



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS  
BIOTECNOLÓGICOS**

**Tese de Doutorado**

**ESTUDO DOS MODOS BATELADA E RECICLO EXTERNO  
ESTACIONÁRIO PARA A SEPARAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO  
POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO**

**Anayla dos Santos Sousa**

**Orientador:** Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

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

Campinas – São Paulo

Setembro de 2011

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

So85e                      Sousa, Anayla dos Santos  
                                    Estudo dos modos batelada e reciclo externo  
                                    estacionário para a separação do ácido hialurônico por  
                                    cromatografia de exclusão por tamanho / Anayla dos  
                                    Santos Sousa. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

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

                                    1. Ácido hialurônico. 2. Biopolímeros. 3.  
                                    Cromatografia. 4. Cromatografia de troca iônica. I.  
                                    Santana, Cesar Costapinto. II. Universidade Estadual de  
                                    Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.  
                                    Título.

Título em Inglês: Study of batch and steady state recycling modes for hyaluronic acid separation by size exclusion chromatography

Palavras-chave em Inglês: Hyaluronic acid, biopolymers, Chromatography, Ion exchange chromatography

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

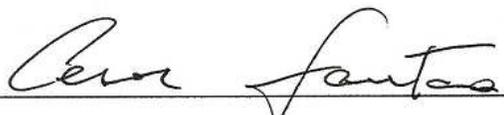
Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Diana Cristina Silva de Azevedo, Ivanildo José da Silva Júnior, Elcimar da Silva Nóbrega, Antônio Carlos Luz Lisboa

Data da defesa: 23-09-2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Anayla dos Santos Sousa e aprovada em 23 de Setembro de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



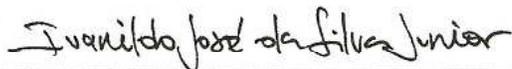
---

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana  
Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP  
Orientador



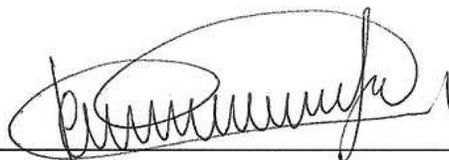
---

Profa. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo  
Departamento de Engenharia Química – UFC



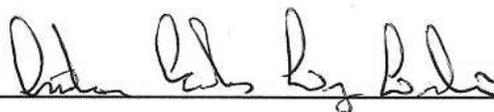
---

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior  
Departamento de Engenharia Química – UFC



---

Dr. Elcimar da Silva Nóbrega  
Empresa Vale S.A.



---

Prof. Dr. Antônio Carlos Luz Lisboa  
Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Anayla dos Santos Sousa e aprovada em 23 de Setembro de 2011.



---

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Orientador

Aos meus pais, Arlete Sousa e Osvaldo  
Sousa, os quais cultivaram o amor do qual  
sou fruto. Em especial, à minha mamãe,  
minha cúmplice em todos os momentos da  
minha vida!

# Agradecimentos

À Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida, pela permissão para vivenciar todos os momentos proporcionados, tenham eles sido bons ou ruins, bem como por toda maturidade adquirida neste período.

À minha grande família por todo o apoio e compreensão, mesmo estando tão distante. Eu amo vocês.

A CAPES pelo apoio financeiro ao longo do doutorado.

Ao Professor Dr. Cesar Costapinto Santana pela oportunidade concedida para realização do doutorado, pela paciência e pela orientação.

Ao Professor Dr. Antonio Carlos Luz Lisboa pelas maravilhosas aulas de inglês ministradas no intervalo do almoço, pelo aprendizado adquirido, pela amizade, pela generosidade e pela atenção. Tens a minha admiração.

A Professora Dra. Sônia Maria Alves Bueno pela oportunidade de desenvolvimento do Estágio à Docência, pelos conselhos e pela atenção.

A Professora Dra. Maria Helena Andrade Santana pelas amostras de ácido hialurônico gentilmente cedidas e pelos conselhos na discussão da minha Tese.

A todos os professores da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas por todo o conhecimento transmitido e adquirido.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão da minha Tese. Em especial ao Gilson e à Regina pelas vezes que eu os incomodei com meus afazeres da Tese.

Ao Jame's Almada, em especial, por ter estado presente em mais um capítulo da história da minha vida, dividindo sonhos, multiplicando alegrias, compartilhando momentos bons e fortalecendo-me nos ruins.

Àquelas que foram minha família aqui em Campinas, dividindo comigo a residência nesta cidade, convivendo dia e noite, feriados e finais de semana,

compartilhando alegrias, tristezas e reclamações, são elas: Juliana Egydio, Maria Cristiane Souza, Talita Bordignon, Hévila Brognaro, Fernanda Brognaro, Itiara Veiga, Nara Policarpo e Luisa Sepúlveda. Sentirei falta de vocês.

Aos meus valiosos companheiros do Laboratório de Biosseparações: Rafael Perna, Francine Antelo, Luisa Sepúlveda, João Paulo Vieira, Airton Salles e Alex, com quem convivi durante todo este período, vivenciando momentos inesquecíveis, discutindo e compartilhando conhecimentos científicos e experiência de vida; em especial às minhas preciosas amigas Ana Carolina Nascimento, Carla Aiolfi e ao meu grande amigo Absolon Carvalho, pelas horas de desabafo, pelas risadas durante o trabalho, por tornar o dia-a-dia de trabalho menos entediante. Eu amo vocês.

Aos meus amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos por todo o apoio concedido durante as etapas experimentais da minha Tese, em especial à Marina Vieira, Felipe Ferrari, Andréa Shimojo, André Casimiro, Leandro Benedini, Aline Pires, Carolina Camerin, a minha sincera gratidão.

Aos meus amigos do Laboratório de Interação Molecular e Bioengenharia, coordenado pela Profa. Dra. Sônia Bueno, do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, coordenado pelo Prof. Dr. Everson Alves Miranda, e do Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides, coordenado para Profa. Dra. Ângela Maria Moraes: Yuan Tsai, Gisele Pavan, Luana Cristina, Igor Bresolin, Iara Bresolin, Gisele Atsuko e Nemailla Bonturi por todo o apoio disponibilizado no decorrer dos procedimentos experimentais da minha Tese e no período de estágio à docência.

Aos meus amigos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas: Hildo Sena, Talita Honorato, Bianca Ayres, Ricardo Assis dos Santos e Valter Stroppa, por alegrarem minha rotina diária nos intervalos de trabalho.

Aos meus preciosíssimos amigos de Fortaleza-CE, que mesmo estando tão distantes de mim conseguiram emanar toda a força e energia positiva para que eu chegasse ao final da Tese com a mesma garra de quando a comecei. Em especial, as minhas amigas Valderez Rocha, Elizabete Carneiro, Ana Karine Pessoa Bastos, Josy Ramos, Wladiana Matos e Eveline Menezes. Sou mais feliz por tê-los em minha vida.

Aos demais amigos que conquistei durante a estadia no estado de São Paulo: Thaís Almeida, Ariane Almeida e Vinícius de Veredas.

*“Eu só queria  
Que você fosse um dia  
Ver as praias bonitas do meu Ceará*

*Tenho certeza  
Que você gostaria  
Dos mares bravios  
Das praias de lá*

*Onde o coqueiro  
Tem palma bem verde  
Balançando ao vento  
Pertinho do céu  
E lá nasceu a virgem do poema  
A linda Iracema dos lábios de mel*

*Oh! Quanta saudade  
Que eu tenho de lá  
Oh! Quanta saudade!”*

*Versos da canção “No Ceará é assim” (1942),  
Do compositor cearense, **Carlos Barroso**.*

# Resumo

O Ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear com importantes aplicações na indústria farmacêutica, médica e cosmética, fazendo-se necessária sua purificação por ser oriundo de uma variedade de fontes, animal e não animal. Assim sendo, o presente trabalho discorre sobre a separação do AH produzido por fermentação em meio de cultura sintético, utilizando a técnica cromatográfica de exclusão por tamanho. Determinaram-se as melhores condições de separação utilizando, inicialmente, uma coluna de exclusão por tamanho operando em batelada. Estas condições foram mantidas em todos os ensaios e serviram de modelo para a obtenção dos parâmetros para o escalonamento do processo. Ainda em batelada, avaliou-se a inserção da técnica cromatográfica de troca iônica acoplada à exclusão por tamanho, com o intuito de aprimorar a separação do AH, averiguando resinas de caráter catiônico e aniônico. Realizou-se um estudo comparativo entre o processo em batelada, com e sem a inserção da troca iônica, e o semicontínuo operado com reciclo externo estacionário (REE), visando a obtenção de frações de AH e proteínas com elevado grau de pureza. Considerando-se o processo semicontínuo operado em REE foram avaliados diferentes volumes de reciclo, sendo eles 1,0; 1,5; 2,25 e 3,0 mL. Os resultados obtidos com o processo semicontínuo em REE alcançaram um percentual de purificação entre 92% e 97% para o AH, trabalhando-se com volumes de reciclo de 1,0 a 3,0 mL, enquanto que para as proteínas mostrou-se inviável. A inserção da cromatografia de troca iônica mostrou-se promissora com o uso da resina catiônica, apresentando 98% de pureza com um rendimento de 99% para o AH; ao contrário da resina aniônica que exibiu uma perda mássica de AH em torno de 50%. O escalonamento do processo cromatográfico de exclusão por tamanho mostrou-se possível, apresentando resultados semelhantes à operação em batelada.

**Palavras-chave:** ácido hialurônico, cromatografia de exclusão por tamanho, reciclo externo estacionário e cromatografia por troca iônica.

# Abstract

The hyaluronic acid (HA) is a linear polysaccharide with important applications in the pharmaceutical, medical and cosmetics industry. Its purification is necessary because it is in a mixture coming from a variety of sources, animal and non-animal. The aim of this work is the separation of HA obtained by fermentation in synthetic medium, using the technique of size exclusion chromatography. The best conditions for HA separation were determined using, initially, a batch operation size exclusion column. These conditions were maintained in all trials and served to obtain the parameters for the large scale process. The batch operation also evaluated the ion exchange chromatography technique coupled to size exclusion, in order to enhance the separation of HA by examining cationic and anionic resins. A comparative study was carried out between the batch process, with and without the inclusion of ion exchange, and the semi-batch process with steady state recycling (SSR), in order to obtain fractions of HA and proteins with high purity. The semi-batch process operated with SSR assessed in different volumes of recycle (1.0, 1.5, 2.25 and 3.0 mL). The results obtained with the semi-batch process with SSR achieved a purification percentage between 92 % and 97% for HA, working with recycle volumes from 1.0 to 3.0 mL, showing to be feasible for HA, while for the proteins proved to be unfeasible, with a maximum of 60 % purity. The ion-exchange chromatography obtained good results with the use of cationic resin, with 98% of purity and a yield of 99 % for HA, unlike the anionic resin which exhibited a mass loss of HA around 50 %. The scale-up process for size exclusion chromatography proved to be possible, with similar results to batch operation.

**Key-words:** Hyaluronic acid, Size exclusion chromatography, Steady state recycle, Ion exchange chromatography.

# Sumário

<b>ABSTRACT</b> .....	X
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XVI
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XXIV
<b>NOMENCLATURA</b> .....	XXVI
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Considerações Gerais.....	1
1.2. Objetivo.....	4
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>6</b>
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1. Ácido Hialurônico .....	6
2.1.1. Perspectiva Histórica .....	6
2.1.2. Estrutura Química do Ácido Hialurônico .....	7
2.1.2. Glicosaminoglicanos .....	8
2.1.3. Propriedades do Ácido Hialurônico .....	10
2.1.3.1. Comportamento do Ácido Hialurônico em Solução.....	12
2.1.4. Obtenção do Ácido Hialurônico .....	13

2.1.5. Funções e Aplicações do Ácido Hialurônico .....	15
2.1.6. Ácido Hialurônico no Mercado .....	16
2.1.7. A importância da Pureza do Ácido Hialurônico.....	18
2.1.8. Processos de Purificação do Ácido Hialurônico.....	20
2.2. Cromatografia de Exclusão por Tamanho.....	22
2.2.1. Mecanismo de Retenção do Solute .....	23
2.2.2. Parâmetros Experimentais em Cromatografia de Exclusão por Tamanho .....	25
2.2.3. Fases Estacionárias empregadas em Cromatografia de Exclusão por Tamanho .....	28
2.2.3.1. Gel Sephacryl.....	29
2.2.4. Aplicações da Cromatografia de Exclusão por Tamanho ao Ácido Hialurônico .....	31
2.2.5. Escalonamento em Cromatografia de Exclusão por Tamanho.....	32
2.3. Sistema de Reciclo Externo Estacionário .....	34
2.3.1. Princípios da Cromatografia com Reciclo Externo Estacionário .....	36
2.3.2. Aplicações do Sistema de Reciclo Externo Estacionário .....	39
2.4. Cromatografia por Troca Iônica.....	43
2.4.1. Os Grupos Trocadores.....	44
2.4.2. Aplicações à Purificação do Ácido Hialurônico.....	46
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>48</b>
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1. Material .....	48
3.1.1. Ácido Hialurônico .....	48

3.1.2. Colunas Cromatográficas .....	49
3.1.3. Fases Estacionárias .....	49
3.1.4. Traçador.....	50
3.1.5. Reagentes.....	50
3.1.6. Equipamentos .....	51
3.2. Métodos.....	51
3.2.1. Empacotamento do Leito Cromatográfico .....	51
3.2.2. Determinação dos Parâmetros Hidrodinâmicos do Leito Cromatográfico.....	53
3.2.2.1. Determinação das Porosidades do Leito e da Partícula .....	53
3.2.2.2. Determinação do Número de Pratos Teóricos .....	55
3.2.2.3. Determinação do Coeficiente de Dispersão Axial.....	56
3.2.3. Obtenção do Ácido Hialurônico para Alimentação do Sistema.....	58
3.2.4. Separação do Ácido Hialurônico em Modo Batelada .....	59
3.2.4.1. Coluna empacotada com Resina de Troca Iônica em série com uma Coluna empacotada com Gel de Exclusão por Tamanho .....	60
3.2.4.2. Coluna empacotada com Gel de Exclusão por Tamanho .....	61
3.2.4.3. Saturação do Leito de Gel de Exclusão por Tamanho.....	62
3.2.5. Separação do Ácido Hialurônico em Reciclo Externo Estacionário .....	63
3.2.6. Detecção da Presença de Ácido Hialurônico e Contaminantes Protéicos .....	68
3.2.7. Quantificação do Ácido Hialurônico.....	69
3.2.8. Quantificação dos Contaminantes Protéicos .....	70
3.2.9. Determinação da Massa Molar do Ácido Hialurônico e dos Contaminantes Protéicos .....	71
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>73</b>

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	73
4.1. Empacotamento do Leito Cromatográfico .....	73
4.2. Hidrodinâmica das Colunas do Sistema de Reciclo Externo Estacionário .....	75
4.2.1. Determinação das Porosidades do Leito e da Partícula.....	75
4.2.2. Determinação do Número de Pratos Teóricos.....	78
4.2.3. Determinação do Coeficiente de Dispersão Axial.....	80
4.3. Avaliação da Massa Molar.....	82
4.4. Ensaio de separação do Ácido Hialurônico por Cromatografia de Exclusão por Tamanho em modo Batelada.....	84
4.4.1. Ensaio utilizando Coluna empacotada com Resina de Troca Iônica ligada a uma Coluna com Gel de Exclusão por Tamanho .....	85
4.4.1.1. Coluna empacotada com Resina de Troca Aniônica ligada a uma Coluna com Gel de Exclusão por Tamanho .....	85
4.4.1.2. Coluna empacotada com Resina de Troca Catiônica ligada a uma Coluna com Gel de Exclusão por Tamanho .....	87
4.4.2. Ensaio utilizando Coluna empacotada com Gel de Exclusão por Tamanho ...	89
4.4.2.1. Coluna XK 16/20 empacotada com gel Sephacryl S-300.....	90
4.4.2.2. Coluna XK 16/40 empacotada com gel Sephacryl S-300.....	94
4.4.2.3. Coluna XK 50/30 empacotada com gel Sephacryl S-300.....	96
4.4.3. Ensaio de Saturação do Leito de Exclusão por Tamanho .....	97
4.5. Ensaio de Separação do Ácido Hialurônico no Sistema de Reciclo Externo Estacionário.....	99
4.6. Avaliação do Coeficiente de Purificação das Frações A e B .....	116
4.7. Determinação da Massa Molar das Frações A e B .....	118

<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>121</b>
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....	121
5.1. Conclusões .....	121
5.1.1. Cromatografia de Exclusão por Tamanho em Batelada .....	122
5.1.2. Cromatografia de Troca Iônica acoplada à Cromatografia de Exclusão por Tamanho .....	122
5.1.3. Sistema de Reciclo Externo Estacionário com Cromatografia de Exclusão por Tamanho .....	123
5.1.4. Escalonamento em Cromatografia de Exclusão por Tamanho.....	124
5.2. Sugestões para Futuros Trabalhos.....	125
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>126</b>

# Lista de Figuras

- Figura 2.1: Estrutura do polímero linear de ácido hialurônico, composto pelas unidades dissacarídicas de Ácido D-Glicurônico (GlcA) e N-Acetil-D-Glicosamina (GlcNAc), bem como suas repetições ao longo da cadeia (JIANG et al., 2007). ..... 8
- Figura 2.2: Estrutura básica de alguns glicosaminoglicanos (KAKEHI et al., 2003). ..... 9
- Figura 2.3: Modelo de uma fita em formato espiral da cadeia de AH, submersa em solução fisiológica, em domínio tridimensional (PIRES, 2009; HASCALL e LAURENT, 1997; <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01.pdf>). ..... 12
- Figura 2.4: Representação esquemática da cromatografia de exclusão por tamanho. .... 23
- Figura 2.5: Representação esquemática do processo de eluição em SEC. (A) Molécula de massa molar muito pequena, (B) Molécula de massa molar intermediária e (C) Molécula de massa molar muito grande, totalmente excluída (MORI e BARTH, 1999). ..... 25
- Figura 2.6: Representação esquemática de um sistema REE utilizando apenas uma coluna.  $F_0$  – alimentação; FM – fase móvel; V – válvula de mudança de direção de fluxo; I - injetor; R – reciclo, A – primeira fração a ser eluída da coluna, B – última fração a eluir da coluna (adaptado de SAINIO e KASPEREIT, 2009). ..... 38
- Figura 2.7: Esquema do sistema REE operado no modo “circuito fechado” utilizado por GRILL e MILLER em 1998 para a separação de uma mistura racêmica. FM, fase móvel; C, coluna; D, detector; VCM e VI, válvulas de coleta múltipla e de injeção; R1, R2, RI e R, válvulas de resíduos; VR, válvula de reciclo; F1 e F2, coleta das frações 1 e 2; LI, loop de injeção; RA, reservatório de amostra (adaptado de GRILL e MILLER, 1998). ..... 40

Figura 2.8: Representação esquemática do sistema de reciclo alternativo em SEC proposto por AL-SOMALI et al., 2004 (adaptado de AL-SOMALI et al., 2004). .....	41
Figura 2.9: Representação esquemática do sistema REE utilizado por CRAWFORD et al., 2008. FC, coletor de frações; UV, detector de UV; C1 e C2, colunas; 2PV, válvula com duas posições; P, detector de polarímetro (adaptado de CRAWFORD et al., 2008). .....	42
Figura 2.10: Capacidades típicas de trocadores fortes: ácido (—) e básico (---) (adaptado de COLLINS et al., 2006). .....	45
Figura 2.11: Capacidades típicas e trocadores fracos: ácido (—) e básico (---) (adaptado de COLLINS et al., 2006). .....	45
Figura 3.1: Seqüência dos passos realizados na etapa experimental de empacotamento (adaptado de NÓBREGA, 2004). .....	52
Figura 3.2: Variação da altura equivalente a um prato teórico em função da velocidade superficial da fase móvel conforme a equação de van Deemter (KRIJGSMAN, 1992). .....	57
Figura 3.3: Fluxograma esquemático dos métodos experimentais empregados para a separação do AH a partir da sua obtenção. ....	59
Figura 3.4: Aparato experimental utilizado no ensaio em batelada para a separação do AH empregando-se apenas uma coluna de exclusão por tamanho. ....	61
Figura 3.5: Aparato experimental utilizado para a separação do AH em REE. A e B: bombas cromatográficas líquidas de baixa e média pressão. C <sub>1</sub> e C <sub>2</sub> : colunas de leito fixo de gel de exclusão por tamanho. V <sub>1</sub> e V <sub>3</sub> : válvulas de 4 vias para recirculação. V <sub>2</sub> : válvula de coleta de frações. Injetor para inserção de amostra no sistema. Detector de UV: sistema de detecção em linha (adaptado de NÓBREGA, 2004). .....	63
Figura 3.6: Interface do programa computacional utilizado para o controle automático das válvulas do sistema REE, desenvolvido pela Empresa MECATRON – Projetos e Consultoria Jr utilizando o software labVIEW. ....	64

