura 5.20** Perfil da concentração relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A1 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 1,0 mL.



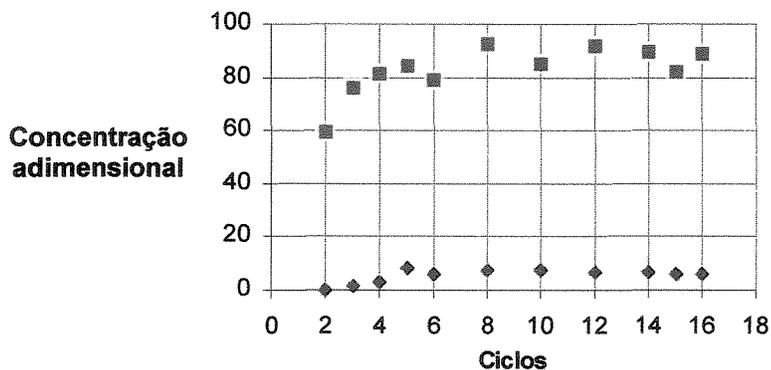
**Figura 5.21** Perfil de pureza relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A1 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 1,0 mL.



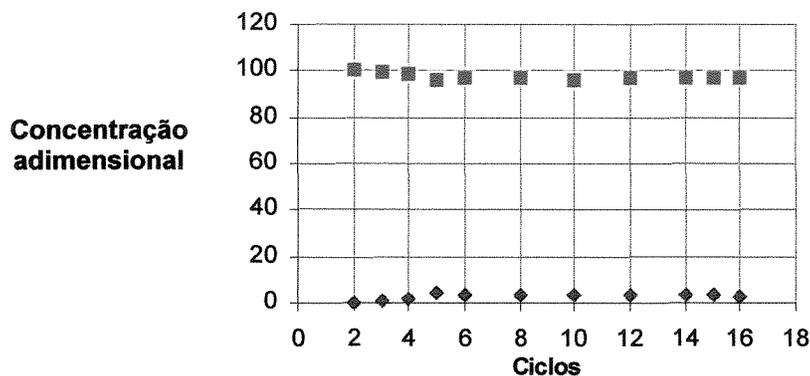
**Figura 5.22** Perfil da concentração relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A1 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 1,5 mL.



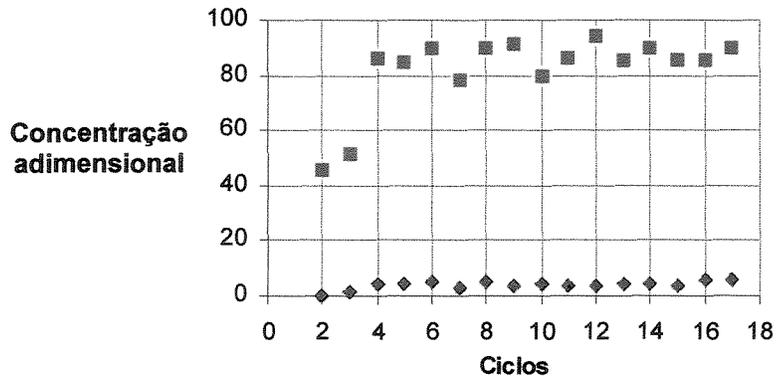
**Figura 5.23** Perfil de pureza relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A1 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 1,5 mL.



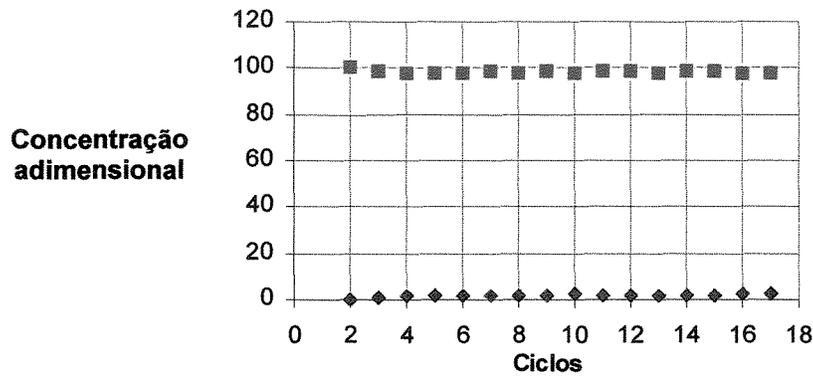
**Figura 5.24** Perfil da concentração relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A1 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 2,0 mL.



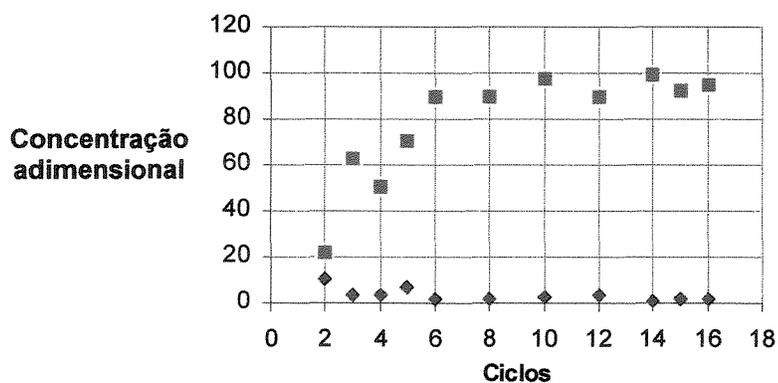
**Figura 5.25** Perfil de pureza relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A1 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 2,0 mL.



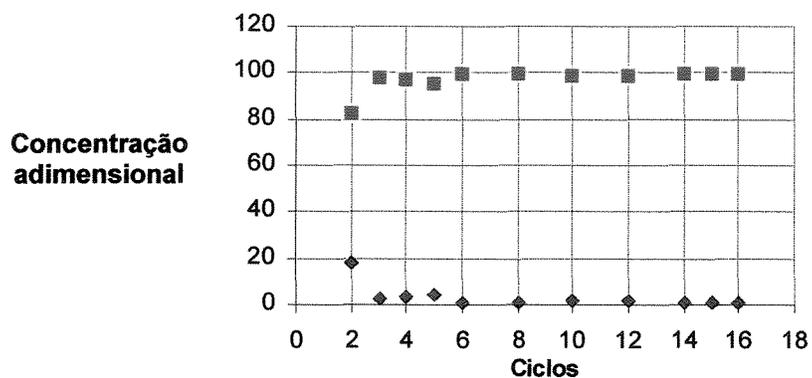
**Figura 5.26** Perfil da concentração relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A1 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 2,5 mL.



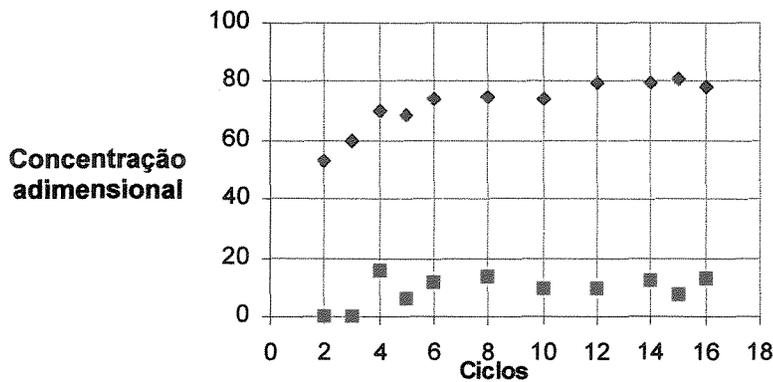
**Figura 5.27** Perfil de pureza relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A1 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 2,5 mL.



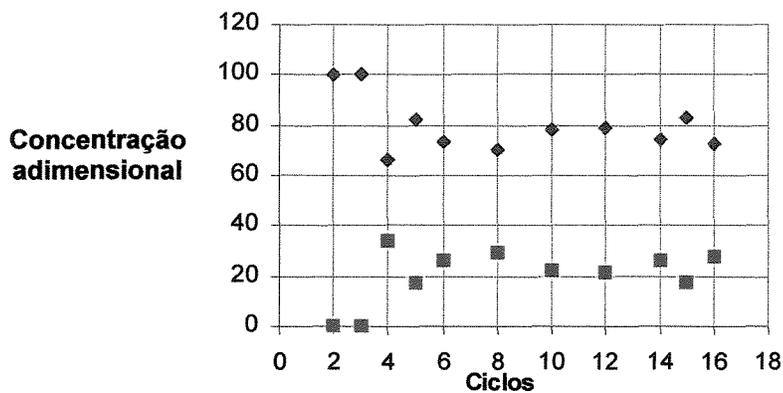
**Figura 5.28** Perfil da concentração relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A1 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 3,0 mL.



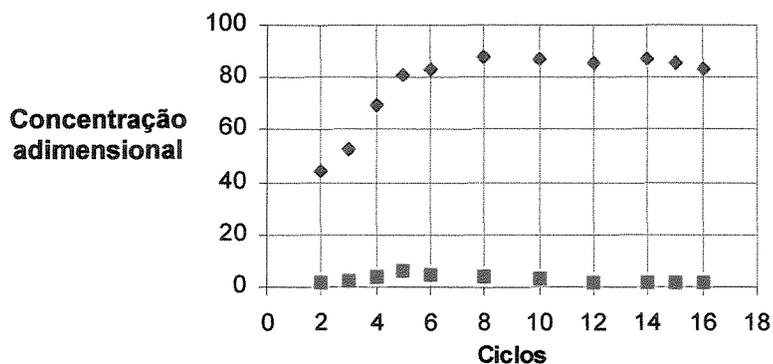
**Figura 5.29** Perfil de pureza relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A1 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 3,0 mL.



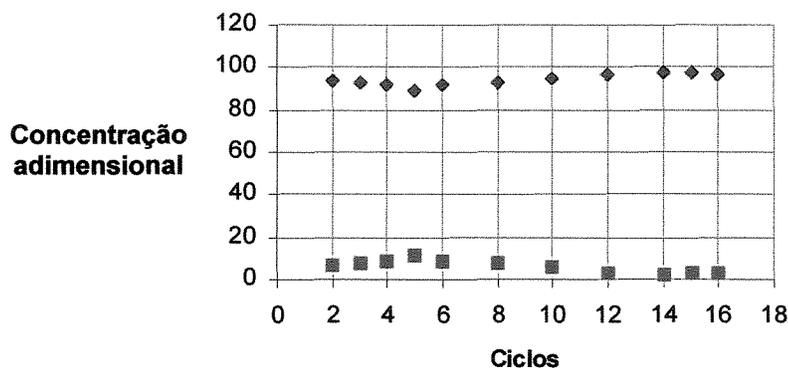
**Figura 5.30** Perfil da concentração relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A2 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 1,0 mL.



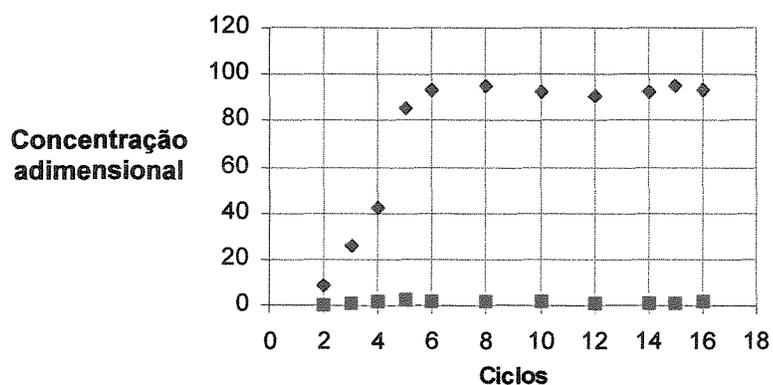
**Figura 5.31** Perfil de pureza relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A2 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 1,0 mL.



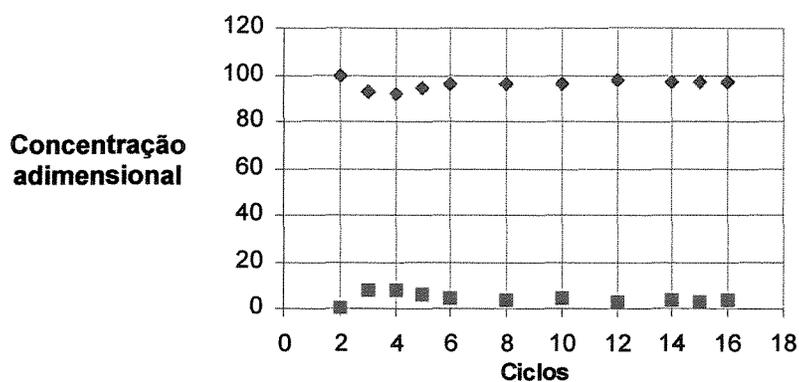
**Figura 5.32** Perfil da concentração relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A2 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 1,5 mL.



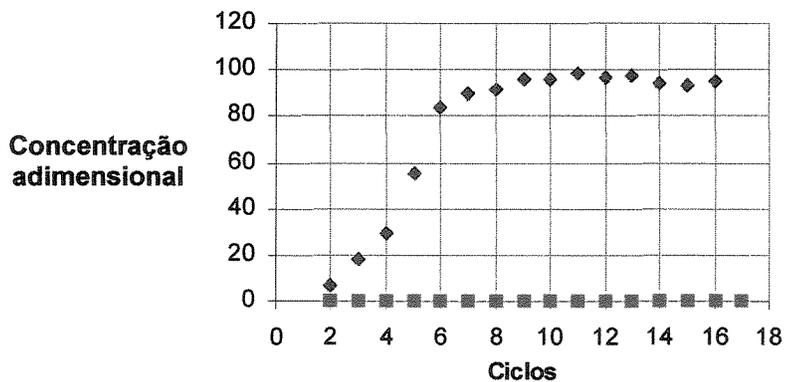
**Figura 5.33** Perfil de pureza relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A2 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 1,5 mL.



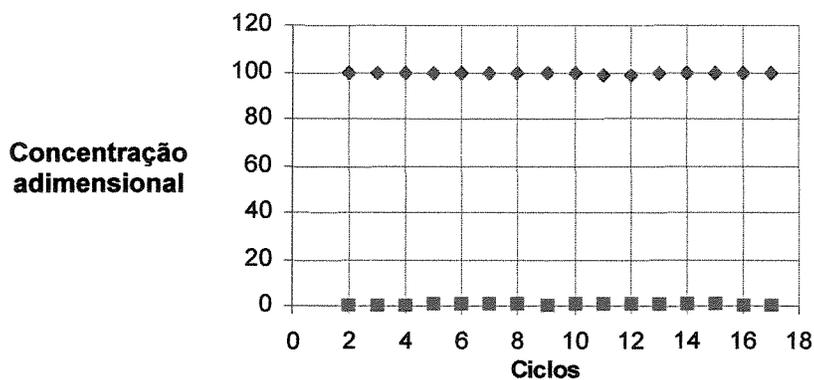
**Figura 5.34** Perfil da concentração relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A2 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 2,0 mL.



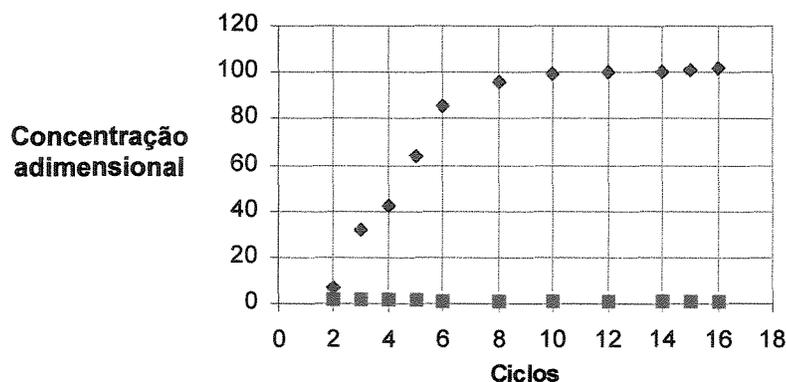
**Figura 5.35** Perfil de pureza relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A2 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 2,0 mL.



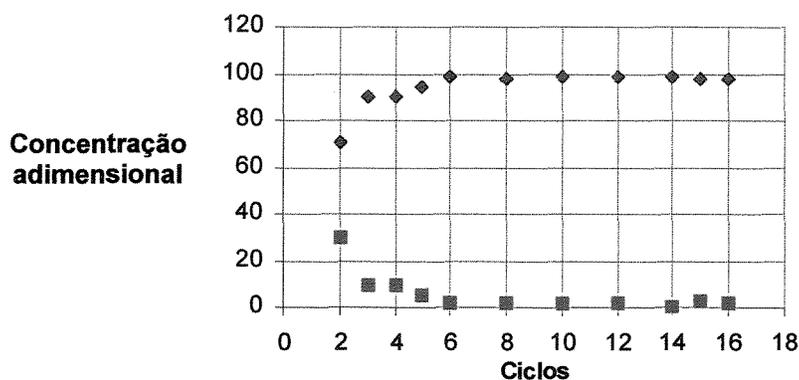
**Figura 5.36** Perfil da concentração relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A2 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 2,5 mL.



**Figura 5.37** Perfil de pureza relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A2 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 2,5 mL.



**Figura 5.38** Perfil da concentração relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A2 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 3,0 mL.

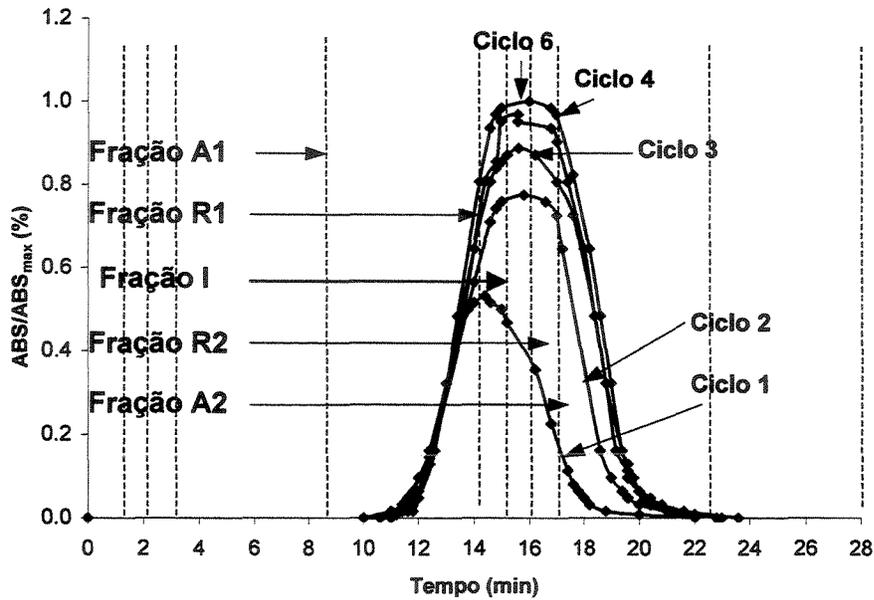


**Figura 5.39** Perfil de pureza relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) na fração coletada A2 ao longo dos ciclos de eluição no REE para volumes de reciclo R1 e R2 ambos de 3,0 mL.

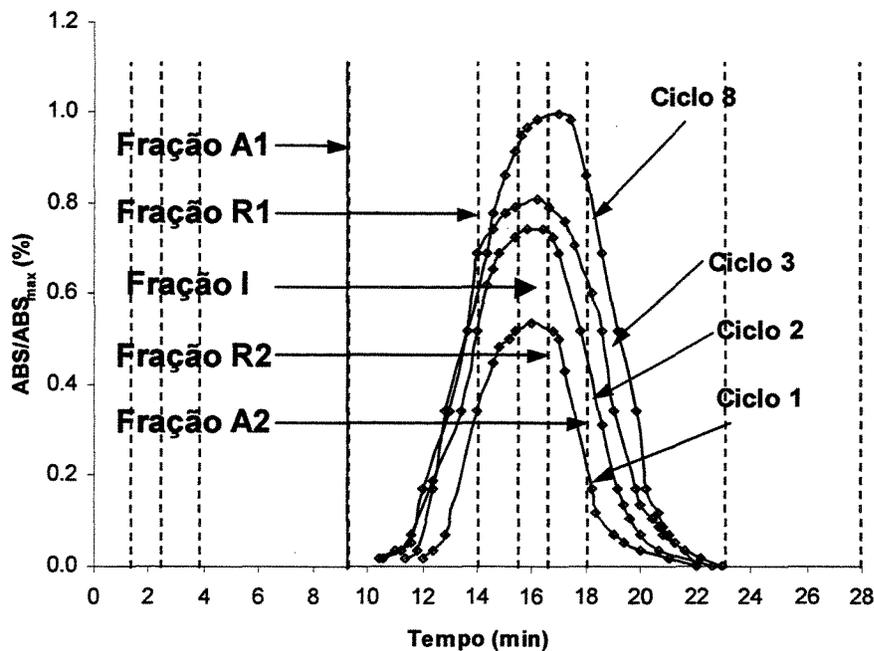
De todos os experimentos realizados, apenas os que tiveram maiores valores de volumes de recirculação, R1 e R2, apresentaram um perfil de concentração relativa próximo a valores de 100% na região estacionária do processo, geralmente para número de ciclos maiores que 6. O contrário pode ser observado nas Figuras 5.20 e 5.22 que mostram os resultados dos perfis da massa relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina na fração coletada A1 para volumes de R1 e R2 de 1,0

e 1,5mL, respectivamente, e pelas Figuras 5.30 e 5.32 que mostram os resultados dos perfis da massa relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina na fração coletada A2 para volumes de R1 e R2 de 1,0 e 1,5mL, respectivamente. Nestas figuras é observada uma contaminação de uma fração pela outra, ou seja, a fração A1 que deveria apresentar purezas próximas a 100% para a  $\beta$ -lactoglobulina apresenta a presença de  $\alpha$ -lactalbumina; da mesma forma a fração A2 apresenta presença da proteína  $\beta$ -lactoglobulina, podendo-se concluir que nos experimentos (1 e 2, ver Tabela 5.10) com volumes de reciclo R1 e R2 de 1,0 e 1,5mL os perfis de concentração internos nas colunas para as duas proteínas pode não apresentar uma eficiência de separação que permita a coleta de amostras com alta pureza. Para esses experimentos as frações A1 e A2 apresentam volumes de 5,5 ml e 5,0 ml.

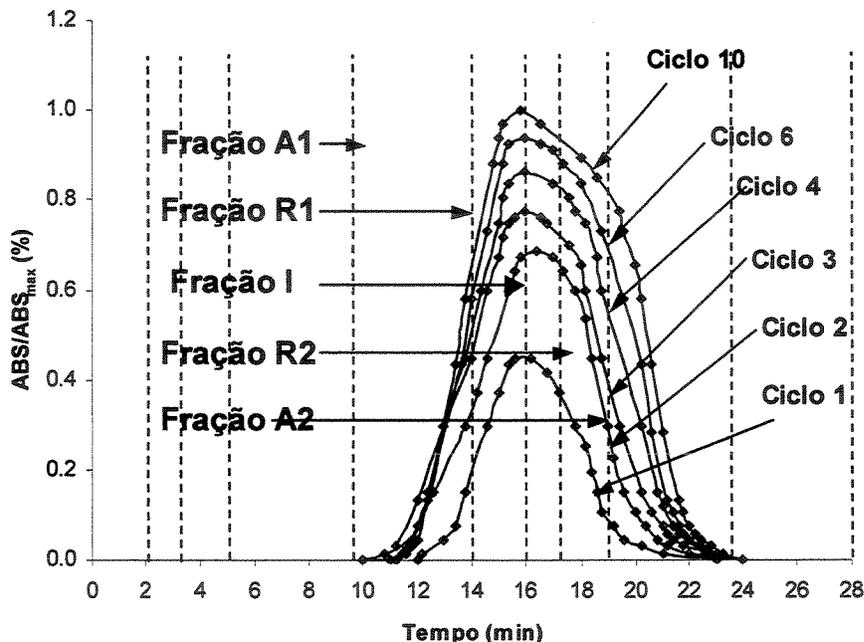
As Figuras de 5.40 a 5.44 apresentam os cromatogramas que mostram perfis de absorvância total dos experimentos realizados em REE para mistura binária de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, com taxa de fluxo de 2,0 mL/min, em colunas com 6,4 cm de leito fixo de resinas de exclusão de tamanhos Sephadex G200. Os experimentos seguiram a seqüência apresentada pela Tabela 5.10, onde foi variado o volume de reciclo R1 e R2 em 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL.