Figura 3.7: Cromatograma característico do perfil de um ciclo cromatográfico de uma amostra de AH (contendo a mistura de AH e proteínas) no sistema REE. A e B são as frações coletadas ricas em AH e proteínas, respectivamente. R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são as frações recirculadas no sistema, sendo que na fração R<sub>1</sub> a concentração de AH está em maior proporção e na R<sub>2</sub> a concentração de AH encontra-se em menor proporção. A injeção da amostra em cada ciclo é realizada entre as zonas de reciclo (R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>)..... 68

Figura 3.8: Típica curva de calibração em SEC ilustrando pontos de massa molar *versus* volume de eluição ou volume de retenção de uma série de padrões poliméricos de massa molar conhecida. O volume de permeação total da coluna, V<sub>t</sub>, é igual ao volume de vazios da coluna, V<sub>o</sub>, mais o volume dos poros das partículas do leito, V<sub>i</sub>. M<sub>o</sub> é a massa molar definida como limite de exclusão da coluna e M<sub>t</sub> é a massa molar definida como limite de permeação total da coluna (MORI e BARTH, 1999)..... 72

Figura 4.1: Colunas preparativas empregadas na realização dos experimentos do respectivo trabalho: (A) coluna de troca iônica utilizada com a resina aniônica, Q-Sepharose Fast-Flow, ou catiônica, SP-Sepharose Fast-Flow; (B) XK 16/20; (C) XK 16/40 e (D) XK 50/30 empacotadas com o gel de SEC Sephacryl S-300 HR. .... 74

Figura 4.2: Dados experimentais da determinação do primeiro momento, em um leito fixo de gel, com os traçadores acetona (◇) e dextrana-azul (◆) para a coluna 1 – XK 16/20 (d.i. 1,6 cm e altura do leito de 13 cm) – do sistema REE, e o ajuste linear para cada traçador (-). .... 76

Figura 4.3: Dados experimentais da determinação do primeiro momento, em um leito fixo de gel, com os traçadores acetona (○) e dextrana-azul (●) para a coluna 2 – XK 16/20 (d.i. 1,6 cm e altura do leito de 13 cm) – do sistema REE, e o ajuste linear para cada traçador (-). .... 77

Figura 4.4: Curva de van Deemter (-) obtida através do ajuste dos pontos experimentais (◆) obtidos com o traçador dextrana-azul (0,2 %) na coluna 1 do sistema REE, empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, utilizando NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel..... 80

Figura 4.5: Curva de van Deemter (-) obtida através do ajuste dos pontos experimentais (●) obtidos com o traçador dextrana-azul (0,2 %) na coluna 2 do sistema REE, empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, utilizando NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel..... 81

Figura 4.6: Curva padrão de massa molar construída com padrões de ácido hialurônico utilizando coluna analítica Phenomenex PolySep GPC 6000 e pré-coluna, volume de injeção de 20 µL, temperatura ambiente, vazão de 1,0 mL/min, detector de índice de refração e NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel..... 83

Figura 4.7: Perfil do grau de diluição médio do AH (●) e dos contaminantes protéicos (○), bem como o comportamento da Condutividade (—) e do pH (—) ao longo da corrida cromatográfica, *versus* o tempo, obtidos no ensaio de separação da amostra de AH, após três precipitações em etanol e ressuspensões em NaCl 0,15M, utilizando uma coluna empacotada com a resina aniônica Q-Sepharose Fast-Flow, em série, a uma coluna preparativa com o gel Sephacryl S-300 HR, numa vazão de 1,5 mL/min, NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel, NaCl 1,0 M para eluição do componente retido no modo gradiente, volume de injeção de 1,5 mL e temperatura ambiente. .... 86

Figura 4.8: Perfil do grau de diluição médio do AH (●) e dos contaminantes protéicos (○), bem como o comportamento da Condutividade (—) e do pH (—) ao longo da corrida cromatográfica, *versus* o tempo, obtidos no ensaio de separação da amostra de AH, após três precipitações em etanol e ressuspensões em NaCl 0,15M, utilizando uma coluna empacotada com a resina catiônica SP-Sepharose Fast-Flow, em série, a uma coluna preparativa com o gel Sephacryl S-300 HR, numa vazão de 1,5 mL/min, NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel, NaCl 1,0 M para eluição do componente retido no modo gradiente, volume de injeção de 1,5 mL e temperatura ambiente. .... 88

Figura 4.10: Cromatogramas das análises de algumas alíquotas coletadas, na saída da coluna XK 16/20 empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, durante a análise da amostra de AH após três precipitações com Etanol e ressuspensões em NaNO<sub>3</sub> 0,1 M, utilizando-se a coluna Phenomenex PolySep GPC 6000, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL, temperatura ambiente, NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel, (A) detector de índice de refração e (B) detector UV-Vis em comprimento de onda de 280 nm. .... 92

Figura 4.11: Cromatogramas das análises de algumas alíquotas coletadas, na saída da coluna XK 16/20 empacotada com o gel Sephacryl S-500 HR, durante a análise da amostra de AH após três precipitações com Etanol e ressuspensões em  $\text{NaNO}_3$  0,1 M, utilizando-se a coluna Phenomenex PolySep GPC 6000, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , temperatura ambiente,  $\text{NaNO}_3$  0,1 M pH 7,0 como fase móvel, (A) detector de índice de refração e (B) detector UV-Vis em comprimento de onda de 280 nm. .... 94

Figura 4.12: Cromatogramas das análises de algumas alíquotas coletadas, na saída da coluna XK 16/40 empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, durante a análise da amostra de AH após três precipitações com Etanol e ressuspensões em  $\text{NaNO}_3$  0,1 M, utilizando-se a coluna Phenomenex PolySep GPC 6000, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , temperatura ambiente,  $\text{NaNO}_3$  0,1 M pH 7,0 como fase móvel, (A) detector de índice de refração e (B) detector UV-Vis em  $\lambda = 280$  nm. .... 95

Figura 4.13: Cromatogramas do ensaio de separação de AH após três precipitações com Etanol e ressuspensões em  $\text{NaCl}$  0,15 M, na coluna XK 50/30 empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, nas seguintes condições experimentais: vazão de 15 mL/min, volume de injeção de 30 mL, temperatura ambiente e  $\text{NaNO}_3$  0,1 M pH 7,0 como fase móvel. As alíquotas coletadas foram submetidas à análise para determinação da concentração de AH e proteínas, o que possibilitou o cálculo do grau de diluição de AH ( $\blacklozenge$ ) e proteínas ( $\diamond$ ). .... 97

Figura 4.14: Perfil de saturação do leito de gel Sephacryl S-300HR na coluna XK 16/20 utilizando uma amostra de AH após três precipitações com Etanol e ressuspensões em  $\text{NaCl}$  0,15 M, nas seguintes condições experimentais: vazão de 1,5 mL/min, temperatura ambiente e  $\text{NaNO}_3$  0,1 M pH 7,0 como fase móvel. As alíquotas coletadas foram submetidas à análise para determinação da concentração de AH e proteínas, o que possibilitou o cálculo do grau de diluição de AH ( $\blacklozenge$ ) e das proteínas ( $\diamond$ ). .... 98

Figura 4.15: Perfil de rendimento obtido para o AH ( $\blacklozenge$ ) e as proteínas ( $\diamond$ ) na fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de ciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 1,0 mL. .... 102

Figura 4.16: Perfil de rendimento obtido para o AH (◆) e as proteínas (◇) na fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> iguais a 1,5 mL. ....	103
Figura 4.17: Perfil de rendimento obtido para o AH (◆) e as proteínas (◇) na fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> iguais a 2,0 mL. ....	103
Figura 4.18: Perfil de rendimento obtido para o AH (◆) e as proteínas (◇) na fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> iguais a 3,0 mL. ....	104
Figura 4.19: Perfil de rendimento obtido para as proteínas (○) e o AH (●) na fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> iguais a 1,0 mL. ....	105
Figura 4.20: Perfil de rendimento obtido para as proteínas (○) e o AH (●) na fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> iguais a 1,5 mL. ....	106
Figura 4.21: Perfil de rendimento obtido para as proteínas (○) e o AH (●) na fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> iguais a 2,25 mL. ....	106
Figura 4.22: Perfil de rendimento obtido para as proteínas (○) e o AH (●) na fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> iguais a 3,0 mL. ....	107
Figura 4.23: Perfil de rendimento obtido para o AH (◆) e as proteínas (◇) na fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle automático de válvulas, considerando os volumes de reciclo R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> iguais a 3,0 mL. ....	108
Figura 4.24: Perfil de rendimento obtido para as proteínas (○) e o AH (●) na fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle automático de válvulas, considerando os volumes de reciclo R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> iguais a 3,0 mL. ....	109

Figura 4.25: Comportamento da pureza média relativa apresentada pelo AH (■) na Fração A e pelas proteínas (□) na Fração B para os diferentes volumes de reciclo $R_1 = R_2$ durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas.....	111
Figura 4.26: Pureza relativa do AH (■) e das proteínas (⊠) obtida para a fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle automático de válvulas, considerando os volumes de reciclo $R_1$ e $R_2$ iguais a 3,0 mL. ....	112
Figura 4.27: Pureza relativa das proteínas (⊠) e do AH (■) obtida para a fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle automático de válvulas, considerando os volumes de reciclo $R_1$ e $R_2$ iguais a 3,0 mL. ....	112
Figura 4.28: Pureza relativa do AH (■) e das proteínas (⊠) obtida para a fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo $R_1$ e $R_2$ iguais a 3,0 mL. ....	113
Figura 4.29: Pureza relativa das proteínas (⊠) e do AH (■) obtida para a fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo $R_1$ e $R_2$ iguais a 3,0 mL. ....	114
Figura 4.30: Perfil de recuperação médio para o AH (■)na Fração A e pelas proteínas (□) na Fração B para os diferentes volumes de reciclo $R_1 = R_2$ durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas.....	115
Figura 4.31: Comportamento do coeficiente de purificação para a fração A, rica em AH, ao longo dos ciclos de eluição no REE, variando-se os volumes de reciclo $R_1$ e $R_2$ em 1,0 mL (●); 1,5 mL (●); 2,25 mL (●) e 3,0 mL (●). ....	117
Figura 4.32: Comportamento do coeficiente de purificação para a fração B, rica em proteínas, ao longo dos ciclos de eluição no REE, variando-se os volumes de reciclo $R_1$ e $R_2$ em 1,0 mL (◆); 1,5 mL (◆); 2,25 mL (◆) e 3,0 mL (◆). ....	117
Figura 4.33: Variação da Massa Molar do AH na fração A ao longo dos ciclos de eluição no sistema REE, com os diferentes volumes de reciclo $R_1$ e $R_2$ : (●) 3,0 mL; (●) 2,25 mL e (●) 1,5 mL.....	119

Figura 4.34: Variação da Massa Molar das proteínas na fração B ao longo dos ciclos de eluição no sistema REE, com os diferentes volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$ : (◆) 3,0 mL; (◆) 2,25 mL e (◆) 1,5 mL..... 120

# Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Características dos membros da família dos glicosaminoglicanos.....	10
Tabela 2.2: Ocorrência do AH em diferentes tecidos animais, suas respectivas concentrações e alguns comentários relevantes (KOGAN et al., 2007).....	14
Tabela 2.3: Algumas aplicações médicas de ácido hialurônico e os respectivos produtos existentes no comércio (BROWN e JONES, 2005). .....	17
Tabela 2.5: Alguns géis comercialmente disponíveis para SEC. ....	29
Tabela 2.6: Características dos diferentes géis Sephacryl HR comercializados (WILLIAMS e HAGEL, 1999). ....	30
Tabela 2.7: Exemplos de alguns trocadores iônicos comerciais, baseados em resinas poliméricas naturais modificadas, e suas características químicas: tipo de matriz, grupo funcional e força do grupo trocador (forte/fraco) (adaptado de COLLINS et al., 2006). ....	46
Tabela 4.1: Dimensões das colunas XK utilizadas e os respectivos géis de recheio. ....	75
Tabela 4.2: Resultados alcançados através do cálculo das porosidades total, da partícula e do leito para as duas colunas pertencentes ao sistema REE.....	78
Tabela 4.3: Resultados obtidos através do cálculo do número de pratos teóricos por metro para as duas colunas pertencentes ao sistema REE. ....	79
Tabela 4.4: Parâmetros da equação de van Deemter e coeficiente de dispersão axial ( $D_{ax}$ ) obtidos para as colunas 1 e 2 do sistema REE, empacotadas com o gel Sephacryl S-300 HR.....	82

Tabela 4.5: Distribuição de massa molar para o AH (com relação ao percentual em área do fracionamento referente ao pico cromatográfico do AH visualizado por CLAE) da amostra inicial de AH após três precipitações em EtOH e ressuspensões em NaCl 0,15M. ....	84
Tabela 4.6: Alguns parâmetros experimentais obtidos para as colunas preparativas XK 16/20, XK 16/40 e XK 50/30 empacotadas com o gel Sephacryl S-300 HR, utilizados no ensaio em batelada. ....	90
Tabela 4.7: Condições operacionais estudadas durante os ensaios no sistema REE. ....	100

# Nomenclatura

A, B e C	Coefficientes da Equação de van Deemter
AH	Ácido Hialurônico
BSA	Albumina de soro bovino
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CRCF	Cromatografia em Reciclo com Circuito Fechado
$D_{ax}$	Dispersão axial
$D_m$	Difusão molecular
$d_{col}$	Diâmetro da coluna
$d_p$	Diâmetro da partícula
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
GFC	Cromatografia de filtração em gel
GPC	Cromatografia de permeação em gel
H	Altura do leito
HETP	Altura equivalente a um prato teórico
IR	Índice de Refração
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
$K_{SEC}$	Coefficiente de distribuição em SEC
L	Comprimento da coluna
LMS	Leito Móvel Simulado
N	Número de pratos teóricos
REE	Reciclo Externo Estacionário
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
$t_0$	Tempo de injeção do traçador
$t_R$	Tempo de retenção
$u$	Velocidade superficial da fase móvel
UV	Ultra-violeta
$V_{\text{amostra}}$	Volume de amostra
$V_G$	Volume total geométrico da coluna
$V_P$	Espaço interno das esferas porosas de gel
$V_R$	Volume de retenção
$V_S$	Volume de fase estacionária
$V_T$	Volume de líquido no leito
$V_V$	Volume de vazios da coluna
$w_{1/2}$	Largura do pico cromatográfico a meia altura

### LETRAS GREGAS

$\gamma_1$ e $\gamma_2$	Parâmetros numéricos da Equação 3.7.
$\epsilon$	Porosidade do leito
$\epsilon_P$	Porosidade da partícula
$\epsilon_T$	Porosidade Total
$\mu_1$	Primeiro momento
$\mu_2$	Segundo momento
$v$	Velocidade intersticial da fase móvel
$\sigma^2$	Variância



# Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Considerações Gerais

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear, composto por milhares de dissacarídeos formados por ácido D-glicurônico e N-acetil-D-glicosamina ligados entre si por ligação glicosídica  $\beta$  (1-3) e, alternados, por ligação glicosídica  $\beta$  (1-4) (KAKEHI et al., 2003). Também referido como um polieletrólito natural, o AH consiste de um gel hidratado encontrado em tecidos animais (ZHOU et al., 2006; RANGASWAMY e JAIN, 2008).

Na natureza, o AH é encontrado como parte da parede celular de algumas bactérias e na crista de galináceos. Nos mamíferos, o AH é abundante nas válvulas cardíacas, na pele, nos tecidos esqueléticos, no humor vítreo, no cordão umbilical e no líquido sinovial (JIANG et al., 2007). Comercialmente, o AH produzido pode ser de origem animal, cujas principais fontes são a crista de galináceos e o cordão umbilical, ou de origem não-animal, através da via fermentativa, utilizando bactérias do tipo *Streptococcus equi* (ZHOU et al., 2006; SOUSA et al., 2009; PIRES, 2009). A produção de AH por processos fermentativos vem sendo uma opção cada vez mais atraente, vantajosa e confiável, considerando-se as restrições quanto ao uso de materiais de origem animal e a conseqüente preocupação para aplicações biomédicas, devido à ameaça de contaminação por agentes virais (PIRES, 2009).

As aplicações do AH baseiam-se em suas propriedades físicas (hidratação e viscosidade), bem como na ordem de grandeza da sua massa molar (MORRA, 2005). A ausência de imunogenicidade ou de toxicidade, juntamente com suas propriedades viscoelásticas, levam a uma gama de aplicações nas indústrias cosmética, médica e farmacêutica, incluindo hidratantes para a pele, preenchedores faciais e na cicatrização de ferimentos (ZHOU et al., 2006; RANGASWAMY e JAIN, 2008). A demanda por AH é cada vez mais crescente em virtude da incessável busca da beleza e do rejuvenescimento pelo público mundial (PIRES, 2009).

A separação e purificação do AH implica na sua precipitação do caldo de fermentação, repetidamente, usando álcoois tal como etanol (ZHOU et al., 2006). No entanto, não é suficiente para a completa remoção de proteínas, provenientes do processo fermentativo, que atuam como impurezas, sendo necessário o emprego de uma nova etapa de purificação para atingir o nível proteico solicitado pelo mercado, por exemplo, Teosyal: 8 µg proteína/g AH; Synvisc: 43 µg proteína/g AH; e Hyalose: < 0,1% (<http://www.lifecore.com>). Alguns métodos têm sido descritos para a separação do AH, envolvendo sua precipitação inicial do meio fermentado, seguido de purificação por cromatografia de exclusão por tamanho, de troca iônica e cromatografia líquida em fase reversa por pareamento iônico (SOUSA et al., 2009; AKDAMAR et al., 2009). Outro método sugere a inserção de etapas de adsorção e ultrafiltração antes da precipitação do AH do meio fermentado (WON et al., 2008)

Macromoléculas da ordem de grandeza do AH podem ter sua purificação obtida pela técnica de cromatografia de exclusão de tamanho, também conhecida como permeação em gel. A cromatografia de exclusão por tamanho é baseada na diferença de tamanho molecular ou volume hidrodinâmico. Numa mistura contendo macromoléculas com diferentes massas molares, e que permeia em um leito com gel de exclusão por tamanho, o tempo de eluição é inversamente proporcional à massa molar. Componentes com diâmetros pequenos penetram nos poros das partículas do leito de gel diminuindo suas velocidades médias relativas e aumentando seus tempos de eluição. As moléculas maiores, por sua vez, recebem uma menor influência dos poros, pois não conseguem penetrar em todo volume dos poros das partículas e são eluídas primeiro (HARRIS e ANGAL, 1995).

A ampliação de escala de um sistema de cromatografia de exclusão por tamanho pode ser realizada tanto em batelada quanto com sistemas mais sofisticados, batelada sequencial ou semicontínuo, como é o caso do reciclo externo estacionário (REE). A separação por cromatografia preparativa em batelada, quando é requerida alta taxa de produção, requer grande quantidade de solvente. Como resultado, o custo operacional é alto e freqüentemente se apresenta inviável economicamente para produtos com baixo valor agregado. Porém, processos cromatográficos preparativos que envolvem reciclo apresentam uma série de vantagens como um maior rendimento da separação, menor consumo de solvente e maior produtividade em relação às técnicas tradicionais de cromatografia (NÓBREGA, 2004).

A técnica REE é um processo cíclico e similar ao processo cromatográfico contínuo, conhecido como Leito Móvel Simulado (LMS), em diversos aspectos. Ambos os processos são cíclicos e as frações são coletadas tanto nas porções iniciais quanto nas porções finais de um perfil cromatográfico circulante, e a alimentação é injetada no interior desse perfil. Entretanto, o LMS é um processo contínuo, enquanto que o REE é um processo descontínuo repetitivo (QUIÑONES et al., 2000). Essa técnica tem se mostrado um meio efetivo de separar biomoléculas de interesse na indústria farmacêutica, como por exemplo, enantiômeros (KENNEDY et al., 2004; GRILL et al., 2004; QUIÑONES et al., 2000; GRILL e MILLER, 1998), e misturas protéicas (NÓBREGA, 2004).

GRILL (1998) utilizou o REE com duas colunas para separar misturas de *p*-hidroxibenzoato de metila e *p*-hidroxibenzoato de propila. NÓBREGA (2004) utilizou o REE com duas colunas empacotadas com o gel de exclusão por tamanho Superdex 200 para separar uma mistura binária de  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, proteínas presentes no soro do leite bovino. O sistema REE, com duas colunas, apresenta as mesmas características que os sistemas com uma coluna; contudo, no lugar de um *loop* (reservatório de acondicionamento da amostra para injeção), em que é armazenada a fração a ser recirculada no sistema de uma coluna, no sistema com duas colunas esta fração é imediatamente enviada para a próxima coluna dando seqüência a uma nova separação e um novo ciclo.