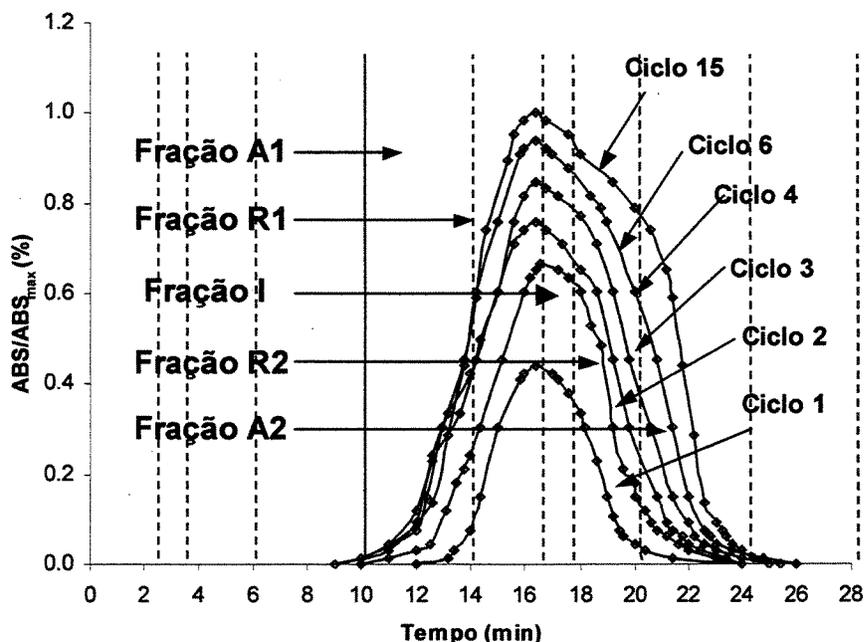
**Figura 5.40** Perfis de absorvância total dos experimentos realizados em REE para mistura binária de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, com vazão de 2,0 mL/min, em colunas com 6,4 cm de leito fixo de resinas de exclusão de tamanhos Sephadex G200 e fração de reciclo R1 e R2 de 1,0 mL.



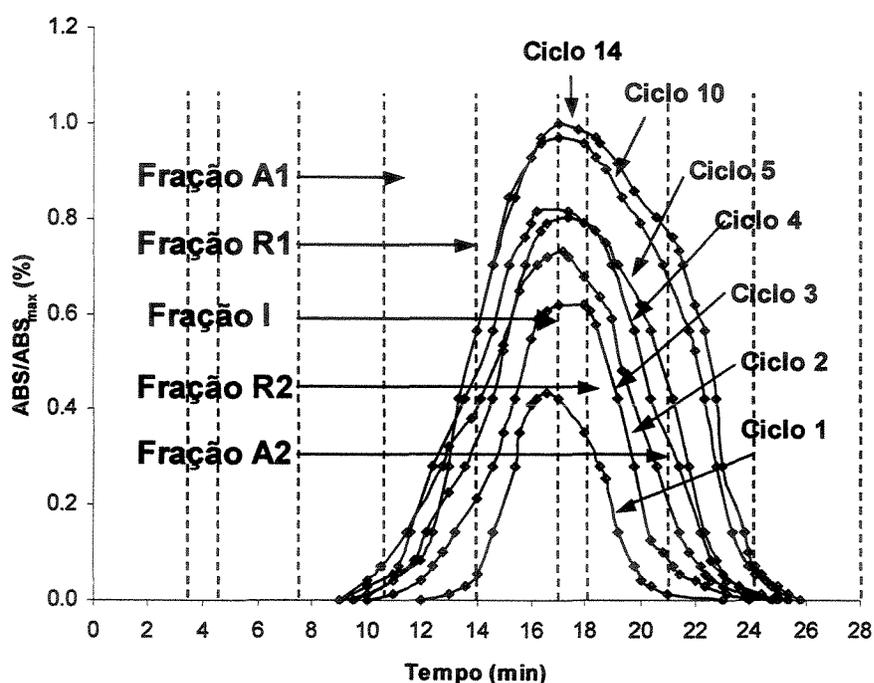
**Figura 5.41** Perfis de absorvância total dos experimentos realizados em REE para mistura binária de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, com vazão de 2,0 mL/min, em colunas com 6,4 cm de leito fixo de resinas de exclusão de tamanhos Sephadex G200 e fração de reciclo R1 e R2 de 1,5 mL.



**Figura 5.42** Perfis de absorvância total dos experimentos realizados em REE para mistura binária de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, com vazão de 2,0 mL/min, em colunas com 6,4 cm de leito fixo de resinas de exclusão de tamanhos Sephadex G200 e fração de reciclo R1 e R2 de 2,0 mL.



**Figura 5.43** Perfis de absorvância total dos experimentos realizados em REE para mistura binária de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, com vazão de 2,0 mL/min, em colunas com 6,4 cm de leito fixo de resinas de exclusão de tamanhos Sephadex G200 e fração de reciclo R1 e R2 de 2,5 mL.



**Figura 5.44** Perfis de absorvância total dos experimentos realizados em REE para mistura binária de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, com vazão de 2,0 mL/min, em colunas com 6,4 cm de leito fixo de resinas de exclusão de tamanhos Sephadex G200 e fração de reciclo R1 e R2 de 3,0 mL

Como já foi dito anteriormente, os experimentos seguiram um processamento com total de 16 ciclos cada; no entanto, nas figuras 5.40 a 5.44 não são apresentados os cromatogramas de todos os ciclos, uma vez que os últimos cromatogramas são similares uns com os outros. Esta característica se torna verdadeira quando o processo já se apresenta em regime constante ou estacionário, e a relação  $C_i/C_0$  se aproxima de 1.

É observado também que ao longo dos experimentos a base dos cromatogramas aumenta em função do aumento dos volumes de recirculação, ou seja, das frações R1 e R2. Este comportamento caracteriza uma melhor eficiência de separação uma vez que o aumento dos volumes recirculados leva a um aumento da pureza das frações A1 e A2 para as proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, respectivamente.

Com exceção dos primeiros experimentos (1 e 2, que apresentam volumes recirculados R1 e R2 de 1,0 e 1,5 mL), se forem observados os cromatogramas da Figuras 5.42, 5.43 e 5.44, vê-se que estes sofrem uma ligeira inclinação para a direita na direção da fração A2 mais rica em  $\alpha$ -lactalbumina. Pelos resultados extraídos pode-se concluir que a  $\alpha$ -lactalbumina sofre uma maior dispersão ao longo do processo justificando seu menor coeficiente de difusividade, uma vez que na maioria dos experimentos a fração A1 (fração mais rica em  $\beta$ -lactoglobulina) apresenta índices de pureza menores que os encontrados para a fração A2.

Pelo fato da  $\alpha$ -lactalbumina contaminar a fração A1 em maior proporção, esta apresenta uma diminuição do rendimento em relação à  $\beta$ -lactoglobulina. Isto pode ser evidenciado pela Figura 5.45 que mostra os valores dos rendimentos totais encontrados nos processamentos em REE das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina para os experimentos realizados. O rendimento foi calculado de acordo com as equações abaixo:

$$\text{Para } \alpha\text{-lactalbumina} \quad \left( \frac{mt_{\alpha-La}^{A1} - mt_{\alpha-La}^{A2} - mr_{\alpha-La}^n}{mt_{\alpha-La}^0} \right) \cdot 100 \quad (5.10)$$

$$\text{Para } \beta\text{-lactoglobulina} \quad \left( \frac{mt_{\beta-Lg}^{A2} - mt_{\beta-Lg}^{A1} - mr_{\beta-Lg}^n}{mt_{\beta-Lg}^0} \right) \cdot 100 \quad (5.11)$$

$$mr_{\alpha-La}^n = mR1_{\alpha-La}^n + mI_{\alpha-La}^n + mR2_{\alpha-La}^n \quad (5.12)$$

$$mr_{\beta-Lg}^n = mR1_{\beta-Lg}^n + mI_{\beta-Lg}^n + mR2_{\beta-Lg}^n \quad (5.13)$$

Onde:  $mt_{\alpha-La}^{A1}$  = massa total coletada da Fração A1 para  $\alpha$ -lactalbumina ;  $mt_{\alpha-La}^{A2}$  = massa total coletada da Fração A2 para  $\alpha$ -lactalbumina;  $mr_{\alpha-La}^n$  = massa total recirculada do processo para  $\alpha$ -lactalbumina (soma das massas de  $\alpha$ -lactalbumina nas frações R1, I e R2 para o último ciclo, equação 5.12);  $mr_{\alpha-La}^0$  = massa total da

alimentação para  $\alpha$ -lactalbumina;  $mt^{A1}_{\beta-Lg}$  = massa total coletada da Fração A1 para  $\beta$ -lactoglobulina ;  $mt^{A2}_{\beta-Lg}$  = massa total coletada da Fração A2 para  $\beta$ -lactoglobulina ;  $mr^{A2}_{\beta-Lg}$  = massa total recirculada do processo para  $\beta$ -lactoglobulina (soma das massas de  $\beta$ -lactoglobulina nas frações R1, I e R2 para o último ciclo, equação 5.13);  $mr^0_{\beta-Lg}$  = massa total da alimentação para  $\beta$ -lactoglobulina .

Devido ao fato dos experimentos de separação de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina em REE terem sido realizados com colunas de 6,4 cm de leito contendo resinas Sephadex 200, não foi possível a realização de testes com frações recirculadas R1 e R2 que fossem maiores que 3,0 ml. Para valores de reciclo maiores ocorreria um alargamento bem maior da base dos cromatogramas, o que significa que o final dos mesmos extrapolaria o tempo de 14 minutos que corresponde ao tempo de ciclo, comprometendo com isso as frações A1 e A2, e aumentando significativamente as perdas de produto. Nas Figuras 5.43 e 5.44 pode-se observar que o tempo de resolução da fração A2 não é suficiente para que todo o final do cromatograma seja coletado e a parte da fração em excesso é contabilizada como perdas do processo. A Figura 5.43 mostra que para os experimentos 4 e 5 ocorre um aumento das perdas de proteína tanto em  $\beta$ -lactoglobulina (fração A1), como também para a  $\alpha$ -lactalbumina (fração A2).

A Tabela 5.11 mostra um resumo dos resultados encontrados para os experimentos realizados em REE para mistura binária de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, com taxa de fluxo de 2,0 mL/min, em colunas com 6,4 cm de leito fixo de resinas de exclusão de tamanhos Sephadex G200. Os experimentos seguiram a seqüência apresentada pela Tabela 5.10 onde foi variado o volume de reciclo R1 e R2 em 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 ml. Nesta tabela é apresentado o fator de concentração em termos das proteínas de maior concentração para cada fração coletada. O fator de concentração definido pelas Equações 5.14 e 5.15 determina o quanto o componente

(proteína) em questão está concentrado em relação a sua concentração presente na alimentação; valores menores que 1 significam que houve diluição na separação.

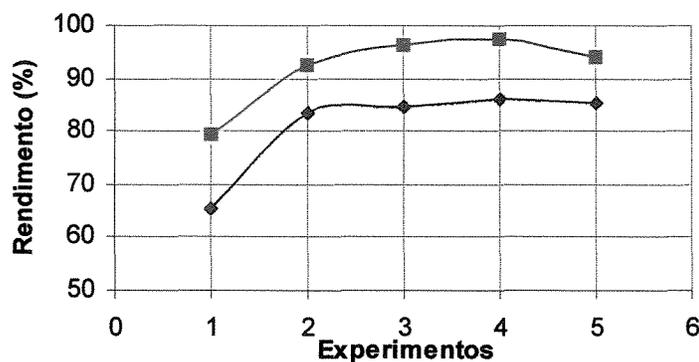
Para  $\alpha$ -Lactalbumina

$$FC_{\beta-Lg}^n = \frac{\frac{\overline{m}_{\beta-Lg}^{-A1n}}{V_{A1n}}}{\frac{m_{\beta-Lg}^{an}}{V_{an}nc}} \Rightarrow FC_{\beta-Lg}^n = \frac{\overline{m}_{\beta-Lg}^{-A1n} V_{an}nc}{m_{\beta-Lg}^{an} V_{A1n}} \quad (5.14)$$

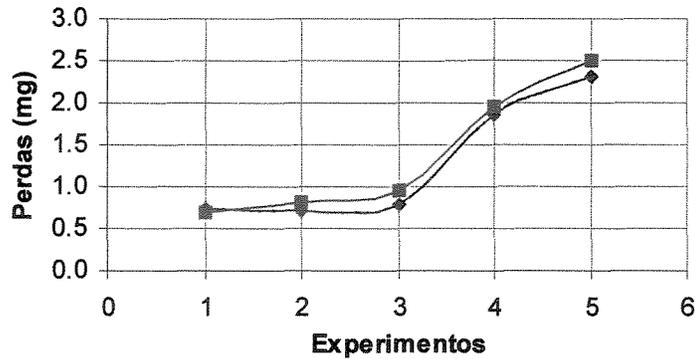
Para  $\beta$ -Lactoglobulina

$$FC_{\alpha-La}^n = \frac{\frac{\overline{m}_{\alpha-La}^{-A2n}}{V_{A2n}}}{\frac{m_{\alpha-La}^{an}}{V_{an}nc}} \Rightarrow FC_{\alpha-La}^n = \frac{\overline{m}_{\alpha-La}^{-A2n} V_{an}nc}{m_{\alpha-La}^{an} V_{A2n}} \quad (5.15)$$

Onde:  $\overline{m}_{\alpha-La}^{-A2n}$  é a média das massas das seis últimas frações A2 coletadas de  $\alpha$ -La,  $V_{A2n}$  é o volume da fração A2 coletada para o experimento  $n$ ,  $V_{an}$  é o volume da alimentação por ciclo para o experimento  $n$  e  $nc$  é o número de ciclos.



**Figura 5.45** Valores dos rendimentos totais encontrados nos processamentos em REE das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) para os experimentos com volumes de reciclo R1 e R2 de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL.



**Figura 5.46** Valores das perdas encontrados nos processamentos em REE das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) para os experimentos com volumes de reciclo R1 e R2 de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL

**Tabela 5.11** Resumo dos valores de processo obtidos para a separação de uma mistura protéica de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina em REE para os experimentos com volumes de reciclo R1 e R2 de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL

Experimento		1	2	3	4	5	
Massa Total Injetada (mg)	$\alpha$ -La	45,6	52,9	47,8	43,4	41,0	
	$\beta$ -Lg	104,9	92,4	107,3	110,9	85,6	
Massa Total Coletada (mg)	Fração A1	$\alpha$ -La	6,2	3,1	2,5	1,5	1,3
		$\beta$ -Lg	80,1	69,7	83,8	89,7	63,9
	Fração A2	$\alpha$ -La	31,0	38,8	34,2	32,4	29,9
		$\beta$ -Lg	8,9	2,3	1,0	0,2	0,7
Redimento (%)	$\alpha$ -La	65,2	83,6	84,4	86,2	85,2	
	$\beta$ -Lg	79,5	92,4	96,2	97,4	94,0	
Pureza* (%)	$\alpha$ -La em A2	77,1	96,8	96,9	99,3	98,3	
	$\beta$ -Lg em A1	92,4	95,3	96,8	98,0	98,9	
Fator de Concentração	$\alpha$ -La em A2	0,29	0,35	0,42	0,46	0,58	
	$\beta$ -Lg em A1	0,40	0,36	0,41	0,46	0,54	

\* Foi calculado a média da pureza dos últimos seis ciclos, priorizando a região onde o perfil de concentração se apresenta aproximadamente constante.

## 5.6 MODELAGEM MATEMÁTICA

Em uma cromatografia por exclusão de tamanhos são considerados os três processos de transferência de massa na coluna:

- a) Dispersão axial na fase líquida da coluna;

- b) Transferência no filme líquido entre a fase estacionária (partícula) e a fase móvel (fluido);
- c) Difusão dos componentes através dos macroporos das partículas na fase estacionária.

Porém algumas considerações devem ser feitas antes da formulação do modelo matemático como forma de simplificar a aplicação das equações, como se segue:

- a) É considerado que a coluna é isotérmica;
- b) Não ocorre interação entre os solutos;
- c) Os coeficientes de Difusão e de Transferência permanecem constantes ao longo da coluna;
- d) A distribuição das partículas ao longo da coluna é mantida constante;
- e) É desconsiderada qualquer forma de difusão radial na coluna.

### 5.6.1 Formulação do Modelo Matemático

De acordo com as considerações feitas as equações matemáticas que descrevem o comportamento da cromatografia por exclusão de tamanho são formuladas como equações diferenciais parciais de balanço de matéria para os componentes na fase móvel e fase estacionária, como é mostrado:

$$\frac{\partial C_b}{\partial t} = D_b \frac{\partial^2 C_b}{\partial z^2} - v \frac{\partial C_b}{\partial z} - \frac{3K_f(1-\varepsilon_b)(C_b - C_{s,r=R})}{\varepsilon_b R_p} \quad (5.16)$$

As condições de contorno seguem:

$$t = 0, z \geq 0 \Rightarrow C_b = C_s = 0 \quad (5.17)$$

$$t > t_0, z = 0, C = 0 \Rightarrow D_b \frac{\partial C_b}{\partial z} = v C_b \quad (5.18)$$

$$z = L \Rightarrow D_b \frac{\partial C_b}{\partial z} = 0 \quad (5.19)$$

$$0 \leq t \leq t_0, z = 0, C = C_0 \Rightarrow D_b \frac{\partial C_b}{\partial z} = \nu(C_b - C_0) \quad (5.20)$$

Para a partícula:

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = D_p \left( \frac{\partial^2 C_s}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_s}{\partial r} \right) \quad (5.21)$$

$$r = 0, \frac{\partial C_s}{\partial r} = 0 \quad (5.22)$$

$$r = R, K_f(C_b - C_s) = \varepsilon D_p \frac{\partial C_s}{\partial r} \quad (5.23)$$

Introduzindo as variáveis adimensionais temos:

Para Coluna

$$\Phi = \frac{C_b}{C_0}, y = \frac{z}{L}, \theta = \frac{C_s}{C_0}, x = \frac{r}{R}, \quad (5.24)$$

$$Pe_L = \frac{L\nu}{D_p}, Bi = \frac{K_f R_p}{(\varepsilon_p D_p)}, \eta = \frac{\varepsilon_p D_b L}{R_p^2 u}, \xi = \frac{3Bi\eta(1 - \varepsilon_p)}{\varepsilon_p} \quad (5.25)$$

$$\frac{\partial \Phi}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 \Phi}{\partial y^2} - Pe_L \frac{\partial \Phi}{\partial y} - \xi(\Phi - \theta) \quad (5.26)$$

$$\tau = 0, y = 0, \Phi = \theta = 0 \quad (5.27)$$

$$0 \leq \tau \leq \tau_0, y = 0, \Phi = 1 \Rightarrow \frac{\partial \Phi}{\partial y} = Pe_L(\Phi - 1) \quad (5.28)$$

$$\tau > \tau_0, y = 0, C_0 = 0 \Rightarrow \frac{\partial \Phi}{\partial y} = Pe_L \Phi \quad (5.29)$$

Para Partícula

$$\frac{\partial \theta}{\partial \tau} = \frac{\eta}{\varepsilon_p} \left( \frac{\partial^2 \theta}{\partial x^2} + \frac{2}{x} \frac{\partial \theta}{\partial x} \right) \quad (5.30)$$

$$y=0 \Rightarrow \left. \frac{\partial \Phi}{\partial y} \right|_{x=1} = \text{Bim} \left( \Phi - \frac{C_b(\tau)}{C_0} \right) \quad (5.31)$$

$$\frac{C_b(\tau)}{C_0} \Rightarrow \begin{cases} 1 & \text{se } 0 \leq \tau \leq \tau_0, \\ 0 & \text{se } \tau \geq \tau_0 \end{cases} \quad (5.32)$$

Uma das principais dificuldades no tratamento matemático para a solução numérica de sistemas dessa natureza, consiste na avaliação dos valores de  $D_b$ ,  $D_p$  e  $K_f$ . Os resultados obtidos por equações empíricas muitas vezes não se ajustam às condições reais; assim, uma alternativa seria a avaliação desses parâmetros por técnicas experimentais, como é o caso do método dos momentos, mostrado anteriormente.

O modelo acima, representados pelas Equações 5.26 e 5.30, pode ser reduzido a um sistema de equações diferenciais ordinárias e algébricas, DAE, aplicando o método da colocação ortogonal, conforme Finlayson (1980), Villadsen e Michelsen, (1978). Dessa forma, discretizando-se a variável espacial  $y$  da Equação 5.26, através do método da colocação ortogonal obtém-se:

$$\frac{d\Phi}{d\tau} = \sum_{k=1}^{N+2} B_{jk} \Phi_k - Pe_L \sum_{k=1}^{N+2} A_{jk} \Phi_k - \xi(\Phi_j - \theta_j) \quad (j=2..N) \quad (5.33)$$

que representa as equações diferenciais ordinárias nos pontos de colocação ( $j=2..N$ ) internos ao domínio  $0 \leq Y \leq 1$ . Aplicando-se o método da colocação às condições de contorno (Equações 5.28 e 5.29) resulta:

$$\sum_{k=1}^{N+1} A_{jk} \Phi_k = Pe(\Phi - 1) \quad (5.34)$$

$$\sum_{k=1}^{N+1} A_{jk} \Phi_k = 0 \quad (5.35)$$

A condição inicial é:

$$\tau = 0 \quad \Phi_j = 0 \quad \theta_j = 0 \quad (5.36)$$

As equações na fase sólida ficam:

$$\frac{d\theta}{d\tau} = \frac{\eta}{\varepsilon_p} \left( \sum_{k=1}^{N+1} B_{jk} \theta_k + \frac{2}{x} \sum_{k=1}^{N+1} A_{jk} \theta_k \right) \quad (5.37)$$

Com as condições iniciais

$$\sum_{k=1}^{N+2} A_{jk} \Phi_k = Bi_m (\Phi_k - k\theta_j) \quad (\tau > 0, Y = 1) \quad (5.38)$$

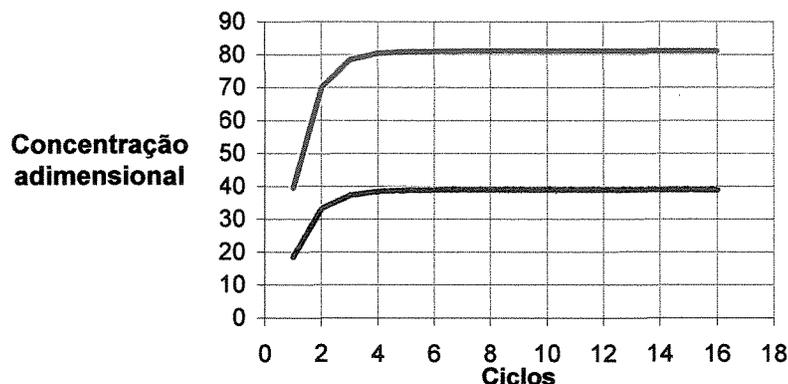
$$\sum_{k=1}^{N+2} A_{jk} \Phi_k = 0 \quad (\tau > 0, Y = 0) \quad (5.39)$$

A solução do sistema de equações diferenciais ordinárias formados pela equação 5.33, juntamente com a equação 5.37, correspondentes à fase sólida, foi realizada simultaneamente, utilizando o método de integração RUNGE KUTTA – GILL com código FORTRAN de domínio público.

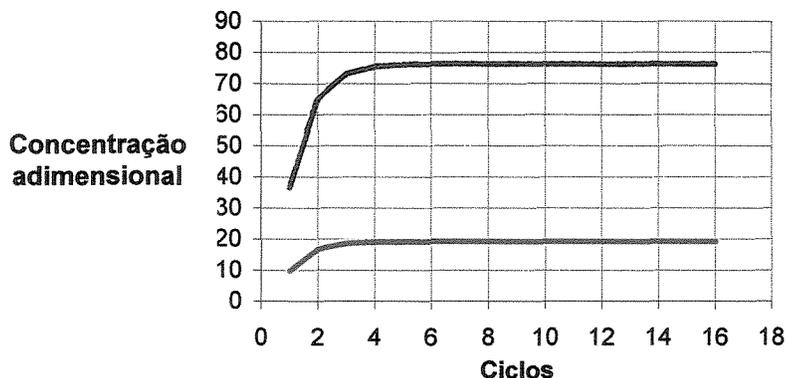
### 5.6.2 Resultado da Simulação do Sistema de Reciclo Externo Estacionário na Separação da $\alpha$ -Lactalbumina e $\beta$ -Lactoglobulina.

As Figuras de 5.47 a 5.56 mostram os resultados obtidos pela simulação do sistema de Reciclo Externo Estacionário na separação da  $\alpha$ -Lactalbumina e  $\beta$ -Lactoglobulina.