Dentro deste contexto, a relevância do estudo comparativo dos modos batelada e semicontínuo utilizando-se a técnica do REE acoplada a cromatografia de exclusão por tamanho para a purificação do AH, obtido por fermentação em meio de cultura sintético, poderá viabilizar sua versatilidade operacional com o aumento da produtividade e, conseqüentemente, obtenção do produto com interessantes níveis de pureza. Além disso, esta técnica pode ser aplicada, também, caso necessário, à etapa de fracionamento da referida molécula de interesse, com a finalidade de obter diferentes massas molares de AH purificado.

## 1.2. Objetivo

A presente tese de doutorado tem o propósito de aprimorar um processo para a purificação do ácido hialurônico, obtido por via fermentativa, utilizando a técnica cromatográfica de exclusão por tamanho, estabelecendo um paralelo entre os modos batelada, com e sem a inserção da troca iônica, e semicontínuo operado com reciclo externo estacionário.

### **Metas utilizadas para o alcance do objetivo**

- Empacotamento de colunas em diferentes escalas, bem como a seleção de géis com melhor potencial de purificação para o AH, para serem avaliados nos ensaios em batelada e semicontínuo em reciclo externo estacionário;
- Levantamento de dados utilizando uma coluna, em modo batelada, para determinação de parâmetros hidrodinâmicos e de transferência de massa, bem como determinação das melhores condições cromatográficas para a separação do AH;
- Escalonamento do processo em batelada acompanhado dos respectivos experimentos sob determinadas condições escalonadas;
- Montagem do sistema de REE e conseqüente operação do mesmo, a fim de se obter frações de AH e proteínas com elevado teor de pureza;
- Automação das válvulas de direcionamento de fluxo do sistema REE, com o intuito de aperfeiçoar as condições operacionais.

# Capítulo 2

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Ácido Hialurônico

#### 2.1.1. Perspectiva Histórica

Os pesquisadores Karl Meyer e John Palmer, em 1934, descobriram e isolaram do humor vítreo bovino, um novo polissacarídeo, até então desconhecido, contendo duas moléculas de açúcares: ácido D-glicurônico e D-N-acetilglicosamina (HARDINGHAM, 2004; NECAS et al., 2008). O nome “ácido hialurônico” foi proposto pela junção do termo

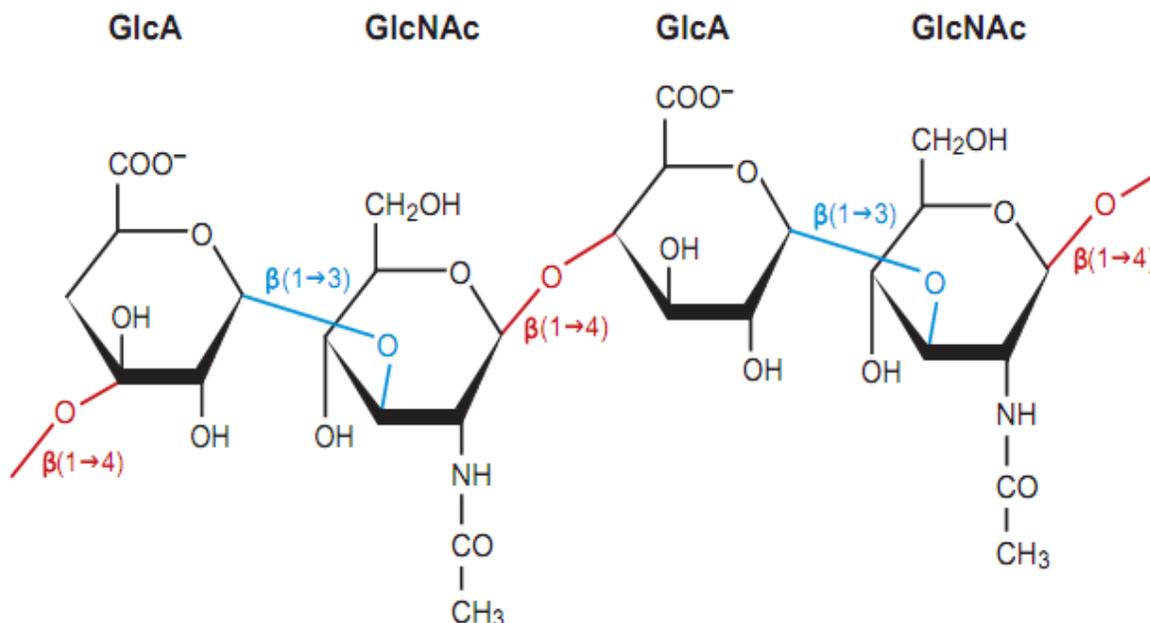
grego hialóide, que significa vítreo - local onde foi encontrado, e pela presença de ácido urônico (MEYER e PALMER, 1934; PIRES, 2009).

A estrutura do AH só foi elucidada em 1954, após 20 anos de sua descoberta, por Meyer que demonstrou a presença de dissacarídeos repetidos unidos por ligações  $\beta$ -1-3 e  $\beta$ -1-4 (PIRES, 2009; CHONG et al., 2005; WEISSMAN e MEYER, 1954). O isolamento da molécula de AH só tornou-se possível na década de 50, quando Meyer e outros colaboradores extraíram-na de tecidos animais, incluindo pele, fluido sinovial, cordão umbilical e crista de galináceos. No entanto, o AH extraído de tecidos retinham algumas proteínas, gerando controvérsias acerca da presença ou não de ligações covalentes entre o AH e as proteínas nos anos de 1960 e 1970 (LAPCIK et al., 1998).

### 2.1.2. Estrutura Química do Ácido Hialurônico

Como um polieletrólito natural, o AH é um polissacarídeo linear, não ramificado, membro da família dos glicosaminoglicanos sendo constituído por uma alternância de unidades dissacarídicas polianiónicas de ácido D-glicurônico (GlcA) e N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) associadas por uma ligação glicosídica  $\beta$ -1,3 (ZHOU et al., 2006; BALAZS, 2009). As unidades dissacarídicas são linearmente polimerizadas através de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (JIANG et al., 2007), resultando assim, em uma cadeia com a seguinte estrutura molecular:  $-\text{[ácido D-glicurônico (1-}\beta\text{-3) e N-acetil-D-glicosamina (1-}\beta\text{-4)]}_n\text{-}$ , contendo cerca de 2.000 a 25.000 unidades dissacarídicas repetidas (CHONG et al., 2005). A Figura 2.1 ilustra a estrutura do AH e as unidades sacarídicas que juntas formam a sua unidade dissacarídica.

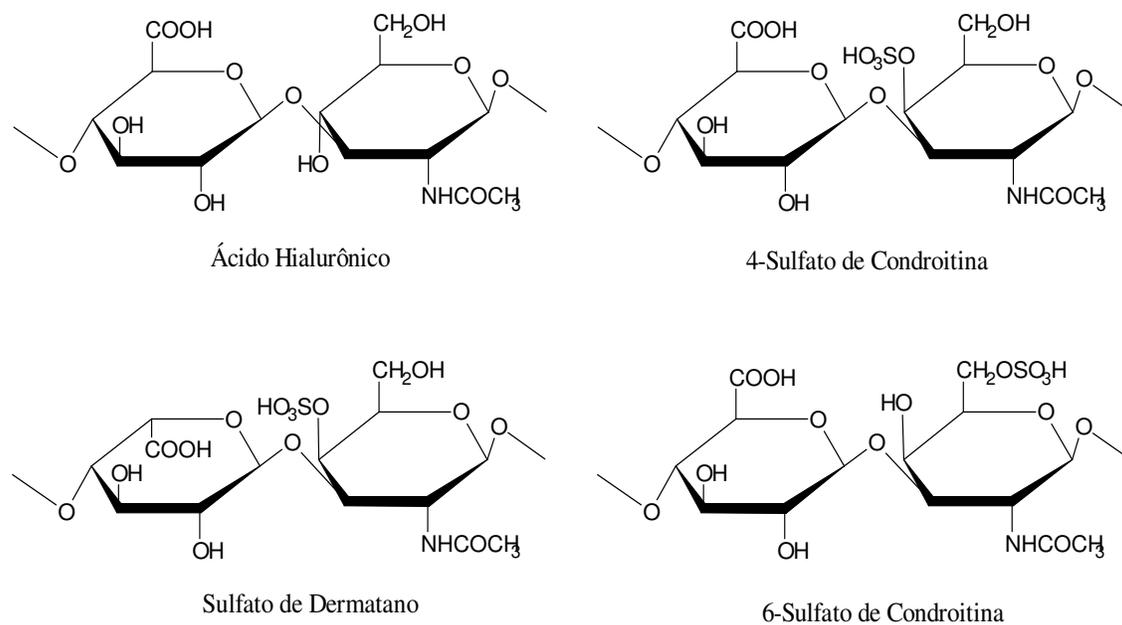
O número de dissacarídeos repetidos em uma molécula de AH pode atingir uma massa molar em torno de 4 milhões de Daltons, uma vez que cada dissacarídeo equivale a aproximadamente 400 Daltons. O comprimento médio de um dissacarídeo é de 1 nm. (COWMAN e MATSUOKA, 2005; NECAS et al., 2008).



**Figura 2.1:** Estrutura do polímero linear de ácido hialurônico, composto pelas unidades dissacarídicas de Ácido D-Glicurônico (GlcA) e N-Acetil-D-Glicosamina (GlcNAc), bem como suas repetições ao longo da cadeia (JIANG et al., 2007).

### 2.1.2. Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos com caráter ácido compostos de repetidas unidades dissacarídicas de açúcares amino (D-Glicosamina ou D-Galactosamina) e ácido urônico (ácido D-glicurônico ou ácido L-idurônico) ou galactose (em Sulfato de Keratan, KS) (LAGO et al., 2005; LAURENT, 1960). Com exceção do AH, que existe como um polímero livre, todos os demais glicosaminoglicanos são sulfatados e unidos covalentemente às proteínas do núcleo, formando os proteoglicanos. Os glicosaminoglicanos possuem funções fisiológicas importantes, tais como a retenção da água e o controle eletrolítico (SUNWOO et al., 1998). A Figura 2.2 mostra as estruturas básicas de alguns glicosaminoglicanos típicos.



**Figura 2.2:** Estrutura básica de alguns glicosaminoglicanos (KAKEHI et al., 2003).

A maioria dos glicosaminoglicanos é sintetizada no complexo de Golgi, dentro da célula, e estão unidas às proteínas. No entanto, o AH é sintetizado na membrana plasmática e não está associado a nenhuma proteína do núcleo. Estudos revelaram que o AH é sintetizado na parte interna da membrana celular (KAKEHI et al., 2003). A Tabela 2.1 apresenta algumas características dos glicosaminoglicanos.

**Tabela 2.1:** Características dos membros da família dos glicosaminoglicanos

---

Nome	Massa Molar aproximada (Da)	Composição dissacarídica
Ácido Hialurônico	1.000.000	Ácido D-Glicurônico + N-Acetil-D-Glicosamina
Sulfato de Dermatan (ou Dermatan)	35.000	Ácido L-Idurônico ou D-Glicurônico + 4-sulfato N-acetilgalactosamina
4-Sulfato de Condroitina	25.000	Ácido D-Glicurônico + 4-sulfato de N- acetilgalactosamina
6-Sulfato de Condroitina	25.000	Ácido D-Glicurônico + 6-sulfato de N- acetilgalactosamina
Sulfato de Heparano	15.000	Ácido D-Glicurônico ou L-Idurônico + 2-sulfato N-acetil-D-Glicosamina ou N-acetilgalactosamina
Sulfato de Keratan	10.000	Galactose ou Galactose 6-sulfato + N-acetil-D- Glicosamina 6-sulfato

---

### 2.1.3. Propriedades do Ácido Hialurônico

As propriedades do AH, como viscoelasticidade e comportamento no fluído, dependem do tamanho molecular ou volume hidrodinâmico, distribuição da massa molar, e conformação das macromoléculas. As amostras de AH, geralmente, não são monodispersas com relação à massa molar, fazendo-se necessário determinar uma massa molar média, ou ainda caracterizar a amostra através da distribuição da massa molar (COWMAN e MENDICHI, 2004).

As distribuições de tamanho molecular do AH variam de  $10^5$  a  $10^7$  Da (ZHOU et al., 2006). Podem também existir na forma de pequenos fragmentos ou oligossacarídeos (GARG e HALES, 2004). Este polissacarídeo é frequentemente referido como hialuronato de sódio, por apresentar-se mais estável na forma de sal, e não na forma de ácido protonado, como foi inicialmente descoberto (KAKEHI et al., 2003; NECAS et al., 2008). O AH difere de outros tipos de biopolímeros das seguintes maneiras (HORKAY et al., 2009):

- A estrutura central da molécula de AH é hidrofílica, quando submersa em água, diferente dos ácidos polinucleicos e lipídios que são hidrofóbicos. Polímeros com estrutura central da molécula hidrofóbicas são solúveis em água apenas na sua forma ionizada, e precipitam quando as interações eletrostáticas são compensadas. A estrutura central das moléculas de proteínas (cadeias peptídicas) é hidrofílica, mas muitas proteínas contêm seqüências de ambos os resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos.

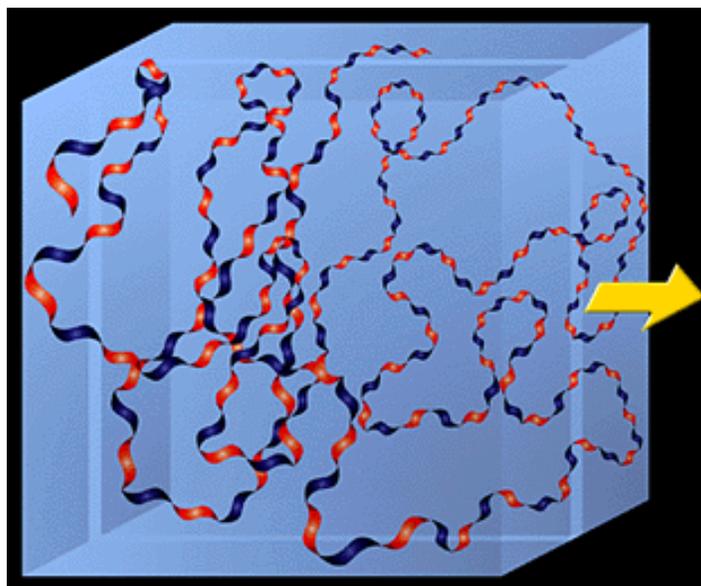
- O AH é um homopolímero, que vem a ser um polímero formado por unidades idênticas de monômeros, enquanto que os ácidos polinucleicos e as proteínas são copolímeros, formados por diferentes monômeros. A característica marcante do AH é que suas múltiplas funções são asseguradas por uma única espécie molecular.

- O AH exhibe rigidez da cadeia (comprimento de longa persistência), ao contrário das proteínas que são relativamente flexíveis.

O AH é um polímero randomicamente enovelado que ocupa um volume mil vezes maior do que é esperado, baseado em seu peso molecular e na sua composição. Muitas cargas negativas na molécula atraem cátions e água, o que lhe confere consistência de gel e propriedades de viscoelasticidade (GRAY et al., 2002). Pode-se imaginar que o AH é composto de longas cadeias aleatórias que ocupam um volume relativamente grande, que ajuda a envolver uma grande quantidade de água em suas cavidades entre as cadeias de enovelamento, agindo como uma esponja molecular (HARGITTAI e HARGITTAI, 2008).

### 2.1.3.1. Comportamento do Ácido Hialurônico em Solução

Em solução fisiológica, a molécula de AH assume uma estrutura enovelada, aleatória e semiflexível, ocupando um volume muito grande. A estrutura central desta molécula é fortalecida por uma combinação da estrutura química do dissacarídeo, ligações de hidrogênio e interações com o solvente (NECAS, et al. 2008). A Figura 2.3 ilustra o comportamento da molécula de AH em solução salina, em que as cores azul e vermelha alternadas na fita representam, respectivamente, as faces hidrofílicas e hidrofóbicas. Isto é consequência da posição assumida pelos grupos pertencentes à molécula de AH, no caso os átomos de hidrogênio alocados na posição axial constituem uma face relativamente hidrofóbica apolar (vermelha), enquanto que as cadeias laterais na posição equatorial formam uma face hidrofílica de maior polaridade (azul), contribuindo para a formação de uma fita em formato espiral (HASCALL e LAURENT, 1997; PIRES, 2009).



**Figura 2.3:** Modelo de uma fita em formato espiral da cadeia de AH, submersa em solução fisiológica, em domínio tridimensional (PIRES, 2009; HASCALL e LAURENT, 1997; <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01.pdf>).

Por ser hidrofílico quando submerso em água, o AH apresenta comportamento viscoelástico, devido à sua propriedade de reter água numa capacidade de milhares de vezes o seu próprio peso e do elevado número de grupos carregados. Estudos físico-químicos têm demonstrado que moléculas de AH em solução, numa concentração de 1,0 g/L, formam uma rede tri-dimensional estabilizada por interações entre cadeias (ZHOU et al., 2006). Fisicamente, apresenta-se semelhante à clara de ovo, sendo possível esticar um pouco sem quebrá-lo, confirmando a característica rígida da sua cadeia. Quando há uma solução com 1,0 % de AH e 99,0 % de água, ainda assim mostra-se viscosa e elástica (HARGITTAI e HARGITTAI, 2008). Em altas concentrações, as soluções de AH apresentam extrema dependência da viscosidade, que por sua vez é bastante elevada (NECAS et al., 2008).

#### **2.1.4. Obtenção do Ácido Hialurônico**

Um dos domínios de vertebrados em que o AH ocorre em grandes quantidades e concentrações é o corpo vítreo do olho, onde foi inicialmente encontrado. Foi então que, o olho – alvo em cirurgias oftalmológicas – tornou-se uma das primeiras aplicações de inserção do AH. Além do humor vítreo, o AH apresenta-se em abundância no líquido sinovial das articulações e no espaço intercelular da epiderme (HARGITTAI e HARGITTAI, 2008). Ele preenche o espaço entre as células de todos os tecidos como um dos componentes estruturais da biomatriz no corpo dos vertebrados (BALAZS, 2009).

Em um humano adulto, o volume do líquido sinovial é de cerca de 2,0 mL no joelho. O volume do corpo vítreo nos olhos de um adulto é de cerca de 4,0 mL, dos quais metade corresponde ao gel e a outra metade ao líquido (HARGITTAI e HARGITTAI, 2008). Quantitativamente, mais que 50% de AH (7,0 a 8,0 g em média por humano adulto) é encontrado no tecido da pele, onde ela está dividida em derme e epiderme, e em torno de 35,0 % nos músculos e esqueleto (CHONG et al., 2005). A Tabela 2.2 apresenta uma breve lista da ocorrência do AH em diferentes tecidos, suas respectivas concentrações e alguns comentários relevantes (KOGAN et al., 2007).

**Tabela 2.2:** Ocorrência do AH em diferentes tecidos animais, suas respectivas concentrações e alguns comentários relevantes (KOGAN et al., 2007).

---

<b>Tecido ou Fluido</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Comentários</b>
Soro humano	0,01 - 0,1	Elevadas concentrações de AH em soro de idosos, portadores de cirrose hepática e artrite reumatóide
Urina humana	0,1 – 0,3	Importante fonte de hialuronidase, enzima responsável pela quebra da molécula de AH
Linha torácica humana	0,2 – 50	AH com baixa massa molar
Coração de coelho	27	AH é o maior constituinte da matriz patológica que obstrui artérias coronárias em coelhos.
Cérebro de coelho	65	Supõe-se que AH atue na redução da ocorrência de tumores cerebrais em coelhos.
Epiderme humana	100	Maior concentração de AH em torno das células que o sintetizam
Humor vítreo humano	140 – 340	Elevadas concentrações de AH próximo à maturação deste tecido
Derme humana	200-500	Agente rejuvenescedor em dermatologia
Cartilagem nasal bovina	1200	Empregada como modelo de cartilagem em estudos experimentais
Fluido sinovial humano	1400 – 3600	Aumento de volume sob condições inflamatórias, diminuindo a concentração de AH
Cordão umbilical humano	4100	AH com massa molar elevada
Crista de galináceos	7500	Tecido animal com maior concentração de AH

---

O AH disponível comercialmente é obtido por extração da crista de galináceos ou produzido através de fermentação microbiana. Normalmente, o isolamento do AH a partir do extrato bruto, envolve a precipitação com solventes orgânicos, tais como o cloreto de cetilpiridina ou etanol. Para recuperar o AH isolado, a operação de filtração e/ou centrifugação faz-se necessária (YANG e LEE, 2007). Considerando a fermentação microbiana, o AH é normalmente obtido pelo cultivo de micro-organismos como *Streptococcus zooepidemicus* (ZHOU et al., 2006).

### **2.1.5. Funções e Aplicações do Ácido Hialurônico**

A descoberta da propriedade físico-química notável do AH, a viscoelasticidade, o tornou adequado para muitas aplicações, especialmente nas áreas farmacêutica e médica. Atualmente, grande parte da pesquisa médico-farmacêutica concentra-se no uso em sistemas de liberação controlada de fármacos em campos como a oftalmologia, dermatologia e traumatologia (LAPCIK et al., 1998; RANGASWAMY e JAIN, 2008). Outro papel fundamental do AH no organismo humano é a manutenção de algum espaço extracelular entre as células mais baixas na estrutura estratificada da epiderme para facilitar a difusão de fontes nutritivas e dos produtos residuais das células superiores (TAMMI e TAMMI, 1998). As funções biológicas apresentadas pelos oligômeros de AH têm também atraído o interesse com relação a sua massa molar.

A primeira aplicação médica do AH em humanos foi como um suplemento/reposição do humor vítreo durante uma cirurgia ocular em 1950. O AH utilizado nesta ocasião foi isolado inicialmente de cordão umbilical humano, e logo depois, passou a ser utilizado o AH extraído da crista de galináceos, devidamente purificado e com aspecto de massa molar elevada (WEISSMAN e MEYER, 1954).

Como um biomaterial, a primeira aplicação do AH data de 1961, quando foi empregado para substituir o corpo vítreo dos olhos em cirurgia corretiva de descolamento de retina. Em 1977, foi usado como material viscoelástico em cirurgia de catarata. Em

1985, foi realizado o primeiro implante de AH reticulado, estabilizando este material contra degradação. AH reticulado é usado para fins de adesão em cirurgias abdominais e no tratamento de disfunções degenerativas das juntas ósseas (KIM et al., 1996). NIMROD et al. (1988) e BROWN et al. (1994) reportaram a utilização de frações de hialuronato de sódio, procedente da crista de galináceos, na formulação de cosméticos.

As aplicações do AH, no campo biomédico, incluem cirurgias oftálmicas, o tratamento da artrose, regeneração dos tecidos, desenvolvimento embrionário, liberação controlada de fármacos e o uso em materiais de implante (PIRES, 2009). Também é utilizado em colírios e produtos alimentares (YANG e LEE, 2007). Segundo MARECAK e YEUNG (1999), AH de baixa massa molar tem sido usado para aplicações farmacêuticas tais como formação de hidrogel e fármacos para as articulações. Já na cosmetologia, a aplicação de AH é facilmente encontrada em cremes para rejuvenescimento facial, produtos de limpeza de pele e estética facial (ZHOU et al., 2006).

Muitas das aplicações do AH são baseadas em seu comportamento em solução aquosa. A caracterização das suas propriedades hidrodinâmicas é, por essa razão, um pré-requisito importante para definir sua utilização (LAPCIK et al., 1998).

### **2.1.6. Ácido Hialurônico no Mercado**

Em 1979, a empresa Biotrics, Inc. - Arlington, MA - lança para o mercado consumidor o *Healon*®, primeiro produto na área oftalmológica a base de AH, derivado da crista de galináceos. Este produto vem a ser um auxiliar cirúrgico utilizado na extração de catarata, transplantes de córnea e cirurgia de adesão de retina. Posteriormente, as empresas Pharmacia (Suécia) e Pfizer (Nova Iorque, EUA) passaram também a fabricá-lo. Já na área médica e cosmética, a iniciativa veio com o lançamento do produto *Hyalgan*® pela empresa Fidia (Pádua, Itália), também a base de AH, é utilizado topicamente desde 1960 para terapia de feridas e queimaduras (PIRES, 2009). A Tabela 2.3 apresenta algumas

aplicações médicas e os respectivos fármacos comerciais, a base de AH, comumente utilizados.

**Tabela 2.3:** Algumas aplicações médicas de ácido hialurônico e os respectivos produtos existentes no comércio (BROWN e JONES, 2005).

Problema Alvo	Aplicações	Produtos Comerciais
Osteoartrite ou Artrose	Lubrificação e suporte mecânico para as articulações	Artz® (Seikagaku, Japão), Orthovisc® (Anika, EUA), Opegan® e Opelead®
Cirurgia e Cicatrização de ferimentos	Implantação de lentes intraocular artificiais. Gel viscoelástico	Bionect®, Connettivina® e Jossalind®
Implantação de embrião	Meio de cultura para uso da fertilização <i>in vitro</i>	EmbryoGlue® (Vitrolife, EUA)

Outro campo de grande aplicação do AH é a viscosuplementação em articulações de pacientes com artrose. Nesta área, a comercialização se deu através da empresa Seikagaku (Tóquio, Japão) em 1987; no entanto, nos Estados Unidos, a aprovação da aplicação de AH em viscosuplementação só veio em 1997 e, desde então, vem crescendo cerca de 15,0 % ao ano (CHONG et al., 2005; PIRES, 2009).

O valor para os produtos contendo o AH como princípio ativo, comercializados no mercado mundial, mostra-se variável e dependente da massa molar e da pureza apresentada pelo princípio ativo, no caso o AH. Em líquidos biológicos, como a linfa e o sangue, sua massa molar é, consideravelmente menor (BALAZS, 2009). No tocante a pureza, o produto

*Hyalose*®, avaliado em cerca de US\$ 260,00, contém apenas 1,0 mg de AH com teor protéico inferior a 0,1% (<http://www.lifecore.com>). De forma geral, estima-se que o valor do mercado mundial seja em torno de US\$ 300 milhões no Japão e nos Estados Unidos, enquanto que, para a Europa apresenta-se inferior a US\$ 100 milhões (<http://www.q-med.com>; PIRES, 2009).

### **2.1.7. A importância da Pureza do Ácido Hialurônico**

O Ácido Hialurônico puro é uma substância de grande interesse para os pesquisadores das áreas cosmética, médica e farmacêutica, e para justificar sua importância, em termos de pureza, é necessário avaliar seu histórico de aplicações. A primeira aplicação do AH foi tanto pioneira, quanto potencialmente danosa. Este fato ocorreu na operação intra-ocular para inserção de AH no tratamento de descolamento de retina por um oftalmologista austríaco. O produto utilizado foi obtido a partir de fonte animal (cordão umbilical/vítreo bovino) e, certamente, deveria conter impurezas, o que agravou o problema, acarretando uma inflamação. Neste caso, acreditava-se que a inflamação seria um efeito colateral inevitável e que os benefícios da aplicação do AH, viriam após a superação do desconforto temporário (HARGITTAI e HARGITTAI, 2008).

A partir de então, surgiu a grande contribuição do pesquisador Balazs quando se recusou a aceitar a inevitabilidade de tais efeitos colaterais (BALAZS, 1983; HARGITTAI e HARGITTAI, 2008). Balazs investigou todos os tipos de corpos vítreos - mamíferos e peixes - determinando suas propriedades físicas e reológicas, a fim de encontrar um AH puro que ele definiu como não causador de inflamação, quando em sua aplicação. A relevância dessa abordagem é que as “impurezas” mais prováveis das amostras, causando a inflamação, seriam as proteínas (BALAZS, 2009).

O pesquisador Balazs também estudou as conseqüências da degradação do AH no uso clínico. Ele percebeu que não só o AH sofria as conseqüências da degradação em termos dos benefícios a serem utilizados, mas principalmente, suas propriedades físico-químicas específicas. A primeira delas é a viscoelasticidade. O AH degradado de baixo

peso molecular possui uma semelhança significativa com a água e, já há algumas décadas anteriores, a solução salina fisiológica tem sido aplicada em cirurgias oculares, como ferramenta útil no procedimento operatório. Uma importante lição aprendida a partir das aplicações iniciais de AH, como consequência da degradação, foi que não houve reações adversas imunológicas em pacientes. A grande invenção do pesquisador Balazs foi um procedimento químico para purificação do ácido hialurônico, utilizando um método de extração de clorofórmio para eliminar o conteúdo de proteína. Na época esta era uma técnica química conhecida e bastante empregada, e até então tem sido aplicada na purificação de ácidos nucleicos (HARGITTAI e HARGITTAI, 2008).

Em termos químicos, ressalta-se que a molécula de AH não contém a proteína covalentemente ligada à estrutura molecular do polissacarídeo. Estudos revelaram que em algumas biomatrizes sólidas, como a cartilagem, existem associações não-covalente entre o AH e certos proteoglicanos. Em biomatrizes líquidas como por exemplo, o fluido sinovial, essas associações não foram observadas. No vítreo e aquoso de olhos de peixes tais associações vem sendo averiguadas (BALAZS, 2009).

Avaliando em termos biológicos, as moléculas de AH para fins terapêuticos devem ser purificadas para remoção de todas as proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas que possam causar irritação, inflamação ou outra reação antigênica, que vem a ser a resposta do organismo a um determinado corpo estranho. Na década de 60, o maior desafio era a eliminação das impurezas, ainda não identificadas, que agiam como endotoxinas, causando inflamações. Quanto maior a massa molar, mais difícil é a remoção dos ácidos nucleicos e das proteínas. Isto, principalmente, devido ao fato da degradação das moléculas maiores durante as etapas de purificação, através do processo mecânico (homogeneização, filtragem, mistura) e do tratamento térmico (esterilização). É importante salientar que estes processos de purificação resultaram em produtos com uma grande variedade de massa molar e polidispersidade, ampliando a comercialização do AH em diferentes tamanhos de massa molar cuja aplicabilidade varia conforme sua respectiva massa molar (BALAZS, 2009).

### 2.1.8. Processos de Purificação do Ácido Hialurônico

A grande invenção de Balazs foi um procedimento químico para obtenção de AH puro, utilizando um método de extração com clorofórmio para eliminar o conteúdo de proteínas. Esta era uma técnica química conhecida e, futuramente, uma abordagem semelhante foi utilizada na purificação de ácido nucléico (HARGITTAI e HARGITTAI, 2008).

BLUSTEIN et al. (1964) isolaram o AH do meio de fermentação por precipitação com sulfato de amônio (50%) seguido de filtração, lavagem e aumento da concentração de sulfato de amônio até 65% para precipitação completa do AH. Neste método, obtiveram concentrações de AH variando de 0,5 a 1,0 g/L, com baixo teor de contaminantes. ZHOU et al. (2006) separaram AH do meio fermentado utilizando microfiltração em fluxo tangencial e ultrafiltração, conseguindo uma purificação de, aproximadamente, 80%. YANG e LEE (2007) isolaram e purificaram AH, a partir do meio fermentado, realizando três precipitações seguidas com etanol e ainda uma etapa de adsorção em quitosana conjugada com partículas magnéticas, obtendo 30% de AH livre de contaminantes protéicos, referindo-se ao percentual de proteínas existentes inicialmente.

RANGASWAMY e JAIN (2008) purificaram o AH utilizando uma seqüência de etapas: precipitação com isopropanol (50%), ultrafiltração por processo de diafiltração, seguido de filtração (em membrana com 0,22 µm); ao final das etapas obtiveram uma remoção de 96% das proteínas. AKDAMAR et al. (2009) separaram e purificaram AH através de adsorção por afinidade em esferas poliméricas reticuladas com ácido glicurônico, alcançando uma purificação superior a 90%. SOUSA et al. (2009) caracterizaram o AH em termos do fracionamento da sua massa molar e estudaram a viabilidade da purificação do AH por meio da cromatografia de permeação em gel.

Diversas patentes vêm surgindo com o propósito de purificar o AH proveniente de meio fermentado, algumas delas são citadas a seguir: YANG e KORNILOVA (2004) propuseram a purificação de AH com elevada massa molar através de dois passos consecutivos: o primeiro inclui uma hidrólise enzimática das proteínas e o segundo propõe

a separação por diferença de densidade. WON et al. (2008) descreveram um método para purificação do AH envolvendo quatro etapas consecutivas, sendo elas, adição de terra diatomácea para remoção de células, ultrafiltração do caldo fermentado, adsorção com carvão ativado e alumina, tratamento com solução de EDTA, seguido da precipitação com etanol. Neste método empregado por WON et al. (2008) o percentual final de proteínas foi de 0,01%. HAN et al. (2009) utilizaram resina de adsorção aromática seguido de tratamento com carvão ativado para purificação do AH, obtendo 99% de pureza e rendimentos entre 78-82%.

A patente proposta por MURATA e FUKUDA (2009) sugere diferentes métodos para purificação do AH. O primeiro destes métodos emprega a lavagem do AH com uma solução aquosa de metanol 55% (v/v) com adição de 5% (m/v) de cloreto de sódio seguido de centrifugação por cinco vezes consecutivas, alcançando um percentual final de proteínas de 0,03%. Os demais métodos consistem na variação do percentual de cloreto de sódio entre 3% e 4% (m/v), bem como o solvente orgânico utilizado (acetona, etanol ou metanol) e a variação do percentual destes solventes entre 40%, 50%, 55%, 60% e 65% (v/v). Destes diferentes métodos propostos, aquele que apresentou menor teor protéico (0,02%) empregou uma solução aquosa de acetona 40% (v/v) com adição de 4% (m/v) de cloreto de sódio seguido de centrifugação por cinco vezes consecutivas.

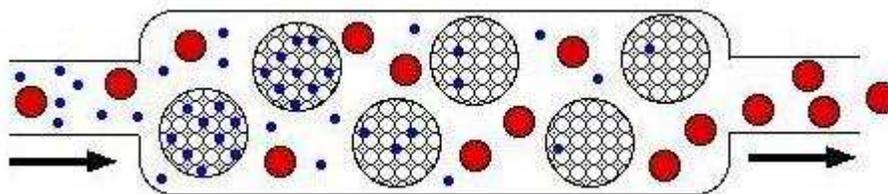
Outra patente proposta por KIM et al. (2008) apresenta a purificação do AH, proveniente da crista de galináceos, através de tratamento com diferentes sais de cálcio e fosfato objetivando a precipitação das impurezas, seguido das etapas de filtração e precipitação com etanol do AH presente no filtrado. Nesta patente foram alcançadas concentrações de proteínas inferiores a 0,02% e purezas de AH superiores a 90%.

## 2.2. Cromatografia de Exclusão por Tamanho

A cromatografia de exclusão por tamanho (*Size Exclusion Chromatography* - SEC) é uma técnica de separação baseada principalmente nos efeitos de exclusão, resultantes das diferenças na forma e/ou tamanho das moléculas relativamente aos espaços vazios no gel empregado como fase estacionária (YAO e LENHOFF, 2004). O método surgiu no final da década de 50 e vem alcançando um “quase” monopólio sobre a caracterização molecular dos polímeros em geral, sendo também válido para polímeros ramificados (GABORIEAU e CASTIGNOLLES, 2011). Outros termos, tais como cromatografia de exclusão estérica, cromatografia de permeação em gel (*Gel Permeation Chromatography* - GPC) ou cromatografia de filtração em gel (*Gel Filtration Chromatography* - GFC) tem sido usados (MORI e BARTH, 1999). No entanto, o termo GFC é aplicável às separações realizadas com fases móveis em solução aquosa, enquanto que GPC é referido quando solventes orgânicos são empregados como fases móveis. Já, pela IUPAC, recomenda-se a utilização do termo SEC, considerado como amplo, razão pela qual a separação é com base na exclusão de tamanho (GABORIEAU e CASTIGNOLLES, 2011).

Em SEC o soluto é dissolvido em um solvente apropriado e só então é injetado numa coluna empacotada com partículas porosas, de tamanho de poro definido. A fase móvel é geralmente o mesmo solvente usado para solubilizar o polímero. Os solutos são eluídos da fase estacionária em ordem decrescente de tamanho molecular, com base na diferença de tamanho molecular ou volume hidrodinâmico. A exclusão estérica é a responsável pela diferença de permeação dos solutos na matriz porosa, tendo como fator determinante a relação entre as dimensões do soluto e dos poros (YAO e LENHOFF, 2004). Os componentes difundem para dentro e fora dos poros, como observado na Figura 2.4, assim as moléculas com tamanho igual ou superior ao dos poros são excluídas totalmente deles, e são as primeiras a serem eluídas da coluna, originando assim, o volume de exclusão ou volume de vazios da coluna ( $V_V$ ). As moléculas com tamanho inferior ao dos poros sofrerão a influência da porosidade das partículas, acessando os poros totalmente,

e eluírão da coluna com um volume maior, chamado de volume de permeação ou volume total ( $V_T$ ) (MORI e BARTH, 1999).



**Figura 2.4:** Representação esquemática da cromatografia de exclusão por tamanho.

SEC é uma técnica relativa e não absoluta para a determinação da massa molar. Assim sendo, as colunas devem ser calibradas com padrões poliméricos de massa molar conhecida (MORI e BARTH, 1999). A técnica de SEC apresenta uma vantagem sobre as demais formas de cromatografia, pois possui recursos para ser utilizado como um método de fracionamento, bem como, meios de se obter informações sobre a distribuição de massa molar em uma fração polimérica (YAO e LENHOFF, 2004). No entanto, como desvantagem tem-se sua limitação de uso relacionado às características físicas da amostra utilizada como, por exemplo, amostras com tamanhos similares não se aplicam a separação por esta técnica, tais como os isômeros (WINZOR, 2003).

### 2.2.1. Mecanismo de Retenção do Solute

Considerando o modo de retenção do soluto em SEC é importante, primeiramente, definir a compartimentação dos volumes encontrados dentro da coluna de SEC. O volume total geométrico da coluna ( $V_G$ ) é definido como a soma do volume da fase estacionária ( $V_S$ ) com o volume de líquido no leito ( $V_T$ ) que, por sua vez, é definido como a soma dos espaços entre as esferas, volume de vazios ( $V_V$ ) mais o espaço interno das esferas porosas do gel ( $V_P$ ). A diferença de distribuição do soluto entre os espaços dos poros das partículas

do leito, interno e externo, resulta na separação do soluto com base no tamanho molecular (DUBIN, 1988).

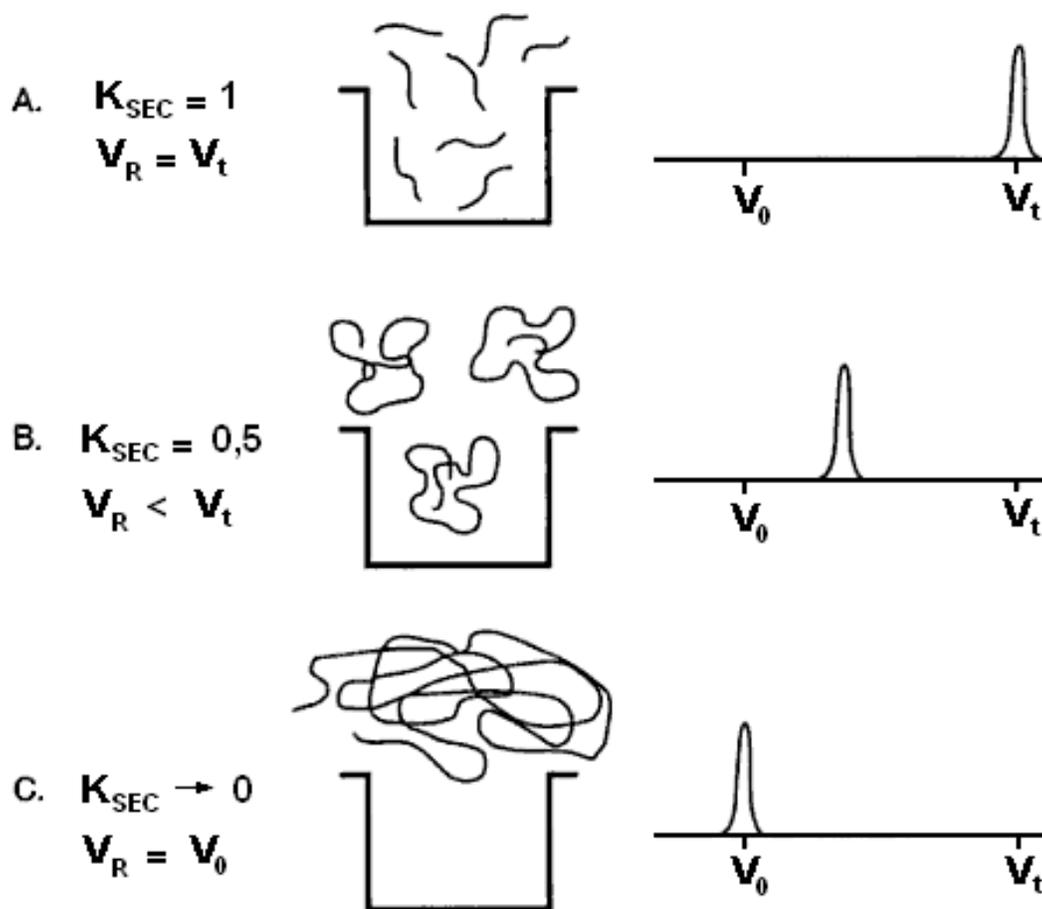
A capacidade de separação em colunas cromatográficas por SEC pode ser avaliada por uma variável independente denominada de coeficiente de distribuição em SEC ( $K_{SEC}$ ) também referido como o coeficiente de partição ou o coeficiente de exclusão. O  $K_{SEC}$  é um parâmetro termodinâmico definido como a razão da concentração média do soluto no volume dos poros e no volume intersticial, que é calculado a partir do volume de eluição, também chamado de volume de retenção ( $V_R$ ), que vem a ser o volume necessário para a eluição do composto de interesse que se encontra retido no interior da coluna, conforme se observa na Equação 2.1 (MORI e BARTH, 1999).

$$K_{SEC} = \frac{V_R - V_V}{V_P} = \frac{V_R - V_V}{V_T - V_V} \quad (2.1)$$

Na equação acima,  $V_R$  é o volume de eluição ou retenção da molécula,  $V_V$  é o volume dos espaços vazios entre as partículas na coluna (ou volume de eluição de uma molécula grande totalmente excluída),  $V_P$  é o volume de poro e  $V_T$  é o volume de líquido total no leito (ou volume de eluição de uma molécula pequena capaz de penetrar em todos os poros da partícula). Note que o  $K_{SEC}$  é baseado no volume total da partícula. Assim,  $K_{SEC} = 0$  para um soluto que for excluído completamente, enquanto que,  $K_{SEC} =$  porosidade total da partícula ( $\epsilon_T$ ) para um soluto capaz de acessar todos os poros das partículas (HUNTER e CARTA, 2000). A Figura 2.5 ilustra o processo de eluição em SEC para uma coluna com porosidade de partícula igual a 1, que caracteriza uma partícula muito porosa, logo para este caso a porosidade total do leito também é considerada 1 (MORI e BARTH, 1999).