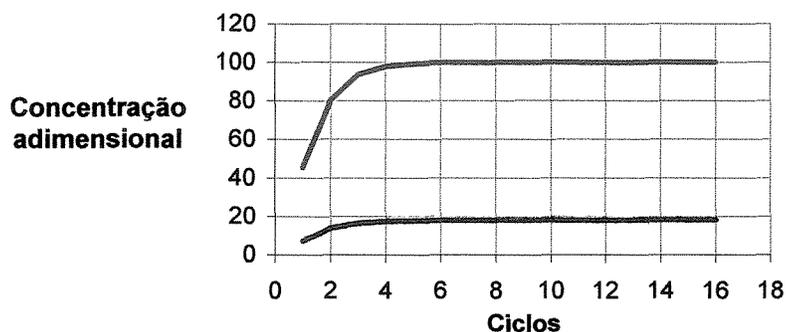
Os resultados encontrados pela simulação mostraram uma concordância com os valores encontrados pelos testes experimentais. Porém, foi observado que em todos os resultados obtidos por simulação o estado estacionário é atingido logo após os primeiros ciclos enquanto que para os valores obtidos pelos testes experimentais esse tempo foi maior.



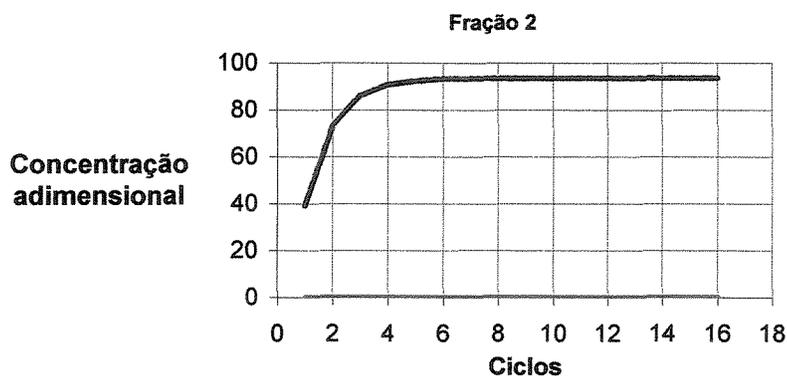
**Figura 5.47** Perfil da concentração relativa obtido pela simulação em REE do processamento das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (—) e  $\alpha$ -lactalbumina (—) da fração A1 ao longo dos ciclos de eluição para volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 1,0 mL.



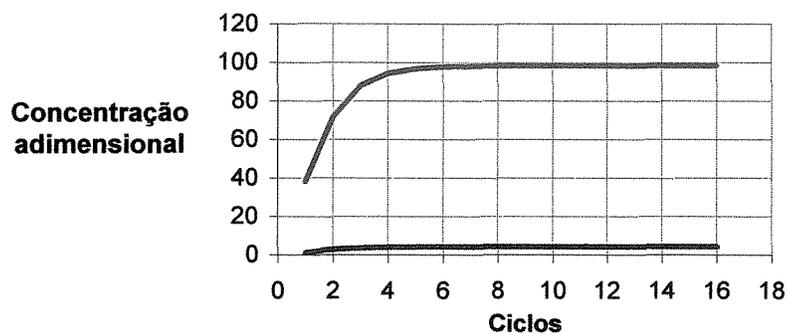
**Figura 5.48** Perfil da concentração relativa obtido pela simulação em REE do processamento das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (—) e  $\alpha$ -lactalbumina (—) da fração A2 ao longo dos ciclos de eluição para volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 1,0 mL.



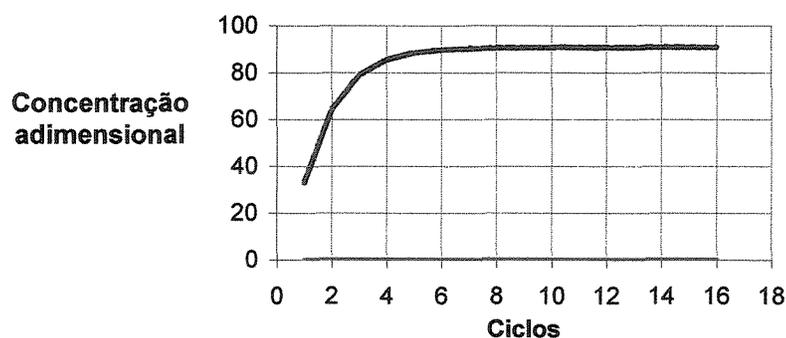
**Figura 5.49** Perfil da concentração relativa obtido pela simulação em REE do processamento das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (—) e  $\alpha$ -lactalbumina (—) da fração A1 ao longo dos ciclos de eluição para volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 1,5 mL.



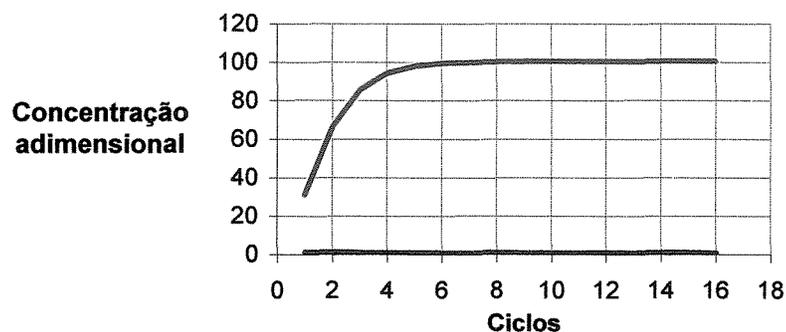
**Figura 5.50** Perfil da concentração relativa obtido pela simulação em REE do processamento das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (—) e  $\alpha$ -lactalbumina (—) da fração A2 ao longo dos ciclos de eluição para volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 1,5 mL.



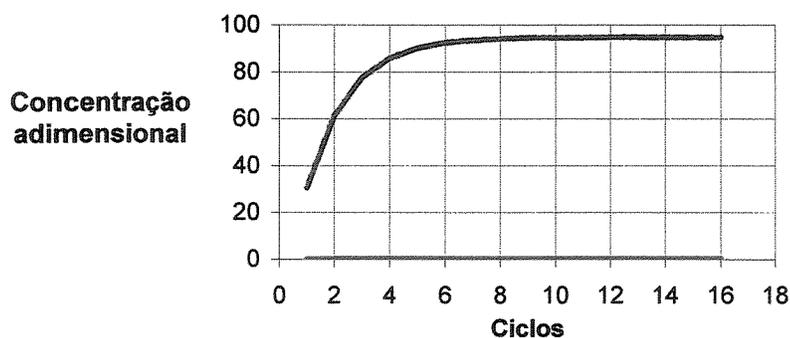
**Figura 5.51** Perfil da concentração relativa obtido pela simulação em REE do processamento das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (—) e  $\alpha$ -lactalbumina (—) da fração A1 ao longo dos ciclos de eluição para volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 2,0 mL.



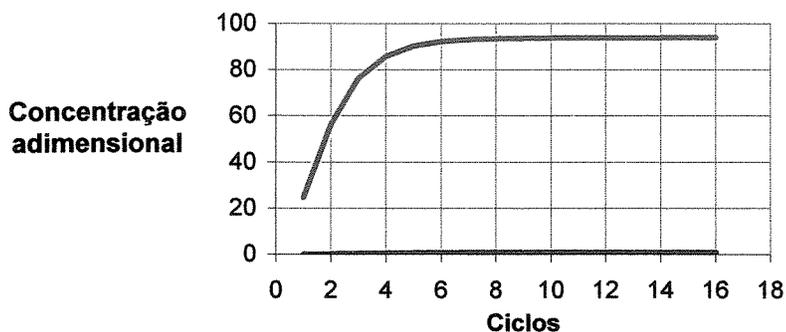
**Figura 5.52** Perfil da concentração relativa obtido pela simulação em REE do processamento das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (—) e  $\alpha$ -lactalbumina (---) da fração A2 ao longo dos ciclos de eluição para volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 2,0 mL.



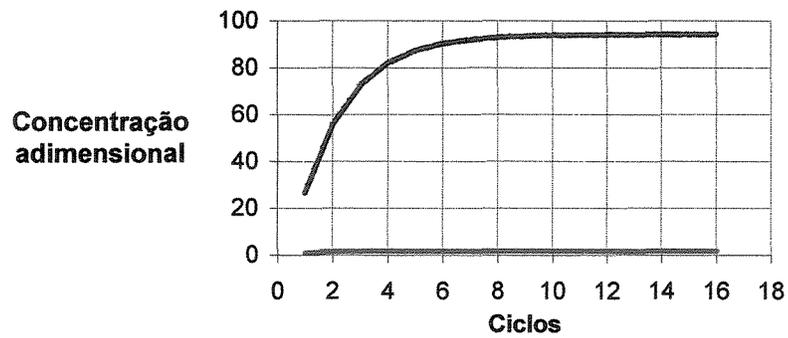
**Figura 5.53** Perfil da concentração relativa obtido pela simulação em REE do processamento das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (—) e  $\alpha$ -lactalbumina (---) da fração A1 ao longo dos ciclos de eluição para volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 2,5 mL.



**Figura 5.54** Perfil da concentração relativa obtido pela simulação em REE do processamento das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (—) e  $\alpha$ -lactalbumina (---) da fração A2 ao longo dos ciclos de eluição para volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 2,5 mL.



**Figura 5.55** Perfil da concentração relativa obtido pela simulação em REE do processamento das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (—) e  $\alpha$ -lactalbumina (---) da fração A1 ao longo dos ciclos de eluição para volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.



**Figura 5.56** Perfil da concentração relativa obtido pela simulação em REE do processamento das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (—) e  $\alpha$ -lactalbumina (---) da fração A2 ao longo dos ciclos de eluição para volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.

**Tabela 5.12** Resumo dos valores de simulação do processo de separação de uma mistura protéica de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina em REE com volumes de reciclo R1 e R2 de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL

Experimento - Simulação		1	2	3	4	5	
Massa Total Injetada (mg)	$\alpha$ -La	45,6	52,9	47,8	43,4	41,0	
	$\beta$ -Lg	104,9	92,4	107,3	110,9	85,6	
Massa Total Coletada (mg)	Fração A1	$\alpha$ -La	16,4	7,9	1,9	0,5	0,3
		$\beta$ -Lg	78,7	91,0	88,5	95,2	71,5
	Fração A2	$\alpha$ -La	32,2	40,9	39,3	40,1	35,3
		$\beta$ -Lg	18,7	0,0	0,0	0,3	1,3
Redimento (%)	$\alpha$ -La	74,1	90,6	80,3	89,6	90,3	
	$\beta$ -Lg	78,9	98,0	98,1	98,2	94,4	
Pureza* (%)	$\alpha$ -La em A2	63,4	100,0	100,0	99,3	96,7	
	$\beta$ -Lg em A1	82,7	92,0	97,9	99,6	99,6	
Fator de Concentração	$\alpha$ -La em A2	0,24	0,33	0,35	0,40	0,45	
	$\beta$ -Lg em A1	0,26	0,35	0,38	0,43	0,45	

\* Foi calculada a média da pureza dos últimos seis ciclos, priorizando a região onde o perfil de concentração se apresenta aproximadamente constante.

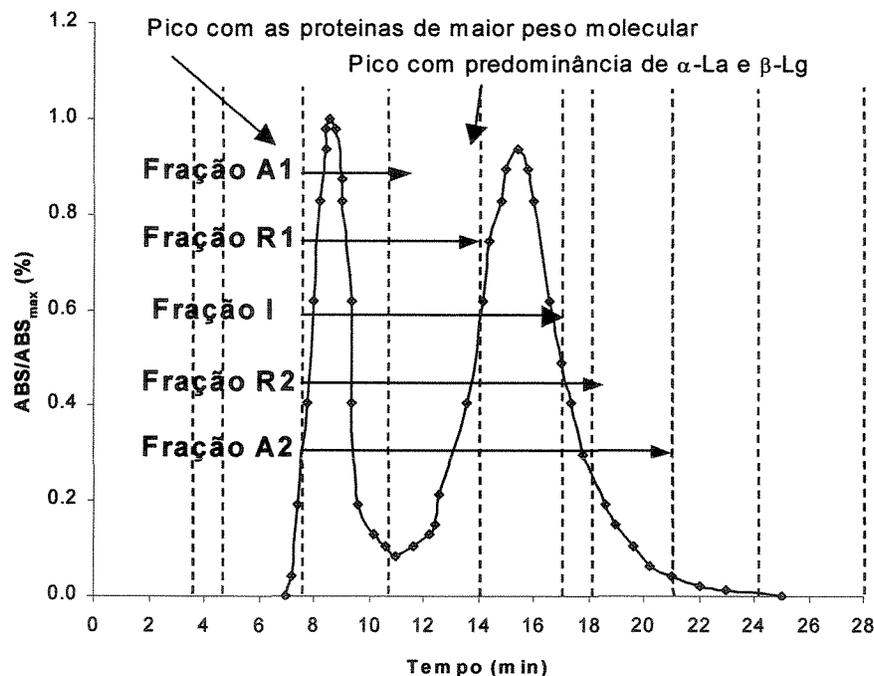
De acordo com a Tabela 5.12, que mostra o resumo dos resultados obtidos pela simulação dos experimentos, é observado que os menores rendimentos e purezas são encontrados para o primeiro experimento realizado com volume de reciclo R1 e R2 de 1.0 mL. Apesar dos valores simulados não estarem exatamente iguais aos obtidos experimentalmente, estes apresentam tendências semelhantes. É observado que o Fator de Concentração manteve-se abaixo de 1.0 para todos os experimentos e que aumenta ao longo dos experimentos com o aumento do volume de eluição das frações R1 e R2.