Conhecendo-se a relação entre o tempo de retenção do pico cromatográfico e a sua massa molar, estes dados podem ser usados para caracterizar o polímero em termos da distribuição da massa molar e da massa molar média, que são critérios importantes em muitas aplicações industriais dos polímeros (CHURMS, 1996). Na área dos polímeros, a SEC é usada tanto para a separação quanto para a análise da distribuição da massa molar do

polímero (SOUSA et al., 2009). Biotecnologistas também usam SEC para a purificação de alta resolução e separação de vírus e proteínas maiores (AL-SOMALI et al., 2004).



**Figura 2.5:** Representação esquemática do processo de eluição em SEC. (A) Molécula de massa molar muito pequena, (B) Molécula de massa molar intermediária e (C) Molécula de massa molar muito grande, totalmente excluída (MORI e BARTH, 1999).

### 2.2.2. Parâmetros Experimentais em Cromatografia de Exclusão por Tamanho

Alguns parâmetros devem ser avaliados nos processos de separação por SEC. Alguns deles são: o tipo de gel empregado, o tamanho da coluna, a quantidade de amostra alimentada e a vazão de fase móvel trabalhada (COLLINS et al., 2006). Os pré-requisitos

importantes para a SEC são: dissolução total, não adsorção na fase estacionária e a não degradação do polímero (GABORIEAU e CASTIGNOLLES, 2011).

A total dissolução é um passo necessário para assegurar a totalidade da amostra a ser analisada, especialmente quando se trabalha com polímeros em SEC. Dificuldades na obtenção de uma suspensão polimérica clarificada, geralmente levam ao uso de outros recursos: calor, ultra-som, microondas, adição de sal, condições ácidas ou básicas. Estes podem levar à hidrólise da cadeia polimérica; no entanto, é essencial o cuidado para a não degradação da amostra, que vem a ser outro fator importante durante a dissolução da amostra (GABORIEAU e CASTIGNOLLES, 2011).

O tamanho da coluna influencia na resolução da separação em exclusão por tamanho, que mostra-se crescente com a raiz quadrada do comprimento da coluna. A resolução,  $R_s$ , é expressa pela relação mostrada na Equação 2.2.

$$R_s = \frac{\Delta V_R}{w_b} \quad (2.2)$$

Equação na qual  $w_b$  é a largura na base do pico cromatográfico e  $V_R$  é o volume de retenção do pico cromatográfico.

No entanto, deve-se atentar para a diluição da amostra, uma vez que a eluição do soluto, conduzido pela fase móvel, é dada por um mecanismo de distribuição favorecida pela fase estacionária. Neste caso, sugere-se o uso de reciclo ou colunas em série, em vez de uma única coluna longa (ROTHSCHILD em COLLINS et al., 2006). O volume de amostra deve ser pequeno em relação ao comprimento da coluna, contendo entre 1% a 5% do volume da coluna. Em se tratando de separações de grupos, este volume pode ser aumentado até 30%, sendo importante também o aumento do diâmetro e diminuição da altura da coluna, proporcionando maior vazão (ROTHSCHILD em COLLINS et al., 2006).

Outro fator a ser averiguado é a escala de trabalho em cromatografia, pois dependendo do emprego posterior do material separado pela cromatografia, a mesma pode ser dividida em escala analítica ou escala preparativa (COLLINS et al., 2006; LANÇAS,

2009). Segundo COLLINS et al. (2006), o diâmetro interno para as colunas analíticas é de no máximo 6 mm, e acima de 6 mm para as colunas preparativas, não considerando o termo “semi-preparativo”. Conforme LANÇAS (2009), o diâmetro interno para as colunas analíticas é de no máximo 4,6 mm, e para as colunas preparativas o diâmetro interno possui valores superiores a 10 mm. Portanto, existe uma pequena faixa na qual o diâmetro interno da coluna é superior à das analíticas e inferior á das preparativas. Esta faixa intermediária é denominada de coluna semi-preparativa, e sua maior utilização tem sido para o desenvolvimento e otimização de separações, as quais são posteriormente transferidas para a escala preparativa. A cromatografia em escala preparativa é executada em colunas de comprimento e diâmetro interno maiores que a analítica, uma vez que o objetivo usualmente é isolar grandes quantidades do(s) composto(s) de interesse. Estas colunas podem chegar a vários metros de comprimento e valores superiores a um metro para o diâmetro interno (LANÇAS, 2009).

Por outro lado, o termo “preparativa” representa um conceito ainda mais amplo, considerando o trabalho físico de preparo do leito, propriamente dito, englobando etapas desde o preparo da fase estacionária até o preenchimento da coluna com a respectiva fase estacionária, seguida de posterior análises para avaliação do empacotamento do leito, em termos de porosidade e números de pratos teóricos. A cromatografia em escala preparativa é aquela na qual o interesse maior é além da separação e/ou quantificação dos compostos, coletarem-se as frações contendo os compostos para posterior uso. Este uso posterior poderá ser a confirmação da identidade de um composto (por exemplo, através de ressonância magnética nuclear – RMN), a determinação da atividade biológica de um ou mais constituintes da fração, a verificação da utilização de uma fração isolada (por exemplo, como catalisador), a purificação de um fármaco através do isolamento das impurezas, dentre outras. Atualmente a técnica que mais emprega colunas preparativas é a cromatografia líquida (LANÇAS, 2009).

### 2.2.3. Fases Estacionárias empregadas em Cromatografia de Exclusão por Tamanho

Em geral, as fases estacionárias em SEC são géis poliméricos hidrofílicos com uma ampla distribuição do tamanho dos poros. É importante que as fases estacionárias não apresentem interações com os solutos (ZELIC e NESEK, 2006). A Tabela 2.5 apresenta alguns géis comercialmente disponíveis.

Inicialmente, os géis aplicados para cromatografia de exclusão em sistemas aquosos eram reticulados com dextrana, comercializado sob o nome de Sephadex (PORATH e FLODIN, 1959), ou poliacrilamida (Bio-Gel P). Considerando que as esferas de gel com elevado grau de reticulação são bastante resistentes à deformação, no caso da separação de pequenos solutos, os géis pouco reticulados utilizados no fracionamento de grandes proteínas ( $10^5$ - $10^6$  Da) tornam estas matrizes cromatográficas sensíveis ao empacotamento sob pressão. Uma matriz híbrida da dextrana-poliacrilamida, a qual seria dextrana-bisacrilamida (Sephacryl) foi desenvolvida para diminuir o grau de compressibilidade do gel (WINZOR, 2003).

Alguns dos géis usados em SEC foram modificados para aumentar sua rigidez, de modo que pudessem suportar as pressões dentro de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. Um exemplo de tal gel que vem sendo usado em cromatografia de exclusão por tamanho de alta eficiência é a agarose na forma reticulada (ANDERSSON et al., 1985) que, como grânulos de diâmetro médio 10-13  $\mu\text{m}$ , estão comercialmente disponíveis em colunas pré-empacotadas como Superose 6 e 12 HR (Pharmacia, Upsália, Suécia) (CHURMS, 1996).

A aplicação de SEC para moléculas com massa molar mais elevada tem acarretado o uso de géis de agarose (Sephacryl), a porosidade das quais dependem das pontes de hidrogênio nas ligações da rede tridimensional entre as cadeias de agarose: uma menor concentração de agarose gera uma rede tridimensional mais porosa (WINZOR, 2003).

**Tabela 2.5:** Alguns géis comercialmente disponíveis para SEC.

<b>Fabricante</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Tipo de matriz</b>
GE Healthcare	Sephadex	Dextrana
	Sephacryl	Dextrana/Bisacrilamida
	Sepharose	Agarose
	Sepharose CL	Agarose reticulada
	Superdex	Agarose/dextrana
	Superose	Agarose altamente reticulada
Biosepra S.A.	Ultrogel AcA	Agarose/poliacrilamida
	Trisacryl	Polímero de acrilamida
Bio-Rad Laboratories	Biogel A	Agarose
	Biogel P	Poliacrilamida
Pierce Chemical Company	Glycophase CPG	Sílica

### 2.2.3.1. Gel Sephacryl

O gel Sephacryl, constituído pela reticulação da alil dextrana com N,N'-metileno-bisacrilamida, surgiu no ano de 1970. O referido gel oferecia um diâmetro de partícula na faixa de 45-105  $\mu\text{m}$  e uma distribuição de tamanho de 70  $\mu\text{m}$ . No início dos anos 80, como uma melhoria aos géis já existentes, foram introduzidos no mercado os géis Sephacryl HR

de alta resolução. Com o respectivo aperfeiçoamento, os géis da série Sephacryl HR oferecem um diâmetro de partícula ainda menor (25-75  $\mu\text{m}$ ) e distribuição de tamanho de partícula de 50  $\mu\text{m}$ . As características dos géis Sephacryl atualmente comercializados são apresentadas na Tabela 2.6 e também estão disponíveis em colunas pré-empacotadas (WILLIAMS e HAGEL, 1999).

**Tabela 2.6:** Características dos diferentes géis Sephacryl HR comercializados (WILLIAMS e HAGEL, 1999).

---

<b>Tipo</b>	<b>Diâmetro da partícula (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Velocidade recomendada de operação (cm/h)</b>	<b>Estabilidade do pH (a longo prazo e em operação)</b>
Sephacryl S-100 HR	25 – 75	20 – 60	3 – 11
Sephacryl S-200 HR	25 – 75	20 – 60	3 – 11
Sephacryl S-300 HR	25 – 75	20 – 60	3 – 11
Sephacryl S-400 HR	25 – 75	20 – 60	3 – 11
Sephacryl S-500 HR	25 – 75	20 – 60	3 – 11
Sephacryl S-1000 SF	40 – 105	10 – 50	3 – 11

---

O gel sephacryl apresenta-se estável quando submetido a alterações no pH ou na força iônica, suportando a exposição prolongada na faixa de pH 3-11, no entanto pequenas variações no volume das partículas podem ser observadas quando expostos a solventes orgânicos, por exemplo acetona, formamida, dimetil sulfóxido e etanol. O congelamento e descongelamento de referido gel podem ocasionar o rompimento da estrutura do grânulo,

devendo ser evitado. Sephacryl oferece uma matriz que é apropriada tanto para o uso em laboratório, quanto para aplicações em larga escala (WILLIAMS e HAGEL, 1999).

#### **2.2.4. Aplicações da Cromatografia de Exclusão por Tamanho ao Ácido Hialurônico**

Uma variedade de métodos tem sido descrita com a finalidade de se estudar a massa molar do AH. Alguns desses métodos são: viscosimetria, GPC, eletroforese capilar, eletroforese em gel e espalhamento de luz (COWMAN e MENDICHI, 2004). A SEC tem sido muito utilizada como método para purificação de polímeros, como também para estimar a massa molar de um polímero (CUNICO et al., 1998). A inserção de detectores baseados em técnicas, tais como *Light Scattering* com laser de baixo ângulo e de múltiplos ângulos, que permitem a medida da massa molar, e outras características moleculares das frações poliméricas que emergem da coluna, tem fortalecido a base teórica da técnica de SEC (HOKPUTSA et al., 2003).

SUNWOO et al. (1998) isolaram diferentes glicosaminoglicanos utilizando SEC com o gel Sepharose CL-4B, alcançando uma recuperação de 90% para o sulfato de condroitina. SHIMADA e NAKAMURA (1994) empregaram os géis Sephacryl S-500 e S-1000 em SEC para determinar a massa molar do AH proveniente da crista de galináceos, atingindo resultados na ordem de magnitude entre  $10^4$  e  $10^5$  Da. PITKANEN et al. (2011) avaliaram o comportamento em termos de fracionamento de outros polissacarídeos perante SEC. LI et al. (2010) separaram proteínas por SEC empregando como fase estacionária diferentes monolitos poliméricos sintetizados, alcançando resultados satisfatórios em termos de separação.

SOUSA et al. (2009) relataram a caracterização do AH em termos de sua distribuição de massa molar por cromatografia de permeação em gel, alcançando uma distribuição de massa molar entre  $10^3$  e  $10^7$  Da comparada com uma curva de massa molar construída com padrões de pullulan. Ainda neste trabalho, SOUSA et al. (2009)

conseguiram uma eliminação protéica de 87%, a partir do caldo fermentado, realizando quatro precipitações em etanol e ressuspensões em solução salina.

### 2.2.5. Escalonamento em Cromatografia de Exclusão por Tamanho

No tocante à separação em larga escala, recomenda-se uma abordagem sistemática prévia, envolvendo alguns passos que serão citados a seguir (GUIOCHON, 2002):

- (1) Inicialmente, a melhor combinação entre a fase estacionária e a fase móvel deve ser selecionada, através de experimentos prévios;
- (2) A alimentação do sistema deve ser suficientemente solúvel na fase móvel.
- (3) Avaliar a eficiência da coluna como uma função da velocidade da fase móvel ou difusão no poro, bem como a viscosidade da solução de alimentação.

Admitindo-se que o mecanismo de controle não seja alterado no escalonamento do processo de SEC, é possível a realização de cálculos para tal escalonamento, partindo-se de parâmetros conhecidos, obtidos através da separação alcançada em escala de bancada (WANKAT e KOO, 1988). A relação entre os diâmetros de partícula dos processos em larga escala,  $d_{p_L}$ , e escala de bancada,  $d_{p_b}$ ,  $(d_{p_L}/d_{p_b})$ , é influenciada pela disponibilidade comercial e custo da fase estacionária para um determinado tamanho de partícula, enquanto que a relação entre as velocidades intersticiais em larga escala,  $v_L$ , e bancada,  $v_b$ , representada por  $(v_L/v_b)$ , pode ser restrita pelas considerações de queda de pressão. Assim, o escalonamento reduz-se a descrever as dimensões da coluna e o tempo decorrido para a separação no processo em larga escala. A altura do leito para a coluna, em etapa de escalonamento, é dada pela Equação 2.3 a partir dos dados da coluna utilizada na escala de bancada (LADISCH, 2001).

$$\left(\frac{H_L}{H_b}\right) = \left(\frac{v_L}{v_b}\right) \cdot \left(\frac{d_{p_L}}{d_{p_b}}\right)^2 \quad (2.3)$$

Equação na qual  $H_L$  é altura do leito para a coluna em larga escala,  $H_b$  é a altura do leito referente a coluna de bancada,  $v_L$  é a velocidade intersticial do leito em larga escala,  $v_b$  é a velocidade intersticial do leito em escala de bancada,  $d_{p_L}$  é o diâmetro da partícula para o leito em larga escala e  $d_{p_b}$  é o diâmetro da partícula para o leito em escala de bancada.

O diâmetro da coluna ( $d_{col}$ ) é, então, descrito a partir da exigência na qual a relação entre o volume da amostra,  $(V_{amostra_L}/V_{amostra_b})$ , com a relação entre o volume da coluna,  $(V_{col_L}/V_{col_b})$ , seja o mesmo tanto para escala de bancada quanto em grande escala (GIBBS e LIGHTFOOD, 1986). Deste modo, obtém-se a Equação 2.4.

$$\left(\frac{d_{col_L}}{d_{col_b}}\right) = \left[\left(\frac{H_b}{H_L}\right) \times \left(\frac{V_{amostra_L}}{V_{amostra_b}}\right)\right]^{1/2} \quad (2.4)$$

Equação na qual  $d_{col_L}$  é o diâmetro da coluna em larga escala,  $d_{col_b}$  é o diâmetro da coluna em escala de bancada,  $H_L$  é altura do leito para a coluna em larga escala,  $H_b$  é a altura do leito referente a coluna de bancada,  $V_{amostra_L}$  é o volume da amostra utilizado em larga escala e  $V_{amostra_b}$  é o volume da amostra utilizado em escala de bancada.

A razão do tempo máximo de separação para a cromatografia de exclusão por tamanho é dada a partir do volume de fase móvel que passa através da coluna eluindo todos os compostos ainda contidos na coluna, conforme a Equação 2.5, a qual assume que a velocidade intersticial e a fração de vazios entre as partículas são iguais em ambas as escalas (LADISCH, 2001).

$$\left(\frac{t_L}{t_b}\right)_{seg,max} = \left(\frac{H_L}{H_b}\right) \times \left(\frac{u_b}{u_L}\right) \quad (2.5)$$

Equação na qual  $t_L$  é o tempo máximo para a separação em larga escala,  $t_b$  é o tempo máximo na separação em escala de bancada,  $H_L$  é altura do leito para a coluna em larga

escala,  $H_b$  é a altura do leito referente a coluna de bancada,  $u_L$  é a velocidade superficial do leito em larga escala e  $u_b$  é a velocidade superficial do leito em escala de bancada.

A relação entre a velocidade intersticial,  $v$ , e a velocidade superficial,  $u$ , da fase móvel é dada com base na Equação 2.6, considerando a fração de vazios entre as partículas ou porosidade do leito.

$$v = \frac{Q}{\varepsilon \cdot A_{transversal}} = \frac{u}{\varepsilon} \quad (2.6)$$

Equação na qual  $Q$  é a vazão da fase móvel,  $A_{transversal}$  é a área da seção transversal da coluna,  $\varepsilon$  é a porosidade do leito e  $u$  é a velocidade superficial da fase móvel.

O tempo de separação é enunciado como o tempo que decorre entre a injeção da amostra e a eluição de todos os picos separadamente. O mesmo é dado em função da vazão da fase móvel e da altura do leito, como indicado na Equação 2.5 (LADISCH, 2001).

### 2.3. Sistema de Reciclo Externo Estacionário

A busca por altos índices de rendimento em processos de separação leva a um elevado consumo de eluente e baixo desempenho no processo. A fim de reduzir estes inconvenientes, processos contínuos como a cromatografia de Leito Móvel Simulado (LMS) e outros processos semelhantes foram desenvolvidos. No entanto, os custos para a aquisição de equipamentos caros para uma unidade de LMS podem ainda apresentar mais importância frente ao aumento da performance do processo, especialmente quando se trata de pequenas quantidades procurando-se evitar a desvantagem econômica. Processos semelhantes e menos caro que o LMS podem contribuir para o aumento do desempenho do processo de separação. Dois deles são: a Cromatografia em Reciclo com Circuito Fechado (CRCF) e o REE (SCHLINGE et al., 2010). Aplicando o mesmo processo instituído em

CRCF, o conceito do REE evita a diminuição da concentração de ciclo para ciclo, injetando-se uma nova alimentação para o reciclo (KENNEDY et al., 2004). Dessa forma, altas taxas de produção, purezas e rendimentos são possíveis (SCHLINGE et al., 2010).