## 5.7 PROCESSAMENTO DE UMA MISTURA PROTÉICA DE SORO DO LEITE BOVINO EM REE.

Utilizando as mesmas condições de processo que foram usadas para o experimento 6 onde o volume de reciclo das frações R1 e R2 foi de 3,0 mL, para o processamento em REE de uma mistura binária de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, foi feito um experimento utilizando um concentrado protéico de soro de leite bovino, sendo esse concentrado adquirido e processado segundo procedimento descrito na

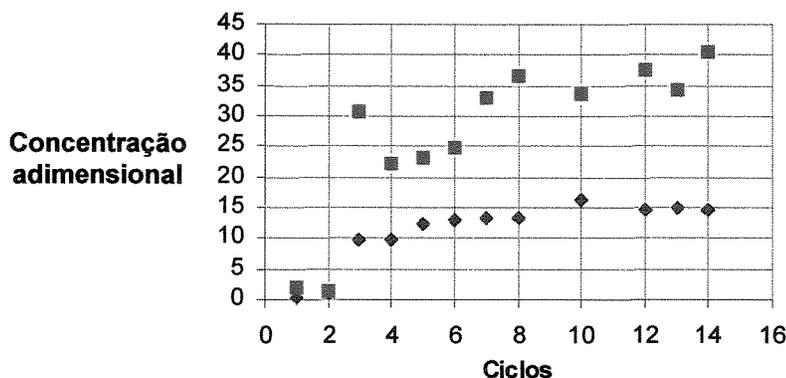
seção 4.6. A alimentação utilizada produzida a partir deste concentrado teve suas características, em termos de concentração de proteína, semelhantes às encontrada no soro do leite bovino *in natura*. Este experimento teve como objetivo verificar a funcionalidade da técnica de separação em REE quando da utilização de misturas multicomponentes.

A Figura 5.57 mostra um cromatograma de um ciclo utilizando como alimentação o concentrado protéico do soro do leite restituído à suas concentrações iniciais. É possível observar a presença bem definida de dois picos; o primeiro deles corresponde às proteínas de alto peso molecular, que seriam a Lactoferrina, a Lactoperoxidase, as Imunoglobulinas e a BSA; o segundo corresponde às proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina. Assim, para o processamento aplicando as condições já estudadas apenas seria utilizada no processo a fração referente ao segundo pico, devendo as proteínas de alto peso molecular, presentes no primeiro pico ser descartadas como rejeito do processo.

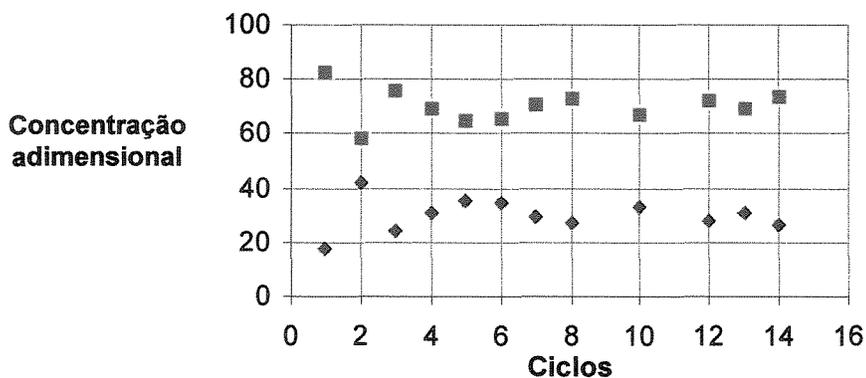


**Figura 5.57** Cromatograma de um ciclo de processamento em REE utilizando como alimentação o concentrado protéico do soro do leite restituído à suas concentrações iniciais para volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL

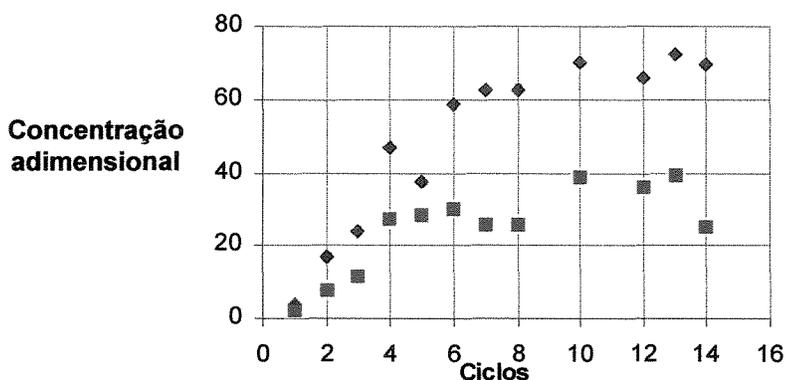
As Figuras 5.58 a 5.61 mostram os resultados de um processamento em REE com volumes de reciclo R1 e R2 de 3,0 ml utilizando como alimentação o concentrado protéico do soro do leite restituído à suas concentrações iniciais.



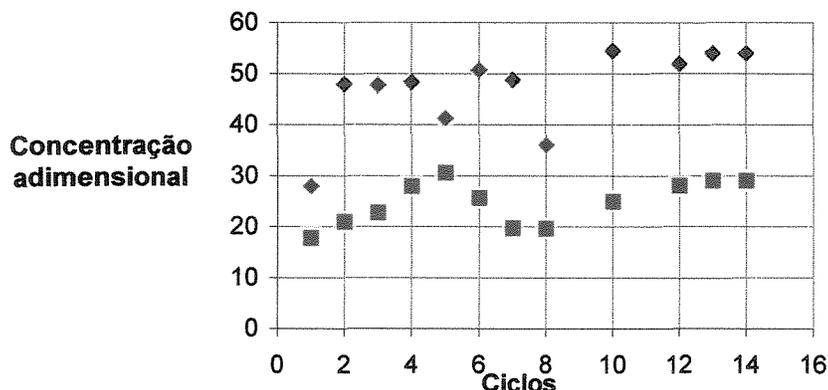
**Figura 5.58** Perfil da concentração relativa obtido pelo processamento em REE de um concentrado protéico de soro bovino obtendo as proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) para a fração A1 ao longo dos ciclos de eluição com volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.



**Figura 5.59** Perfil de pureza relativa obtido pelo processamento em REE de um concentrado protéico de soro bovino obtendo as proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) para a fração A1 ao longo dos ciclos de eluição com volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.



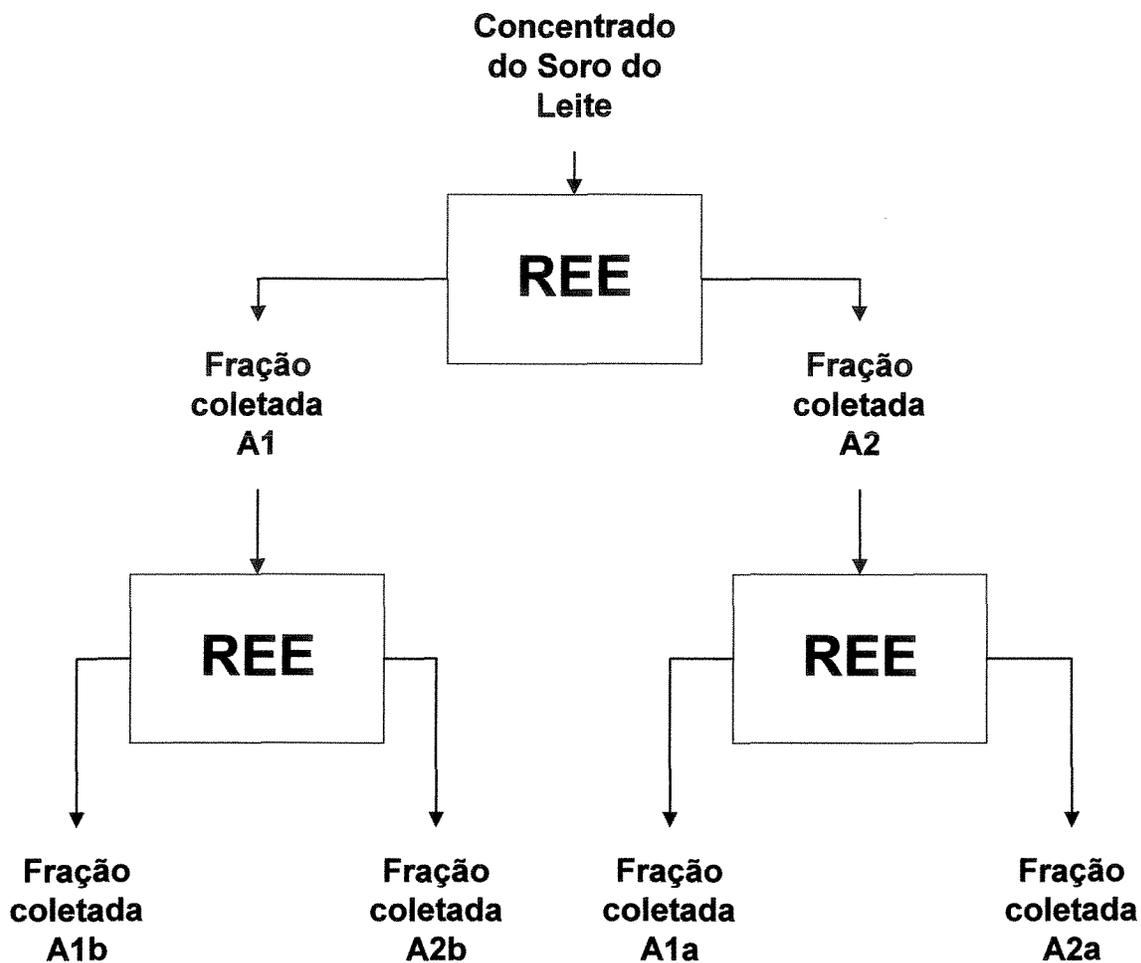
**Figura 5.60** Perfil da massa relativa obtido pelo processamento em REE de um concentrado protéico de soro bovino obtendo as proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) para a fração A2 ao longo dos ciclos de eluição com volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.



**Figura 5.61** Perfil de pureza relativa obtido pelo processamento em REE de um concentrado protéico de soro bovino obtendo as proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) para a fração A2 ao longo dos ciclos de eluição com volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.

Os resultados mostraram que o processamento de uma mistura multicomponente do soro do leite bovino, para a separação de proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, não apresentou bons resultados, gerando as frações coletadas A1 e A2 com baixa pureza, baixa massa relativa ( $m_a/m_0$ ) e a presença de perdas significativas para a  $\beta$ -lactoglobulina.

Uma alternativa para aumentar a pureza das frações coletadas A1 e A2 foi submetê-las novamente ao processo REE como frações de alimentação. A Figura 5.62 mostra um fluxograma da seqüência do reprocessamento em REE das frações A1 e A2 obtidas como resultado de um primeiro processamento em REE usando como alimentação o soro do leite bovino, uma mistura multicomponente com a presença das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina.