O sistema de reciclo externo estacionário (REE) foi introduzido por GRILL e MILLER em 1998, tendo sido desenvolvido como um sistema cromatográfico em estado permanente para um sistema binário (GRILL e MILLER, 1998). Neste trabalho, o processo REE foi operado em circuito fechado com injeção periódica intra-perfil. Semelhante ao leite móvel simulado (LMS), no REE a amostra é injetada juntamente com a zona de mistura do perfil cromatográfico em questão, sendo coletadas frações no início e no final deste perfil. A diferença entre estas duas técnicas é que o LMS é um sistema verdadeiramente contínuo e o REE é um processo semicontínuo, que recicla a fração não separada de volta para a coluna, enquanto são inseridas novas amostras junto desta fração reciclada. Na verdade o processo REE em circuito fechado apresenta-se como 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 uma nova quantidade de amostra no ponto apropriado do perfil cromatográfico de eluição). No entanto, neste trabalho empregando o processo REE em circuito fechado apenas uma coluna foi utilizada, o que limita a possibilidade de aumento de escala (NÓBREGA, 2004). A fase móvel e as amostras são recicladas, como medida de conservação, bem como um procedimento de separação (CRAWFORD et al., 2008).

Posteriormente, GRILL (1999) trabalhou com o sistema REE em duas colunas que apresenta as mesmas características que os sistemas com uma coluna, no entanto, ao invés de um “loop”, onde se armazena a fração a ser recirculada no sistema empregando-se uma coluna apenas, no sistema com duas colunas esta fração é lançada imediatamente para a próxima coluna dando sequência a uma nova separação e, conseqüentemente, um novo ciclo (NÓBREGA, 2004).

O reciclo de produtos com baixo fator de separação em cromatografia de gradiente de solvente é feito rotineiramente na indústria. Compreensivelmente, esta atividade é

realizada quando o produto em questão é mais valioso do que o custo do passo da re-cromatografia. Intrinsecamente, tal melhoria na recuperação do produto, ou rendimento, vem como uma troca com o processo de produtividade. Por outro lado, um estudo recente mostrou que utilizando um esquema de REE é possível melhorar, consideravelmente, tanto o rendimento quanto a produtividade de um processo de reciclo em comparação com o desempenho de um sistema em batelada. Reciclo em cromatografia, no entanto, pode ser visto como um processo em que uma zona de mistura contendo o produto ainda impuro é, continuamente, lançada para a coluna cromatográfica, juntando-se a uma nova quantidade de amostra alimentada. Isso geralmente conduz a um estado estacionário, sendo denominado como REE (TARAFDER et al., 2008).

Os custos de instalação de um processo com REE em circuito fechado não se apresentam tão elevados quanto ao observado na instalação de um sistema de cromatografia preparativa em batelada. No entanto, eles estão abaixo dos custos para a instalação de um sistema cromatográfico contínuo, tipo LMS, de capacidade de produção comparável (NÓBREGA, 2004).

### **2.3.1. Princípios da Cromatografia com Reciclo Externo Estacionário**

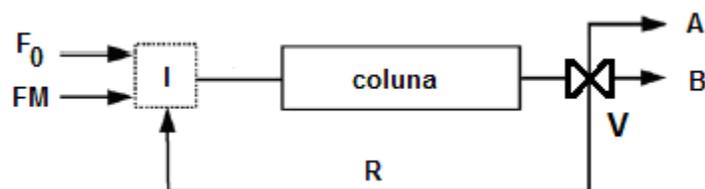
O princípio da cromatografia com REE e diferentes opções tecnológicas para sua realização têm sido descritos em diversos trabalhos (GRILL e MILLER, 1998; ALSOMALI et al., 2004; YAN e ORIHUELA, 2007; CRAWFORD et al., 2008; dentre outros). Alguns aspectos fundamentais serão descritos neste tópico.

Diferentes modos de operação foram propostos para o sistema REE, são eles: reciclo misto, circuito fechado, reciclo segmentado e combinação de reciclo. Operando em modo "reciclo misto", toda a fração de reciclo é recolhida e misturada com a alimentação antes da re-injeção. Outro modo operacional é o "circuito fechado", que visa preservar a separação parcial, já alcançada, ligando a saída da coluna à entrada da mesma; alimentando novamente em uma determinada posição da válvula durante esta etapa, alternando um ciclo

de injeção em fluxo de reciclo, neste modo utiliza-se apenas uma coluna. Foram ainda propostos outros modos, como: "Reciclo segmentado", em que a zona contendo a fração de mistura a ser reciclada é inserida na coluna seguinte antes de uma nova alimentação; e "combinação de reciclo", a qual ocorre a re-injeção da cauda dispersa do último componente eluído da coluna, seguido pela fração a ser reciclada e, finalmente, a alimentação (SAINIO e KASPEREIT, 2009).

Compreendendo o funcionamento do sistema REE, o ciclo tem início com a primeira alimentação ( $F_0$ ) na coluna previamente condicionada com a fase móvel. Neste ciclo inicial não há fração de reciclo, pois não decorre diretamente de outra coluna. Depois de toda a substância deixar o circuito de injeção, o *loop* é isolado, provisoriamente do sistema, através de uma válvula, para que possa ser recarregado para o próximo ciclo. A saída do detector de UV é direcionada para o coletor de frações para a coleta da fração A, contendo o componente de maior volume. Após a coleta da primeira fração de interesse – fração A – é iniciado o reciclo, lançando a zona contendo a mistura para a próxima coluna, ou seja, a saída do detector de UV é conectada à entrada da coluna seguinte, sendo acompanhada de uma nova alimentação para o ciclo seguinte. Na verdade a nova injeção de amostra é feita exatamente no meio do intervalo correspondente a zona de reciclo, dividindo-a em duas zonas: zona de reciclo 1, que precede a nova injeção de amostra para o ciclo seguinte, e zona de reciclo 2, que sucede a nova injeção. A fração B - contendo um excesso do segundo componente - é coletada em seguida, finalizando o ciclo. O tempo para re-injeção dentro da zona de reciclo depende do fluxo de massa da entrada e de saída da coluna, ou seja, varia com a pureza conseguida para as frações A e B ao final dos ciclos, oscilando volumes nas zonas de reciclos 1 e 2 (SCHLINGE et al., 2010; SAINIO e KASPEREIT, 2009).

SAINIO e KASPEREIT (2009) utilizaram o esquema ilustrado na Figura 2.6 para analisar o processo de REE com base na teoria do equilíbrio. Dependendo do modo de operação, uma ou mais bombas e válvulas de múltiplas vias (V) são requeridas para realizar a alternância de fluxos da alimentação periódica ( $F_0$ ), fase móvel (FM), e reciclo (R), bem como a coleta do produto nas frações A e B.



**Figura 2.6:** Representação esquemática de um sistema REE utilizando apenas uma coluna.  $F_0$  – alimentação; FM – fase móvel; V – válvula de mudança de direção de fluxo; I - injetor; R – reciclo, A – primeira fração a ser eluída da coluna, B – última fração a eluir da coluna (adaptado de SAINIO e KASPEREIT, 2009).

Entendendo a Figura 2.6, tem-se o um sistema contendo apenas uma coluna, funcionando em modo circuito fechado. O início do ciclo é dado pela injeção da amostra através da válvula de injeção (I), representada na Figura 2.6, que é lançada para a coluna através do bombeamento da fase móvel. A primeira fração a eluir da coluna é a Fração A, que representa a molécula de maior tamanho. Após a coleta da Fração A, o fluxo é direcionado para o injetor (I) através do acionamento da válvula de mudança de fluxo (V), dando início a etapa de reciclo (R), que será lançado novamente para a coluna acompanhado de uma nova injeção. Em seguida, a válvula de mudança de fluxo (V) é direcionada para a coleta da Fração B (SAINIO e KASPEREIT, 2009).

Algumas informações importantes foram relatadas por SAINIO e KASPEREIT (2009) e enumeradas a seguir, sobre o desempenho e funcionamento do processo REE operando no modo “reciclo misto”, utilizando um sistema semelhante ao da Figura 2.6, que serviram como base para o trabalho de SIITONEN et al. (2011):

(1) O tempo de ciclo aumenta com o aumento do tempo de injeção.

(2) A produtividade em REE diminui com o aumento do tempo de injeção e mostra-se menor que um processo em batelada, que é otimizada de modo que nenhuma diferença exista entre sucessivos ciclos cromatográficos.

(3) Em termos de consumo de fase móvel, o processo REE supera o processo em batelada.

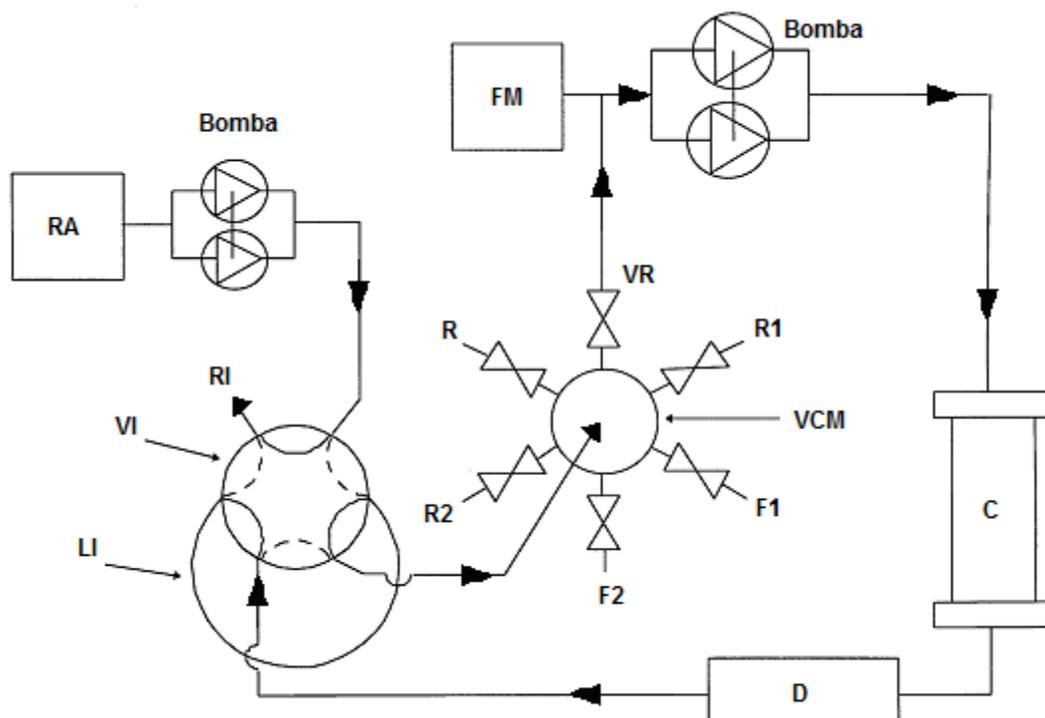
(4) Com relação à concentração do produto na fração A, um processo de REE mostra-se capaz de superar um processo otimizado em batelada.

(5) A concentração do produto contido na fração B, operando no modo “reciclo misto”, apresenta-se constante como no processo em batelada. Isso pode ser explicado pela influência da diluição sofrida pela fração B, por ser a última a ser eluída.

### 2.3.2. Aplicações do Sistema de Reciclo Externo Estacionário

Mecanismos subjacentes do REE em circuito fechado (CRCF) foram estudados por GRILL e MILLER (1998), realizando a separação de um intermediário racêmico farmacêutico, sendo constatado que a criação de um perfil cromatográfico em estado estacionário é necessário para obtenção de frações de alta pureza (NÓBREGA, 2004). BAILLY e TONDEUR (1982) reportaram uma técnica de reciclo que envolve misturas de amostras não separadas, zonas de coeluição, com novas amostras; re-injetando-as novamente para a coluna, operando no modo “reciclo misto”. No entanto, esta última abordagem não preserva o perfil das amostras não separadas, tal como apresentado no método de GRILL e MILLER (1998) operando no modo “circuito fechado”. O esquema utilizado por GRILL e MILLER, em 1998, está ilustrado na Figura 2.7.

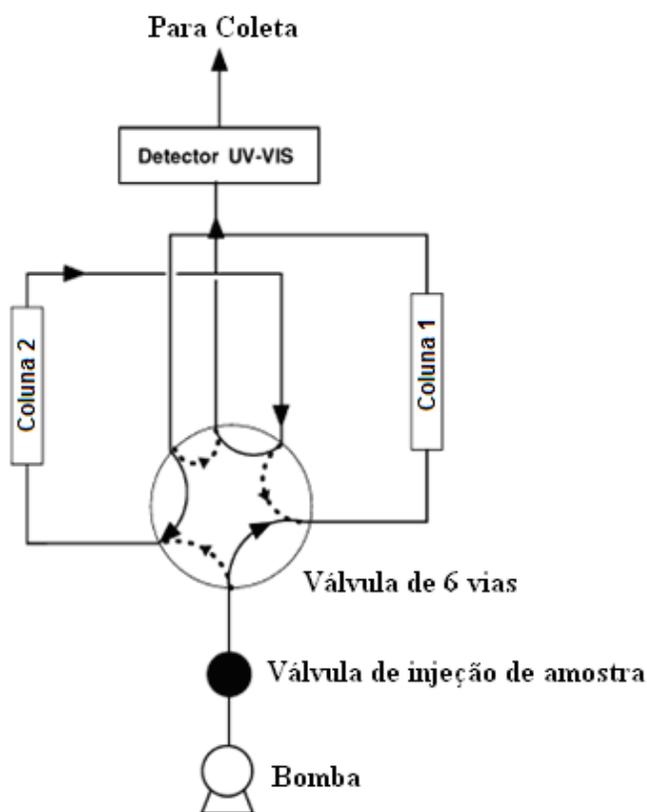
Entendendo o funcionamento do aparato experimental ilustrado na Figura 2.7, tem-se o início do ciclo com a injeção da amostra, inicialmente armazenada no *loop* de injeção – LI, através da válvula VI que é direcionado para a coluna por meio da válvula VCM. Verifica-se que, após passar pelo detector, a amostra é novamente encaminhada para a válvula VCM, reiniciando o percurso em direção a coluna. A cada ciclo, uma nova quantidade de amostra, armazenada no reservatório RA, é encaminhada para o loop de injeção – LI e posteriormente lançada para a coluna através da válvula VCM, com o propósito de enriquecer as frações de interesse.



**Figura 2.7:** Esquema do sistema REE operado no modo “circuito fechado” utilizado por GRILL e MILLER em 1998 para a separação de uma mistura racêmica. FM, fase móvel; C, coluna; D, detector; VCM e VI, válvulas de coleta múltipla e de injeção; R1, R2, RI e R, válvulas de resíduos; VR, válvula de reciclo; F1 e F2, coleta das frações 1 e 2; LI, loop de injeção; RA, reservatório de amostra (adaptado de GRILL e MILLER, 1998).

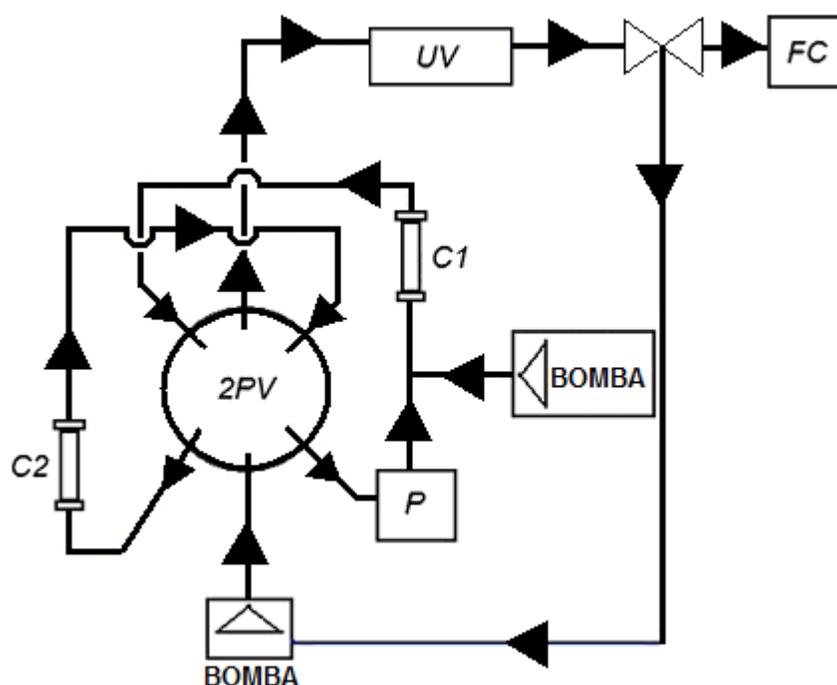
QUIÑONES et al. (2000) propuseram a modelagem matemática do sistema utilizado por GRILL e MILLER, em 1998, representado pela Figura 2.7 e concluíram que os cromatogramas obtidos através da modelagem permanecem inalterados, durante a operação do REE com circuito fechado de reciclo, mostrando-se semelhantes ao obtido experimentalmente por GRILL e MILLER (1998). O modelo proposto por QUIÑONES et al. (2000) prediz que as concentrações no detector e na composição das frações coletadas sofrem influência da dispersão extra-coluna, sendo devidamente contabilizada, o que reflete na comparação dos perfis obtidos.

AL-SOMALI et al. (2004) utilizaram SEC com uma coluna apenas, operando em circuito fechado de reciclo, para a separação de nanopartículas de ouro sintetizadas e, ainda, propuseram uma alternativa de reciclo em SEC, em virtude de algumas limitações sofridas com o sistema utilizado, como por exemplo: visualização de picos cromatográficos distorcidos, diluição das frações coletadas e alargamento das bandas cromatográficas. Em decorrência dessas limitações, AL-SOMALI et al. (2004) concluíram que a obtenção de sucesso em um sistema de reciclo operando no modo “circuito fechado” depende, aparentemente, do modo de separação (por exemplo, entálpico *versus* exclusão por tamanho) e do projeto específico da bomba. O reciclo alternativo proposto, ilustrado na Figura 2.8, compreende duas colunas, com um fluxo contínuo de fase móvel durante a separação, não reciclando o solvente. Em contraste com o aparato utilizando apenas uma coluna, a alternativa proposta aumentou o comprimento efetivo da coluna do sistema, melhorando assim a resolução da separação das nanopartículas.



**Figura 2.8:** Representação esquemática do sistema de reciclo alternativo em SEC proposto por AL-SOMALI et al., 2004 (adaptado de AL-SOMALI et al., 2004).

Em 2004, GRILL e colaboradores compararam resultados obtidos em REE e LMS em escala laboratorial, concluindo que as duas técnicas apresentam taxas de produção comparáveis (GRILL et al., 2004). Em 2007, YAN e ORIHUELA separaram compostos quirais utilizando REE em cromatografia com fluido supercrítico. Eles concluíram que o REE é um processo confiável, especialmente relacionado à separação de picos em co-eluição, permitindo uma purificação em larga escala (YAN e ORIHUELA, 2007). CRAWFORD et al. (2008) otimizaram o sistema REE para separação de compostos quirais, fazendo uso do aparato experimental, cujo esquema está representado pela Figura 2.9.



**Figura 2.9:** Representação esquemática do sistema REE utilizado por CRAWFORD et al., 2008. FC, coletor de frações; UV, detector de UV; C1 e C2, colunas; 2PV, válvula com duas posições; P, detector de polarímetro (adaptado de CRAWFORD et al., 2008).

Entendendo a Figura 2.9, o ciclo tem-se início com a partida das duas bombas, uma inserindo amostra e outra, a fase móvel, direcionando-a para a coluna 1 – C1 e posteriormente para o detector de UV, o qual registra o momento da eluição da 1ª fração

que é direcionada para o coletor de frações – FC. Após a coleta da 1ª fração o fluxo, contendo a zona de mistura, é direcionado para a coluna 2 – C2 através da válvula de direcionamento de fluxo – 2PV. Em seguida, a válvula 2PV direciona o fluxo da bomba de fase móvel para a coluna 1 – C1 permitindo a eluição da 2ª fração que será detectada pelo detector de UV e, então direcionada para o coletor de frações – FC. A zona de mistura contida na coluna 2 – C2 é direcionada para a coleta, 1ª e 2ª frações, após a eluição da 2ª fração da coluna 1 – C1.

De um modo geral, tanto o REE como o CRCF apresentam vantagens para separações de misturas binárias com menores fatores de separação. O sistema empregado pode ser escalonado para aumentar o fator de carga. No entanto, isso pode acarretar um aumento no tempo de ciclo, o que vem a ser suprido com os benefícios ganhos (SCHLINGE et al., 2010). A unidade de REE permite que o perfil da porção não coletada seja re-injetado para a coluna preservando sua separação parcial já obtida (CRAWFORD et al., 2008). Mais recentemente, SIITONEN et al. (2011) analisaram a teoria do sistema de reciclo externo estacionário utilizando remoção do solvente, tomando como base o trabalho realizado por SAINIO e KASPEREIT (2009).