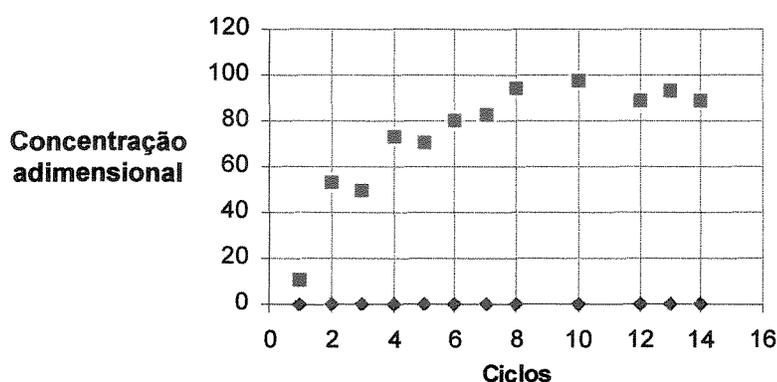


**Figura 5.62** Fluxograma da seqüência de etapas no processamento em REE do soro do leite

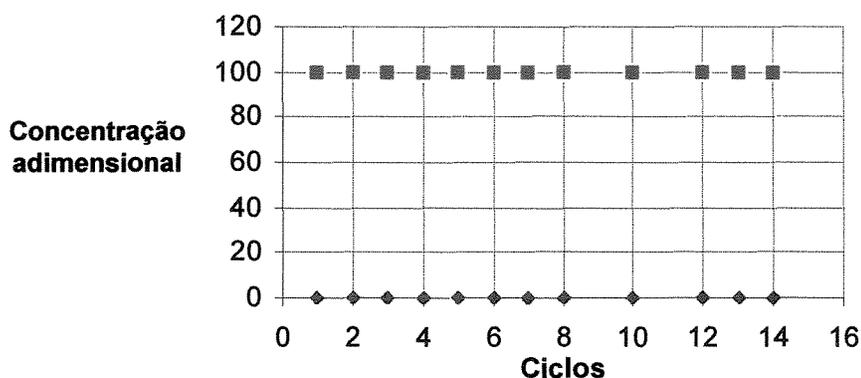
As Figuras 5.63 a 5.70 mostram os resultados do reprocessamento em REE das frações A1 e A2 obtidas como resultado de um primeiro processamento em REE usando como alimentação o soro do leite bovino com volumes de reciclo R1 e R2 de 3,0 mL.

De acordo com a Figura 5.62 o processamento 1 gera as frações A1 e A2, sendo que a fração A1 se torna a alimentação do processamento 2a, que por sua vez gera as frações A1a e A2a. Da mesma forma a fração A2 do processamento 1 se torna a alimentação do processamento 2b que gera as frações A1b e A2b.

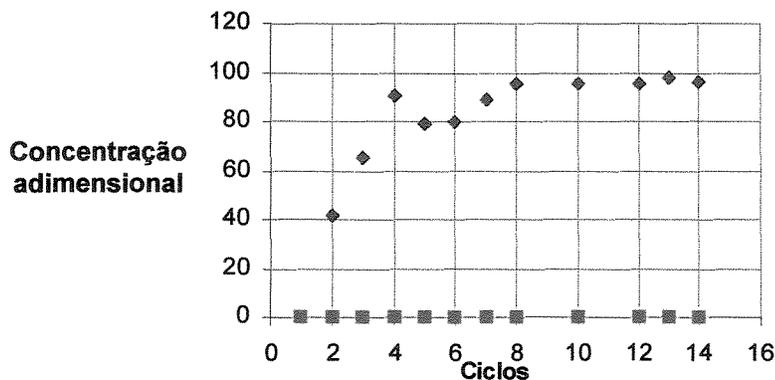
Um segundo processamento das frações coletadas de um experimento utilizando como alimentação o soro do leite bovino em REE resultou em um aumento na pureza das novas frações coletadas.



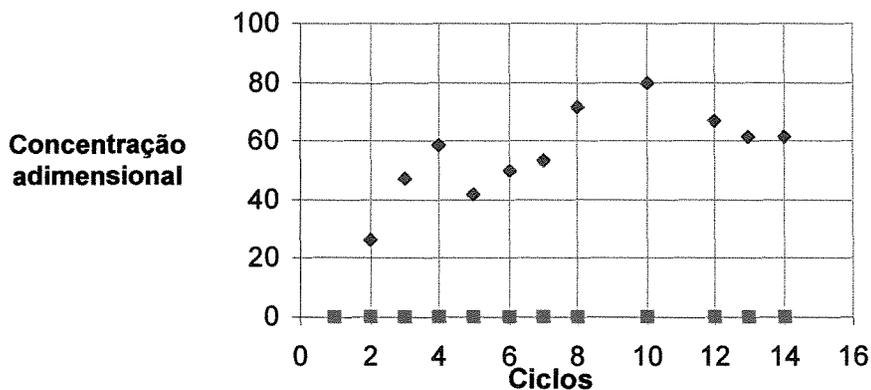
**Figura 5.63** Perfil da massa relativa das proteínas β-lactoglobulina (■) e α-lactalbumina (◆) para a amostra coletada A1a que foi obtida pelo processamento em REE das amostras A1 do processamento 1 utilizando como alimentação o soro bovino com volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.



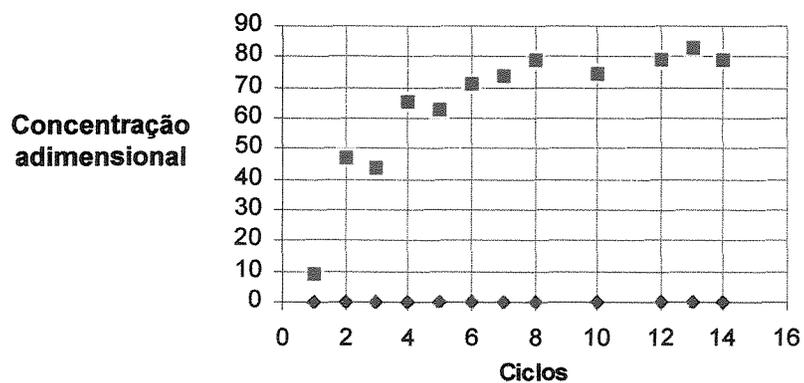
**Figura 5.64** Perfil da pureza relativa das proteínas β-lactoglobulina (■) e α-lactalbumina (◆) para a amostra coletada A1a que foi obtida pelo processamento em REE das amostras A1 do processamento 1 utilizando como alimentação o soro bovino com volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.



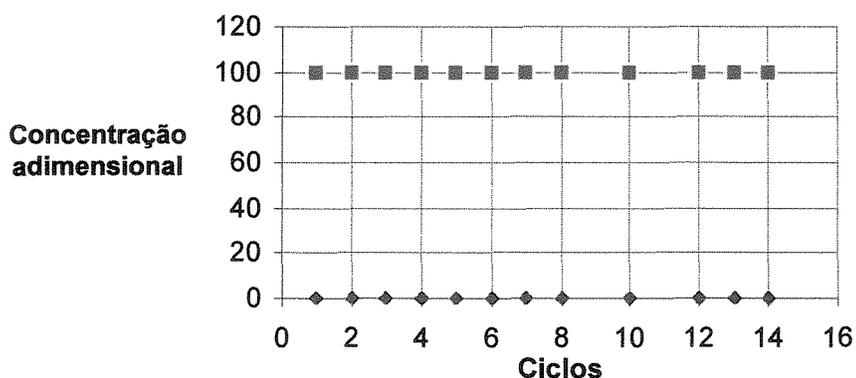
**Figura 5.65** Perfil da massa relativa das proteínas β-lactoglobulina (■) e α-lactalbumina (◆) para a amostra coletada A2a que foi obtida pelo processamento em REE das amostras A1 do processamento 1 utilizando como alimentação o soro bovino com volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.



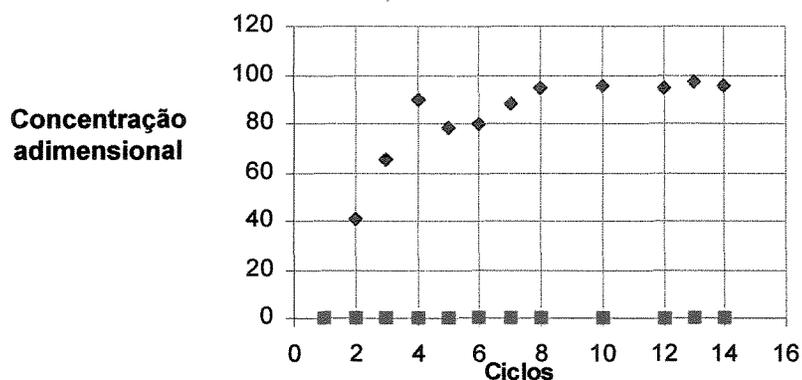
**Figura 5.66** Perfil da pureza relativa das proteínas β-lactoglobulina (■) e α-lactalbumina (◆) para a amostra coletada A2a que foi obtida pelo processamento em REE das amostras A1 do processamento 1 utilizando como alimentação o soro bovino com volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.



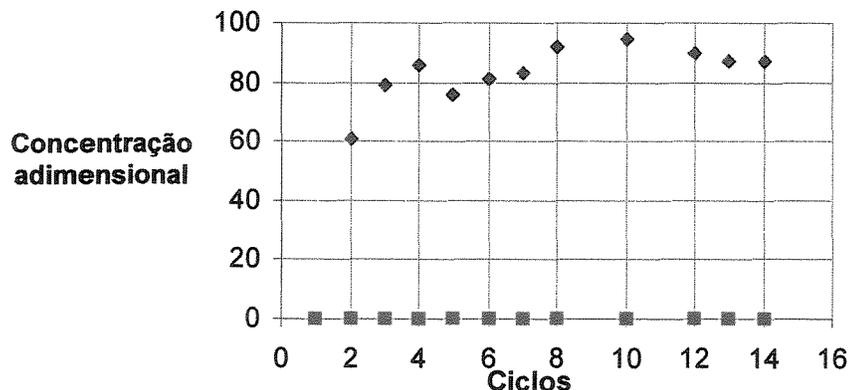
**Figura 5.67** Perfil da massa relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) para a amostra coletada A1b que foi obtida pelo processamento em REE das amostras A2 do processamento 1 utilizando como alimentação o soro bovino com volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.



**Figura 5.68** Perfil da pureza relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) para a amostra coletada A1b que foi obtida pelo processamento em REE das amostras A2 do processamento 1 utilizando como alimentação o soro bovino com volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.



**Figura 5.69** Perfil da massa relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) para a amostra coletada A2b que foi obtida pelo processamento em REE das amostras A2 do processamento 1 utilizando como alimentação o soro bovino com volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.



**Figura 5.70** Perfil da pureza relativa das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (■) e  $\alpha$ -lactalbumina (◆) para a amostra coletada A2b que foi obtida pelo processamento em REE das amostras A2 do processamento 1 utilizando como alimentação o soro bovino com volumes de reciclo R1 e R2 ambos com 3,0 mL.

Na Tabela 5.13, pelos resultados obtidos, é verificado que além de ocorrer baixa resolução de separação (visto que ocorre contaminação de ambas as frações A1 e A2), existe uma considerável perda de massa de  $\beta$ -Lactoglobulina durante o processamento do soro do leite bovino em REE com volumes de recirculação R1 e R2 de 3,0 mL.

No reprocessamento das frações A1 e A2, verifica-se que a massa relativa encontrada para as frações coletadas A1a, A2a, A1b e A2b aproxima-se de 1, ou seja, a massa de proteína coletada é aproximadamente igual à massa de proteína na alimentação. Porém, mesmo com uma alta recuperação foi verificado pelas análises em HPLC que a pureza das frações A2a e A2b não atingem valores próximos a 100%. Tal comportamento era de se esperar, visto que não foi verificada contaminação de  $\beta$ -Lactoglobulina nestas frações, a diminuição da pureza das frações A2a e A2b, podem ser atribuídas a resíduos de ordem protéica provenientes do próprio concentrado protéico do soro do leite bovino ou a proteínas de baixo peso molecular (menor que  $1,6 \times 10^4$  g/g-mol que é a massa molar da  $\alpha$ -lactalbumina).

Os fatores de concentração definidos pelas equações 5.40 e 5.41 foram bem menores que os encontrados nos experimentos realizados com as proteínas  $\beta$ -

Lactoglobulina e  $\alpha$ -Lactalbumina na forma de uma mistura binária. As frações coletadas se mostraram bem diluídas em relação à alimentação apesar de terem sido observados valores próximos a 100% de massa relativa e de pureza.

Para  $\alpha$ -Lactalbumina:

$$FC_{\alpha-La}^{A2n} = \frac{\frac{m_{\alpha-La}^a}{V_a nc}}{\frac{m_{\alpha-La}}{V_{A2n} nc}} \Rightarrow FC_{\alpha-La}^{A2n} = \frac{m_{\alpha-La}^a V_{A2n}}{m_{\alpha-La} V_a} \quad (5.40)$$

Para  $\beta$ -Lactoglobulina:

$$FC_{\beta-Lg}^{A1n} = \frac{\frac{m_{\beta-Lg}^a}{V_a nc}}{\frac{m_{\beta-Lg}}{V_{A1n} nc}} \Rightarrow FC_{\beta-Lg}^{A2n} = \frac{m_{\beta-Lg}^a V_{A1n}}{m_{\beta-Lg} V_a} \quad (5.41)$$

Onde  $m_{\alpha-La}^a$  é a massa de  $\alpha$ -La na alimentação do primeiro processamento usando o concentrado protéico do soro do leite,  $m_{\beta-Lg}^{A1n}$  é a média das massas de  $\alpha$ -lactoglobulina para a fração coletada  $A1n$  (n equivale a “a”, “b” ou é inexistente quando referente ao primeiro processamento),  $V_{A1n}$  é o volume coletado da fração  $A1n$  e  $V_a$  é o volume da alimentação.

**Tabela 5.13** Resultados do processamento em REE usando como alimentação o soro do leite bovino com volumes de reciclo R1 e R2 de 3,0 mL.

processamento		1	2a	2b	
<b>Massa Total Injetada (mg)</b>	$\alpha$ -La	42,7	2,7	11,9	
	$\beta$ -Lg	89,0	13,8	12,5	
<b>Massa Total Coletada (mg)</b>	<b>Fração A1n</b>	$\alpha$ -La	4,7	0,0	0,0
		$\beta$ -Lg	23,4	10,0	7,8
	<b>Fração A2n</b>	$\alpha$ -La	20,9	2,1	9,0
		$\beta$ -Lg	22,5	0,0	0,0
<b>Redimento* (%)</b>	$\alpha$ -La	49,3	73,4	63,9	
	$\beta$ -Lg	26,6	77,2	76,7	
<b>Perdas (mg)</b>	$\alpha$ -La	1,7	0,5	2,1	
	$\beta$ -Lg	38,7	0,6	0,4	
<b>Pureza* (%)</b>	$\alpha$ -La em A2n	50,0	63,4	87,8	
	$\beta$ -Lg em A1n	70,1	100,0	100,0	
<b>Fator de Concentração</b>	$\alpha$ -La em A2n	0,41	0,04	0,16	
	$\beta$ -Lg em A1n	0,21	0,09	0,07	

## CAPÍTULO 6

### 6 CONCLUSÕES

1. Com base nos resultados obtidos no estudo da separação binária das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina em Reciclo Externo Estacionário (REE) utilizando duas colunas cromatográficas empacotadas com resinas de exclusão de tamanhos Sephadex 200, pode-se chegar às seguintes conclusões:
2. É de extrema importância a uniformidade das características das colunas cromatográficas utilizadas em sistemas de Reciclo Externo Estacionário (REE), principalmente, em termos de massa de resina, volume de leito e principalmente eficiência de separação, sendo esta última medida através do número de pratos teóricos.
3. O empacotamento correto das colunas cromatográficas é fator determinante para que o processo de separação em Reciclo Externo Estacionário (REE) seja confiável e para que os ciclos de processamento se apresentem uniformes.
4. A técnica de determinação dos coeficientes de difusão das proteínas em estudo pelo método dos momentos se mostrou uma ferramenta eficaz para a comparação com os valores presentes na literatura e também serviu para avaliação do desempenho das colunas cromatográficas utilizadas no processo de separação em Reciclo Externo Estacionário (REE).

5. Foi verificado que os valores dos coeficientes de difusão  $D_{ef}$  na partícula da resina utilizada no processo (Sephadex 200) para as proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina não apresentaram grandes variações quando avaliados em função da concentração de proteína na faixa de 0,5 a 2,5 mg/mL utilizando o método dos momentos.
6. O reciclo externo estacionário aplicado à separação de uma mistura binária das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina mostrou um elevado desempenho promovendo rendimentos maiores que 85% e purezas próximo a 100%.
7. Foram obtidos na presente tese valores elevados de rendimento e pureza para o processamento de uma mistura binária das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina em reciclo externo estacionário utilizando colunas cromatográficas com resinas de exclusão de tamanho. Os valores dos fatores de concentração se mantiveram menores que 1, significando que as frações coletadas foram mais diluídas que a alimentação. O processo REE necessita, portanto, ser complementado por uma etapa de concentração para a obtenção das proteínas individuais mais concentradas.
8. O aumento do rendimento das frações aumenta com o volume recirculado das frações R1 e R2. No entanto, para os experimentos com volumes de recirculação de 2,5 e 3,0 mL foram observadas perdas de massa de proteína no processo.
9. Os resultados obtidos pela simulação utilizando o modelo matemático aplicado, mostraram-se satisfatórios uma vez que estes seguiram a mesma tendência dos resultados obtidos experimentalmente.

## CAPÍTULO 7

### 7 SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

1. Utilizar a técnica de Reciclo Externo Estacionário na separação protéica utilizando colunas com resinas de troca iônica, para isso deverá ser feito estudos preliminares de equilíbrio.
2. Estudar a variação das condições operacionais como vazão volumétrica, tipo de tampão utilizado, pH, temperatura, etc., utilizadas na separação protéica utilizando a técnica de Reciclo Externo Estacionário.
3. Realizar novos estudos da técnica de Reciclo Externo Estacionário priorizando aumento de escala assim como utilizar diferentes volumes de leite nas colunas cromatográficas.
4. Estudar a discretização dos modelos matemáticos utilizados na simulação da separação e purificação protéica, utilizando a técnica de reciclo externo estacionário, usando o método da colocação ortogonal em elementos finitos.

## CAPÍTULO 8

### 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD, F.H., BLANCH, H.W., WILKE, C.R., "Liquid chromatography plate height equations" **Journal of Chromatography**, v. 330, p. 159-199,(1985).

BLANCH, H. W. e CLARK, D. S., "**Biochemical Engineering**", Marcel Dekker, p. 5-25, (1997).

CORBETT, J. E BURKE, D. "System optimization in the chromatographic separation of fructose from dextrose in the corn wet milling industry", **Proceedings of Symposium on Industrial-Scale Process Chromatographic Separations**, New Orleans,U.S.A., March, (1996).

DAVIS, J. G. "**Cheese, Volume I Basic Technology**", J. & A. Churchill Ltd., London, Chapter 2, p. 22., (1965).

DE WIT, J. N., "**Functional properties of whey proteins**". Developments in Dairy Chemistry – 4. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London & New York, (1989).

FINLAYSON, B. A., "Nonlinear analysis in chemical engineering", McGraw-Hill, New York, (1980).

FOX, P. F., "**The milk proteins system**". Developments in Dairy Chemistry – 4. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London & New York, (1989).

- FOX, P. F., "The milk proteins system". **Developments in Dairy Chemistry – 4**. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London & New York, (1989).
- FRACOTTE, E. e RICHERT, P., "Applications of simulated moving bed chromatography to the separation of the enantiomers of chiral drugs", *J. Chromatogr.*, v A 769, p. 101-107, (1997).
- FRACOTTE, E. e RICHERT, P., "Simulated moving bed chromatography resolution of chiral antitussive", *J. Chromatogr.*, v A 796, p. 239-248, (1998).
- FURUSAWA, T., SUZUKI, M., SMITH, J.M., "Rate Parameters in heterogeneous catalysis by pulse techniques", *Catal. Ver.-Sci. Eng.*, v. 13, p. 43-76, (1976).
- GANETSOS, G. E BARKER, P.E., Eds., "Preparative and Production Scale Chromatography", Marcel Dekker, Inc., New York, (1994).
- GATTUSO, M. J., UOP SORBEX® Simulated Moving Bed (SMB) Technology. A Cost-Effective Route to Optically Pure Products. **CHIMICA OGGI/Chemistry today**, September, p. 18-23 (1995).
- GEANKOPLIS, C. J., **Transport processes and unit operation**, Prentice Hall International Editions, New Jersey, (1993).
- GIDDINGS, J.C. e MALLIK, K.L., "Theory of Gel Filtration (Permeation) Chromatography", *Analytical Chemistry*, v. 38 (8), p. 997, (1966).
- GOTTSCHLICH, N. E KASCHE, V., "Purification of monoclonal antibodies by simulated moving-bed chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 765, p. 201-206, (1997).
- GOTTSCHLICH, N., WEIDGEN, S. E KASCHE, V., "Continuouos biospecific affinity purification of enzymes by simulated moving-bed chromatography:

- theoretical description and experimental results', **Journal of Chromatography A**, v. 719, p. 267-272, (1996).
- GRILL, C.M. and MILLER, L., "Separation of a Racemic Pharmaceutical Intermediate Using Closed-Loop Steady State Recycling", **Journal of Chromatography A**, v. 827, p. 359-371, (1998).
- GRILL, C.M., " External Steady State Recycling: A New Binary Preparative Chrometographic Technique", **Isolation and purification**, v. 3, p. 29-50, (1999).
- GROVES, M. L., "Preparation of some iron-binding proteins and  $\alpha$ -lactalbumin from bovine milk". **Biochim. Biophys. Acta**. v. 100, p. 154-162, (1965).
- HAGEL, L. e JANSON, J. C., "Size exclusion chromatography, in HEFTMANN, E., ed. **Chromatography**", 5<sup>th</sup> edition, p. 267-307. Elsevier, Amsterdam, (1992).
- HAHN, R., SCHULZ, P., SCHAUPP, C. e JUNGBAUER, A., "Comparasion of Cation-Exchangers for Fractionation of Bovine Whey Proteins" **Institute for Applied Microbiology**, poster, (1997).
- HARIS, D. C., **Quantitative Chemical Analyses**, Fifth Edition, W. H. Freuman and Company, New York, (1999).
- JAMES, E. A., "The application of multicomponente adsorption theory to ion-exchange chromatography system for recovery of whey proteins". Ph D Thesis, University of Queensland, Australia, (1994).
- JANSON, J. C., RYDÉM, L., "Protein Purification - Principles, High Resolution Methodos, and Applications". Second Edition, Wiley-VCH. New York (1998).
- KELLER, G. E., "Adsorption - Building Upon a Solid Foundation" **Chemical Engineering Progress**, v. 91 (10), p. 56-67, (1995).

- LEVENSPIEL, O., **Engenharia das Reações químicas**, 2ª Edição, Editora Edgard Blucher Ltda, São Paulo, p. 207-215, (1974).
- LUCENA, S. L. “**Modelagem e Simulação da Separação das Proteínas a-Lactalbumina e b-Lactoglobulina por Cromatografia Preparativa em Resinas Trocadoras de Ânions utilizando Leite Móvel Simulado**”, Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, Brasil, (1999).
- NAKANISHI, K., YAMAMOTO, S., MATUSNO, R., KAMIKUBO, T. " Analysis of Dispersion Mechanism in Gel Chromatography" **Agricultural Biology Chemistry**, v. 41, p.145-1473, (1977).
- NEVES, S. B., “**Modelagem de um leito fixo de adsorção para sistemas líquido-sólido**”, Salvador: UFBA, Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, (1991).
- ORAM, J. D., “Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-binding chelating agents. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 351, p. 170-176, (1968).
- POLSON, A, 1950, "Some Aspects of Diffusion in Solution in Solution and a Definition of a Colloidal Particle". **J. Phys. Colloid. Chem.**, 54, 649.
- REITER, B., “The biological significance of the non-immunoglobulin protective proteins in milk: lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase”. **Developments in Dairy Chemistry – 3**. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London & New York, (1985).
- SATTERFIELD, C. N., COLTON, C. Y., PITHER, W. H., Restricted diffusion in liquids within fine pores, **AIChE Journal**, v. 19, p. 628-635 (1973)
- SHULTE, M., “**Comparison of the specific productivity of different chiral stationary phase using for simulated moving bed chromatography**”, **Journal Chromatography**, c. A 813, p. 3735-3748, (1997).

- TANFORD, C. **Physical Chemistry of Macromolecules**, Wiley, New York, (1961).
- VAN DER LAAN, E. Th. Notes on the diffusion-type model for the longitudinal mixing in flow ( LEVENSPIEL, O. AND SMITH, W.,K.) **Chemical Engineering Science**, v. 7, p. 187-191, (1957).
- VILLADSEN, J. e MICHELSEN, M. L., “**Solution of differential equation models by polynomial approximation**”, Prentice Hall Inc, New Jersey, p. 445, (1978).
- YAMAMOTO, S., “**Ion Exchange Chromatography of Proteins**”, **Marcel Dekker, Inc., New York**, (1988).
- YAO, CHUNCAI, TIEN, CHI, “**Approximation of intraparticle mass transfer in adsorption process II – non-linear system**”, **Chemical Engineering Science**, v. 47, n. 2, p. 465-473, (1992)
- ZHIGUO LI., GU, Y., GU, T. “**Matemathical Modeling and Scale-up of Size-exclusion Chromatography**”. **Biochemical Engineering Journal**, v. 2, p. 145-155 (1998)