#### **2.4. Cromatografia por Troca Iônica**

A cromatografia por troca iônica é um método de separação cujo mecanismo é baseado na interação entre a fase estacionária altamente carregada e os solutos dispersos na fase móvel com cargas de sinais contrários, os quais são seletivamente adsorvidos através da troca de íons. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos, por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária (COLLINS et al., 2006). Os processos de troca iônica estão baseados em equilíbrios de troca entre íons em solução e íons de mesmo sinal na

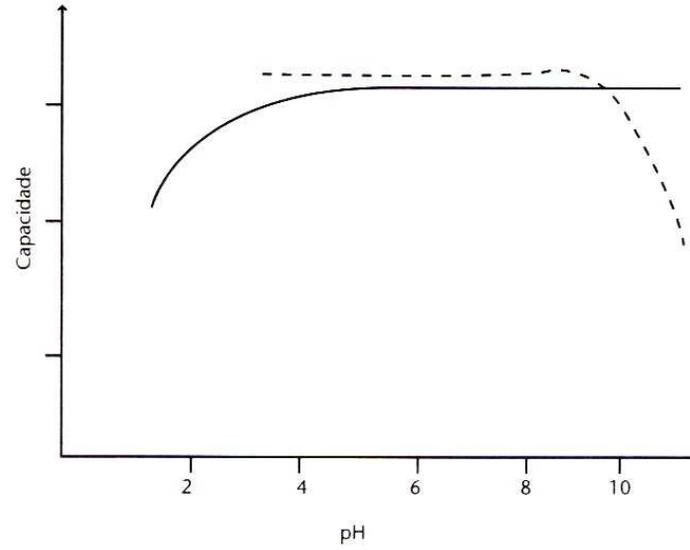
superfície de um sólido essencialmente insolúvel, denominado matriz, que vem a compor a resina de fase estacionária.

A matriz de um trocador é constituída de um material poroso, natural ou sintético, inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos, apresentando ligações covalentes a grupos trocadores iônicos. As matrizes, quanto ao material que as formam, são classificadas em inorgânicas e orgânicas, sendo naturais ou sintéticas. As resinas orgânicas polimerizadas, por serem em geral mais eficientes, são as mais utilizadas como matriz (COLLINS et al., 2006).

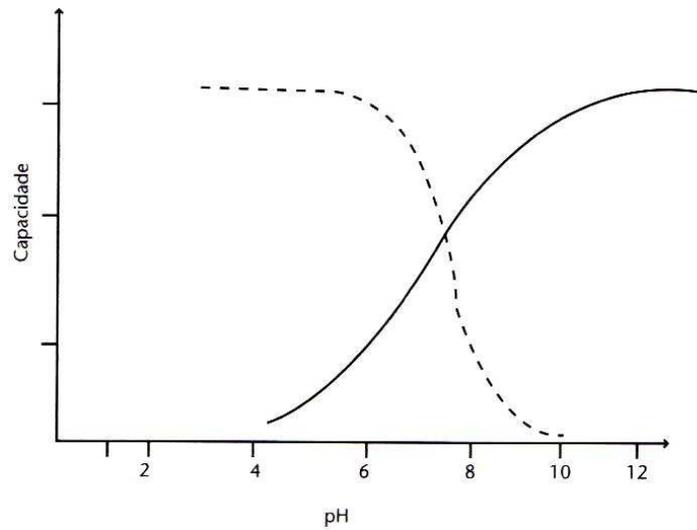
#### **2.4.1. Os Grupos Trocadores**

Dependendo do grupo trocador ligado covalentemente à matriz, os trocadores iônicos são classificados em aniônicos e catiônicos. Esses trocadores iônicos são sempre acompanhados por contra-íons, de carga oposta ao grupo ligado ao suporte e de fácil substituição no processo de troca iônica. Os trocadores aniônicos, como o próprio nome indica, trocam ânions e apresentam, portanto, grupos iônicos positivos ligados à matriz. Os trocadores catiônicos, inversamente aos aniônicos, trocam cátions e apresentam grupos iônicos negativos ligados à matriz (COLLINS et al., 2006).

Os tipos de grupos ligados à matriz classificam os trocadores iônicos em fortes, médios e fracos. Os trocadores iônicos fortes são aqueles completamente ionizados em grande faixa de pH, conforme pode ser observado na Figura 2.10 para trocadores ácido e básico fortes. Os trocadores iônicos fracos e médios são aqueles em que o grau de dissociação é influenciado pelo pH, e, devido a esse fato, a capacidade desses trocadores varia em função do pH, como ilustra a Figura 2.11 para trocadores ácido e básico fracos. A Tabela 2.7 apresenta alguns tipos de trocadores iônicos comerciais e algumas características químicas, tais como, tipo de matriz, grupo funcional e sua classificação quanto à força do grupo trocador (forte/fraco) (COLLINS et al., 2006).



**Figura 2.10:** Capacidades típicas de trocadores fortes: ácido (—) e básico (---) (adaptado de COLLINS et al., 2006).



**Figura 2.11:** Capacidades típicas e trocadores fracos: ácido (—) e básico (---) (adaptado de COLLINS et al., 2006).

**Tabela 2.7:** Exemplos de alguns trocadores iônicos comerciais, baseados em resinas poliméricas naturais modificadas, e suas características químicas: tipo de matriz, grupo funcional e força do grupo trocador (forte/fraco) (adaptado de COLLINS et al., 2006).

Nome Comercial	Matriz	Grupo Funcional	Tipo
SP-Sepharose	Agarose	Propilsulfônico	Ácido Forte
SP-Sephadex	Dextrana	(-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	
CM-Sepharose	Agarose	Metilcarboxílico	Ácido Fraco
CM-Cellulose	Celulose	(-CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup> )	
Cellex-QAE	Celulose	Dietil (2-hidroxipropil) aminoetílico	Base Forte
QAE-Sephadex	Dextrana	(-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -N <sup>+</sup> -(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CHOHCH <sub>3</sub> )	
Q-Sepharose	Agarose	Quaternário de Amônio	Base Forte
		(-CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> -(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	
DEAE-Cellulose	Celulose	Dietilaminoetílico	Base Fraca
DEAE-Sephadex	Dextrana	(-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -N <sup>+</sup> H-(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> )	

### 2.4.2. Aplicações à Purificação do Ácido Hialurônico

Um escasso número de trabalhos é reportado na literatura com o emprego da cromatografia por troca iônica para a purificação do AH. Em contraposição, diversos trabalhos são encontrados na literatura utilizando a cromatografia por troca iônica para a purificação de diferentes proteínas e outros compostos.

Em 1985, NEBINGER comparou diferentes tipos de resinas empregadas em cromatografia de troca iônica para a separação de oligossacarídeos de hialuronato de sódio, encontrando melhores resultados para as resinas Dowex e DEAE Sephacel. Em 1997,

STEKOLNIKOV e KORNILOVA propuseram uma patente com o intuito de purificar o AH empregando resina de troca iônica, obtendo AH purificado com teor protéico inferior a 0,05% e massa molar da ordem de grandeza de  $10^6$  Da. LAGO et al. (2005) utilizaram cromatografia de troca aniônica como um método para a caracterização do AH isolado de cordão umbilical.

# Capítulo 3

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Ácido Hialurônico

O Ácido Hialurônico utilizado em todos os experimentos deste trabalho foi produzido por fermentação, em meio de cultura sintético, utilizando bactérias do tipo *Streptococcus zooepidemicus*, pelo Laboratório de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. Como padrão, para a obtenção da curva analítica no método de quantificação do AH, utilizou-se o sal sódico de

Ácido Hialurônico (Hyalumed<sup>®</sup>). Para a construção da curva de massa molar utilizaram-se padrões de Ácido Hialurônico (Hyalose<sup>®</sup>) com massa molar variando na faixa de 50 kDa até 1000 kDa.

### **3.1.2. Colunas Cromatográficas**

Para os ensaios em escala analítica utilizou-se a coluna cromatográfica analítica comercial Phenomenex PolySep-SEC 6000 (300 x 7,8 mm d.i.) e uma pré-coluna Phenomenex PolySep GPC (7,5 x 50 mm d.i.). Os ensaios em escala preparativa, modo batelada e reciclo externo estacionário, foram realizados com colunas preparativas encamisadas, confeccionadas em vidro, adquiridas da GE Healthcare, sendo comercialmente conhecidas como: XK 16/20 (20 x 1,6 cm d.i.); XK 16/40 (40 x 1,6 cm d.i.) e XK 50/30 (30 x 5,0 cm d.i.). Utilizou-se ainda, no modo batelada, outra coluna também confeccionada em vidro (150 x 15 mm d.i.), comercializada pela GE Healthcare.

### **3.1.3. Fases Estacionárias**

As fases estacionárias utilizadas como “recheio” para as colunas preparativas são géis de exclusão por tamanho. Estes géis têm sua matriz constituída por dextrana reticulada com poliacrilamida (comercialmente conhecidos como: Sephacryl S-300 HR e Sephacryl S-500 HR), ambos adquiridos da GE Healthcare. Outro “recheio” também utilizado, no modo batelada, são as resinas de troca iônica, sendo uma resina fortemente aniônica, cuja matriz é constituída pela reticulação de um derivado de agarose contendo quaternário de amônio como grupo funcional, comercialmente conhecida como Q-Sepharose Fast-Flow; e a outra resina fortemente catiônica, contendo sulfopropil como grupo funcional, comercialmente conhecida como: SP-Sepharose Fast-Flow.

#### 3.1.4. Traçador

Na caracterização das colunas cromatográficas preparativas foram utilizados dois compostos inertes, denominados como traçadores, sendo um de baixa massa molar possibilitando a penetração nos espaços vazios da partícula, no caso acetona 0,1% (v/v) com massa molar de 58,08 Da; e outro de maior massa molar de modo a permitir a penetração nos espaços vazios do leito e não penetrar dos poros da partícula, no caso dextrana-azul 0,2% (v/v) com massa molar de  $2,0 \times 10^6$  Da.

#### 3.1.5. Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos desenvolvidos neste trabalho foram: Nitrato de Sódio (Merck), cuja solução aquosa era empregada como fase móvel nas corridas cromatográficas; Álcool Etilico - grau HPLC (Mallinckrodt) para precipitação do AH no meio fermentado; Cloreto de Sódio (J.T.Baker) para ressuspensão do AH e eluente para as resinas de troca iônica; Brometo de Cetil Trimetil Amônio – CTAB (Vetec), Ácido Sulfúrico (J.T.Baker) e Carbazole (Sigma-Aldrich) para análise de quantificação do AH através dos métodos Turbidimétrico e Carbazol que serão descritos ao longo deste capítulo; Ácido Fosfórico (Vetec) e o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Vetec) para análise de quantificação do teor protéico por meio do método de Bradford que também será detalhado neste capítulo.

Para obtenção da curva analítica a ser utilizada na quantificação do teor protéico, utilizou-se como padrão de referência a proteína Albumina de Soro Bovino (BSA – *Bovine Serum Albumin*) (Vetec).

### 3.1.6. Equipamentos

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento do presente trabalho foram: Centrífuga (Hitachi CF 15D), Balança Analítica (Mettler AJ150), Espectrofotômetro Hitachi U 2001, Bomba Peristáltica Masterflex, duas bombas cromatográficas líquidas de baixa e média pressão, que foram acopladas ao sistema de reciclo externo estacionário; e Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência composto por duas bombas de alta pressão e dois detectores: índice de refração e UV-Vis comercializados pela Shimadzu.

## 3.2. Métodos

Os métodos experimentais empregados no desenvolvimento do presente trabalho estão detalhados e enumerados em tópicos, os quais serão apresentados a seguir:

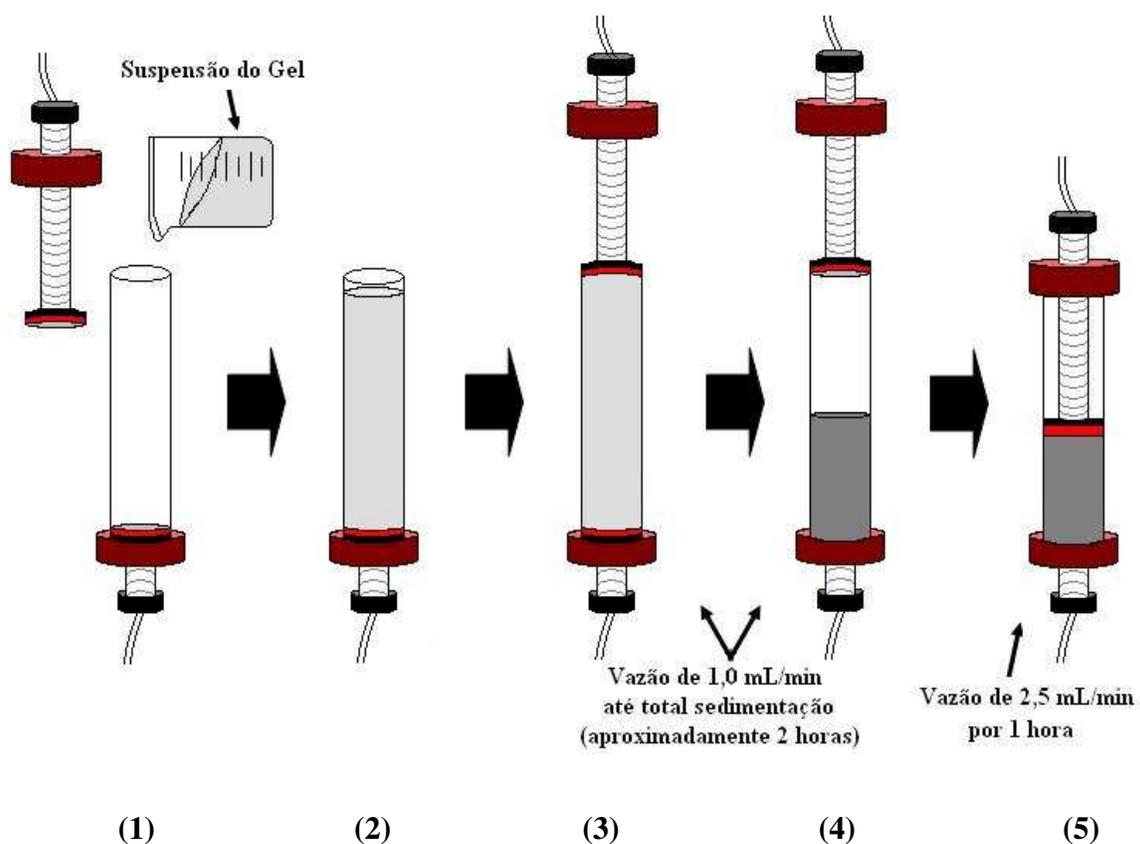
### 3.2.1. Empacotamento do Leito Cromatográfico

Os géis de exclusão por tamanho, em estudo, foram acomodados em colunas preparativas confeccionadas em vidro. O procedimento utilizado para o empacotamento das colunas é descrito e enumerado a seguir:

- (1) A extremidade inferior da coluna foi fechada e a superior foi mantida aberta;
- (2) Através da extremidade superior aberta, lançou-se uma suspensão do respectivo gel a ser utilizado em etanol 20 %, de uma única vez, para dentro da coluna;
- (3) Em seguida, o pistão foi colocado na parte superior, de forma a não comprimir a suspensão, e conectado a uma bomba peristáltica de média pressão e a vazão foi estabelecida em 1,0 mL/min;
- (4) Manteve-se a vazão em 1,0 mL/min até total assentamento da suspensão (aproximadamente 2 horas);

(5) Após o assentamento da suspensão, o pistão foi acomodado na superfície do leito sedimentado, aumentando-se a vazão para 2,5 mL/min, em fluxo descendente, durante 1 hora.

O mesmo procedimento foi obedecido para todas as colunas utilizadas neste trabalho, bem como para as fases estacionárias em estudo, géis de exclusão por tamanho e resinas de troca iônica. A Figura 3.1 ilustra a seqüência dos passos realizados nesta etapa.



**Figura 3.1:** Seqüência dos passos realizados na etapa experimental de empacotamento (adaptado de NÓBREGA, 2004).

Após o empacotamento, a coluna foi lavada com água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore) na vazão de 1,0 mL/min por 2 horas em fluxo ascendente, contrário ao do empacotamento, para total eliminação do etanol remanescente, bem como a presença de

possíveis bolhas. Em seguida, a coluna foi condicionada com a respectiva fase móvel a ser utilizada durante o processo de separação na mesma vazão a ser trabalhada por, no mínimo, 1 hora. E, só então, foram realizados os experimentos, todos utilizando fluxo ascendente.

### **3.2.2. Determinação dos Parâmetros Hidrodinâmicos do Leito Cromatográfico**

#### **3.2.2.1. Determinação das Porosidades do Leito e da Partícula**

A porosidade das partículas de gel, bem como de um leito formado por estas partículas, foi determinada através do método de análise dos momentos, também conhecido como técnica de pulsos cromatográficos. Este método baseia-se na monitoração de um fluido traçador que percola o leito de partículas, através de um detector de UV na saída da coluna. Os tempos de residência dos traçadores no leito fixo fornecem informações sobre as porosidades do leito e da partícula. A dispersão das bandas cromatográficas dos traçadores juntamente com o tempo de retenção fornecem informações importantes sobre a dispersão axial e a difusão nos poros.

Através de procedimentos estatísticos, a função de distribuição do tempo de residência do leito é caracterizada em termos do tempo médio de retenção ( $t_R$ ) e da dispersão do tempo médio ou variância ( $\sigma^2$ ). Os momentos são, então, definidos da seguinte forma: O momento de primeira ordem ( $\mu_1$ ) é representado pela Equação 3.1 e calculado a partir da diferença entre os primeiros momentos do sistema com a coluna e sem coluna. Logo, o primeiro momento para o leito é dado pela equação 3.2. O segundo momento ( $\mu_2$ ) no caso a variância, é expressa em relação ao tempo de retenção médio, conforme a Equação 3.3 (ARNOLD et al., 1985; RUTHVEN, 1984).

$$\mu_1 = t_R = \frac{\int_0^{\infty} tC(t)dt}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (3.1)$$

Equação na qual C(t) é o sinal do detector.

$$\mu_1 = \mu_{(c/columa)} - \mu_{(s/columa)} - \frac{t_0}{2} = \frac{L}{u} [\varepsilon + (1-\varepsilon) \cdot \varepsilon_p] = \frac{L}{u} (\varepsilon) \quad (3.2)$$

equação na qual  $t_0$  é o tempo de injeção do traçador,  $L$  é o comprimento da coluna,  $u$  é a velocidade superficial da fase móvel,  $\varepsilon_p$  é a porosidade da partícula e  $\varepsilon$  é a porosidade do leito de gel.

$$\mu_2 = \sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} (t - t_R)^2 c(t)dt}{\int_0^{\infty} c(t)dt} \quad (3.3)$$

A porosidade do leito de gel,  $\varepsilon$ , foi determinada através dos dados experimentais obtidos com o traçador de alta massa molar ( $2,0 \times 10^6$  Da), no caso dextrana-azul 0,2% (v/v), que por apresentar um volume hidrodinâmico elevado não penetra nos poros das partículas do leito, logo assume-se  $\varepsilon_p=0$ . Os dados conseguidos com o traçador de menor massa molar (58,08 Da), no caso acetona 0,1% (v/v), servem para a obtenção da porosidade total do leito cromatográfico,  $\varepsilon_T$ , num gráfico de  $\mu_1$  versus  $L/u$ , devido ao seu volume hidrodinâmico muito pequeno possibilitando a penetração em todos os poros. As condições experimentais empregadas para ambos os traçadores foram: detector de UV com comprimento de onda em 280 nm e  $\text{NaNO}_3$  0,1 M como fase móvel, mantendo-se pH 7,0. Para o cálculo da porosidade da partícula utilizou-se a Equação 3.4 (RUTHVEN, 1984).

$$\varepsilon_T = [\varepsilon + (1-\varepsilon)\varepsilon_p] \quad (3.4)$$

---

Equação na qual  $\varepsilon$  é a porosidade do leito e  $\varepsilon_p$  é a porosidade da partícula.

### 3.2.2.2. Determinação do Número de Pratos Teóricos

A eficiência de uma coluna cromatográfica é avaliada em termos do número de pratos teóricos (N) ou da altura equivalente a um prato teórico (HETP), a partir da obtenção dos tempos de retenção e da largura da base ou da largura da banda cromatográfica a meia altura (RUTHVEN, 1984). Sendo um “prato teórico” correspondente a um estágio de equilíbrio alcançado pelo soluto entre a fase móvel e a fase estacionária. Quanto maior for N, maior o número de estágios de equilíbrio, maior a eficiência da coluna avaliada e, conseqüentemente, melhor a separação (SNYDER e KIRKLAND, 1979; COLLINS et al., 2006). No entanto, efeitos de dispersão axial contribuem para redução de tal eficiência (WANG e CHING, 2002). No presente trabalho, o número de pratos teóricos das colunas envolvidas no sistema REE foi calculado, segundo a Equação 3.5 (VAN DEEMTER et al., 1956), com base em um valor médio dos dados obtidos com o traçador acetona 0,1% (v/v) em diferentes vazões (0,5 a 3,0 mL/min), tendo em vista que para cada vazão um novo valor de N foi calculado.

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (3.5)$$

Equação na qual  $t_R$  é o tempo de retenção do traçador e  $w_{1/2}$  é a largura a meia altura do pico cromatográfico referente ao traçador.

O HETP para cada coluna pertencente ao sistema REE, ambas com altura de leito de 13 cm, foi calculado a partir da Equação 3.6 (RUTHVEN, 1984), em que é definido pela razão entre a altura do leito, L, e o número de pratos teóricos, N (COLLINS et al., 2006). Logo, para cada vazão trabalhada foi possível calcular o HETP correspondente a esta vazão.

$$HETP = \frac{\sigma^2}{\mu_1^2} L = \frac{L}{N} \quad (3.6)$$

Equação na qual L é o comprimento do leito e N é o número de pratos teóricos.

### 3.2.2.3. Determinação do Coeficiente de Dispersão Axial

A dispersão axial resulta das contribuições da difusão molecular e da difusão turbilhonar ou efeito dos multi-caminhos. Em uma primeira aproximação, estes efeitos são aditivos e o coeficiente de dispersão axial é dado pela Equação 3.7 (MIYABE E GUIOCHON, 2000), em que  $D_m$  é a difusão molecular,  $\gamma_1$  e  $\gamma_2$  são parâmetros numéricos e  $d_p$  é o diâmetro da partícula.

$$D_{ax} = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \quad (3.7)$$

A relação entre a altura equivalente a um prato teórico, HETP, e a velocidade superficial da fase móvel,  $u$ , em separações cromatográficas, é dada pela Equação 3.8, denominada equação de van Deemter (ARNOLD et al., 1985; GUIOCHON, 2002), em que os termos A e B representam, respectivamente, os efeitos de dispersão axial e difusão molecular na direção axial sendo representados pelas Equações 3.9 e 3.10; o termo C refere-se à resistência à transferência de massa e é representado pela Equação 3.11. Estes três parâmetros, A, B e C, são os principais contribuintes para o alargamento de uma banda ou pico cromatográfico (VAN DEEMTER, 1956).

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (3.8)$$

$$A = 2\gamma_2 d_p \quad (3.9)$$

$$B = 2\gamma_1 D_m \quad (3.10)$$

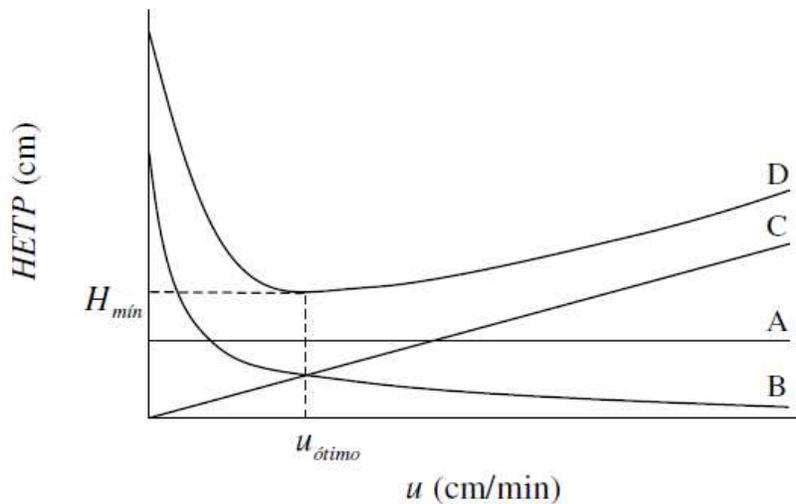
$$C = 2 \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \left[ 1 + \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (3.11)$$

Na Equação 3.11,  $k_m$  é o coeficiente de transferência de massa,  $\varepsilon$  é a porosidade do leito e  $K$  é dado anteriormente pela Equação 3.12.

$$K = [\varepsilon_p + (1-\varepsilon_p)H] \quad (3.12)$$

Equação na qual  $\varepsilon_p$  é a porosidade da partícula e  $H$  é a constante de Henry.

A Figura 3.2 ilustra o perfil da altura equivalente a um prato teórico em função da velocidade superficial da fase móvel, conforme a equação de van Deemter representada pela Equação 3.8. A curva A é constante e independente da velocidade superficial, a curva B é inversamente proporcional e a curva C é uma função linear. A curva D representa o perfil resultante da altura equivalente a um prato em função da velocidade superficial da fase móvel e exibe um valor mínimo ( $HETP_{mín}$ ) em uma velocidade superficial ótima ( $u_{ótimo}$ ) (KRIJGSMAN, 1992). Em velocidades inferiores e superiores a  $u_{ótimo}$ , HETP é dependente da difusão (termo B) e da transferência de massa (termo C) (VAN DEEMTER et al., 1956).



**Figura 3.2:** Variação da altura equivalente a um prato teórico em função da velocidade superficial da fase móvel conforme a equação de van Deemter (KRIJGSMAN, 1992).

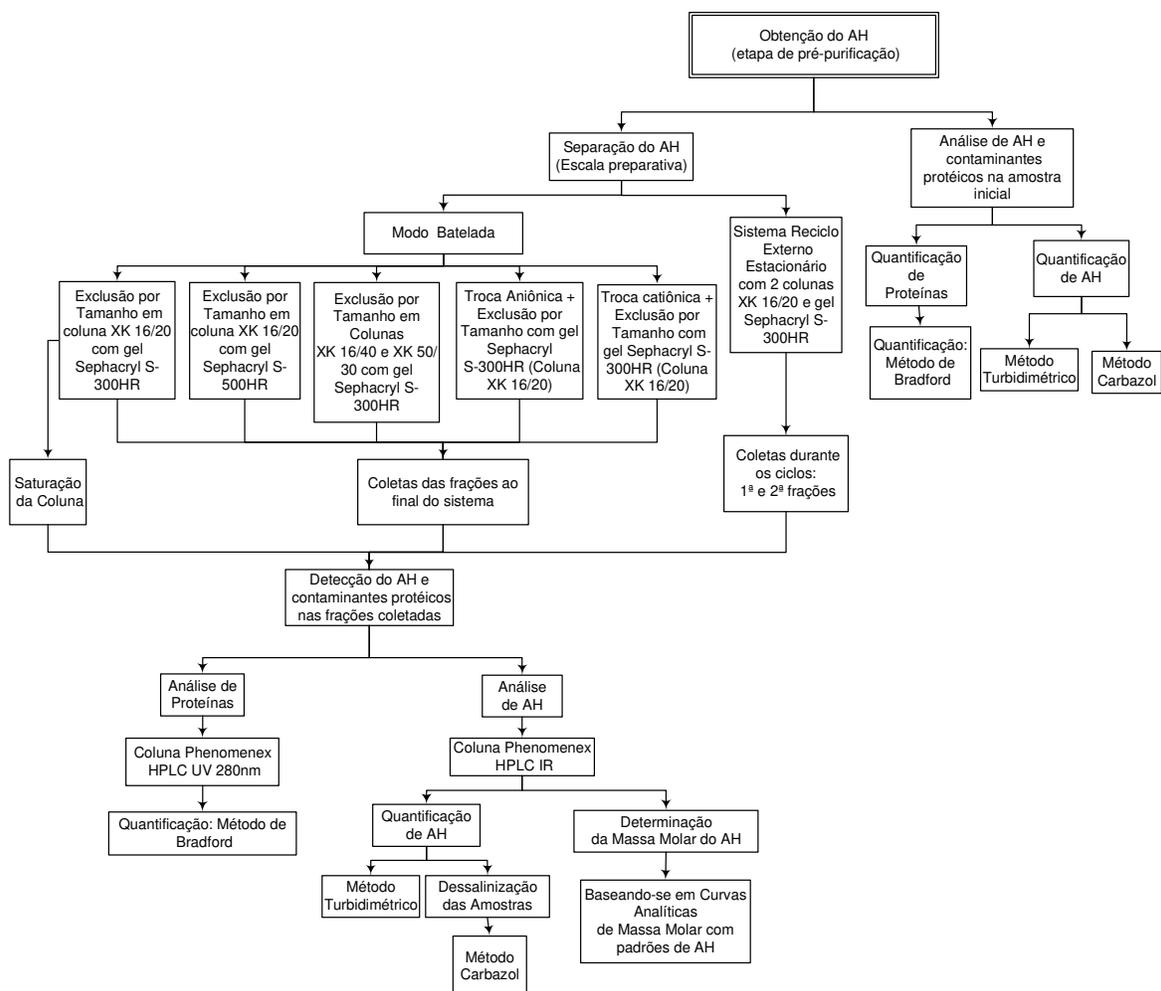
O coeficiente de dispersão axial ( $D_{ax}$ ) para o leito das colunas do sistema REE foi calculado a partir da Equação 3.7, tomando-se como base os termos A e B da equação de van Deemter, determinados conforme a curva de ajuste da equação aos pontos experimentais. A referida curva de van Deemter foi obtida a partir do gráfico de HETP *versus*  $u$ , construído com os dados conseguidos na injeção do traçador dextrana-azul 0,2% (v/v) em diferentes vazões dentro do intervalo entre 1,0 e 3,0 mL/min.

### 3.2.3. Obtenção do Ácido Hialurônico para Alimentação do Sistema

O AH, utilizado no presente trabalho, foi produzido por fermentação em meio de cultura sintético com bactérias do tipo *Streptococcus zooepidemicus*. Para recuperá-lo do mosto fermentado realizaram-se procedimentos de centrifugação, precipitação e solubilização, os quais foram nomeados de etapa de pré-purificação e que será detalhada a seguir.

Um volume de 300 mL do mosto oriundo do processo fermentativo contendo o AH foi centrifugado a 3200 rpm durante 20 minutos à temperatura ambiente. O precipitado, formado por células e outras partículas sólidas, foi descartado. Ao sobrenadante adicionou-se etanol na razão volumétrica 1,5:1 (v/v) e a solução resultante foi mantida sob agitação a 1500 rpm por 1 hora a 4 °C para proporcionar a total precipitação do AH. Em seguida, a solução foi novamente centrifugada a 3200 rpm durante 20 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o AH, precipitado, foi suspenso em 30,0 mL de solução 0,15 M de NaCl. Os procedimentos de precipitação e lavagem foram repetidos por mais duas vezes, de modo a garantir um maior grau de purificação do AH obtido.

Após a etapa de pré-purificação, o AH obtido após três precipitações em etanol e ressuspensões em solução de NaCl 0,15 M, numa mistura ainda contendo contaminantes protéicos como impureza, foi utilizado para alimentação dos processos de separação em estudo. A Figura 3.3 ilustra um fluxograma esquemático dos métodos experimentais empregados a partir da obtenção do AH.



**Figura 3.3:** Fluxograma esquemático dos métodos experimentais empregados para a separação do AH a partir da sua obtenção.

### 3.2.4. Separação do Ácido Hialurônico em Modo Batelada

A separação do AH, em modo batelada, foi avaliada por duas diferentes formas: uma utilizando uma coluna empacotada com uma resina de troca iônica ligada, em série e anterior, à coluna empacotada com gel de exclusão por tamanho, e outra utilizando apenas uma coluna empacotada com gel de exclusão por tamanho. Os géis avaliados foram: Sephacryl S-300HR e Sephacryl S-500HR, as resinas de troca iônica utilizadas foram: Q-

Sepharose Fast-Flow e SP-Sepharose Fast-Flow. Ambas as formas de separação do AH serão detalhadas nos tópicos a seguir.

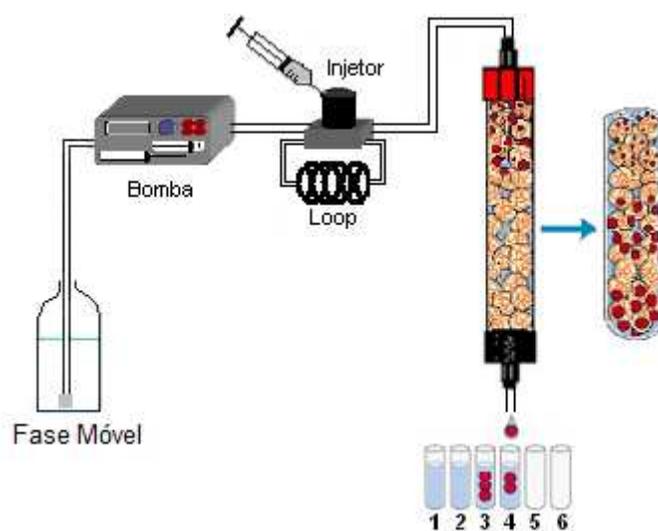
#### **3.2.4.1. Coluna empacotada com Resina de Troca Iônica em série com uma Coluna empacotada com Gel de Exclusão por Tamanho**

Empregando-se uma coluna empacotada com uma resina de troca iônica ligada, em série e anterior à coluna com gel de exclusão por tamanho (Sephacryl S-300HR) foi avaliada, apenas, a coluna preparativa XK 16/20. As dimensões da coluna empacotada com a resina de troca iônica são as seguintes: altura de leito de 8,5 cm e diâmetro interno de 15 mm. Uma vez que a carga residual dos contaminantes protéicos é desconhecida, realizaram-se ensaios utilizando resinas de troca aniônica e catiônica, separadamente.

A resina Q-Sepharose Fast-Flow, trocadora aniônica forte, possui o grupo quaternário de amônio em sua matriz, sendo capaz de reter, através de troca de ânions, os componentes com cargas negativas. A resina SP-Sepharose Fast-Flow, trocadora catiônica forte, detentora do grupo sulfopropil em sua matriz, retém os cátions presentes na amostra. As condições de operação do sistema cromatográfico, para este ensaio, foram: solução de  $\text{NaNO}_3$  0,1 M como fase móvel, pH 7,0 (mantendo-se a fase móvel neutra de modo a não influenciar na separação), temperatura ambiente, vazão de 1,5 mL/min (considerada como vazão ótima conforme a curva de van Deemter), volume de injeção de 1,5 mL (que corresponde a 5,7% do volume da coluna de exclusão por tamanho) e coluna de vidro empacotada com a resina de troca iônica (com altura de leito de 8,1 cm) ligada em série e anterior à coluna preparativa empacotada com o gel Sephacryl S-300HR, contendo uma altura de leito de 13,0 cm. A concentração inicial da amostra alimentada foi de 0,57 mg/mL para o AH e de 0,21 mg/mL para as proteínas. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas a cada minuto ao longo da corrida cromatográfica para, posterior, análise para determinação da massa molar e, também, para verificação e quantificação de AH e possíveis impurezas proteicas.

### 3.2.4.2. Coluna empacotada com Gel de Exclusão por Tamanho

Utilizando-se apenas uma coluna empacotada com gel de exclusão por tamanho foram avaliadas as colunas preparativas XK 16/20, XK 16/40 e XK 50/30, separadamente. Tomando-se a coluna XK 16/20 como base, o emprego da coluna XK 16/40 possibilita a avaliação do ensaio de separação com maior altura do leito, e o uso da coluna XK 50/30 permite a averiguação da influência do aumento do diâmetro interno e do aumento da altura do leito, para posterior comparação de dados com a coluna base, no caso XK 16/20. A Figura 3.4 ilustra o aparato experimental do procedimento de separação do AH, em batelada, utilizando apenas a coluna de exclusão por tamanho.



**Figura 3.4:** Aparato experimental utilizado no ensaio em batelada para a separação do AH empregando-se apenas uma coluna de exclusão por tamanho.

Para os experimentos com a coluna XK 16/20, uma amostra de AH na concentração inicial de 1,10 mg/mL para o AH e de 0,39 mg/mL para as proteínas foi inserida na coluna sob as mesmas condições de operação utilizadas anteriormente no Tópico 3.2.4.1, excluindo-se a coluna de troca iônica. Para as demais colunas, XK 16/40 e XK 50/30, com alturas de leito de 29 e 25 cm, respectivamente, foram calculados a vazão de trabalho adequada, mantendo-se a mesma velocidade superficial, conforme Equação 2.5,

e o volume de injeção adequado, conforme Equação 2.4, de forma a manter o mesmo ambiente de separação tomando-se como base a coluna XK 16/20, considerando a alteração das dimensões da coluna utilizada. As demais condições operacionais foram mantidas.

Empacotada com o gel Sephacryl S-500 HR, somente a coluna preparativa XK 16/20 foi avaliada. As mesmas condições cromatográficas utilizadas, anteriormente, com o gel Sephacryl S-300HR foram adotadas. Durante todo o período de eluição da corrida cromatográfica, em todos os casos supra mencionados, foram coletadas alíquotas de 1,5 mL a cada minuto para posterior análise de identificação da massa molar, bem como detecção e quantificação de AH e contaminantes protéicos.

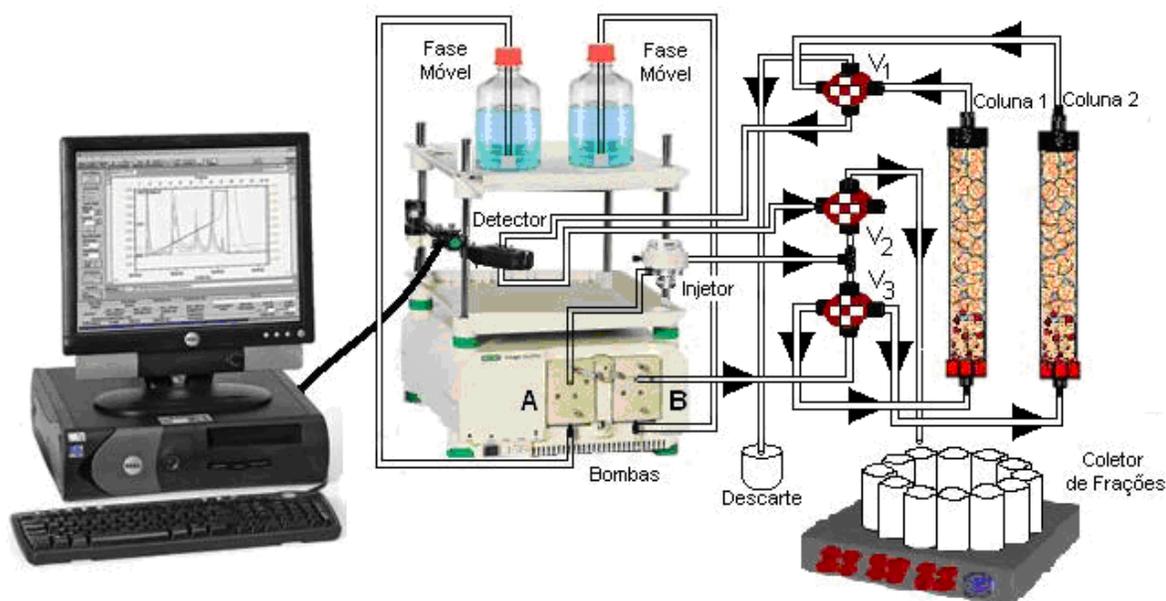
#### **3.2.4.3. Saturação do Leito de Gel de Exclusão por Tamanho**

Este ensaio foi realizado com o intuito de quantificar a carga mássica máxima, em termos de AH e proteínas, suportada pelo leito de gel. A saturação do leito foi realizada apenas com a coluna preparativa XK 16/20, empacotada com o gel Sephacryl S-300HR. Utilizando-se um sistema cromatográfico, bombeou-se a uma vazão de 1,5 mL/min, inicialmente, uma amostra de AH com uma concentração inicial de 0,10 mg/mL para o AH e de 0,045 mg/mL para as proteínas. A saída da coluna foi monitorada por um detector UV, com comprimento de onda de 280 nm, ligado a um software computacional, o que possibilitou o acompanhamento da corrida cromatográfica ao longo do experimento.

Após a formação de um patamar de equilíbrio, nítido na corrida cromatográfica, a solução de AH foi substituída por uma solução de NaNO<sub>3</sub> 0,1 M, até a eluição total da amostra remanescente de dentro da coluna. Foram coletadas alíquotas de 1,5 mL a cada minuto durante todo o percurso realizado no experimento, saturação e eluição, para posterior quantificação em relação ao AH e ao teor proteico.

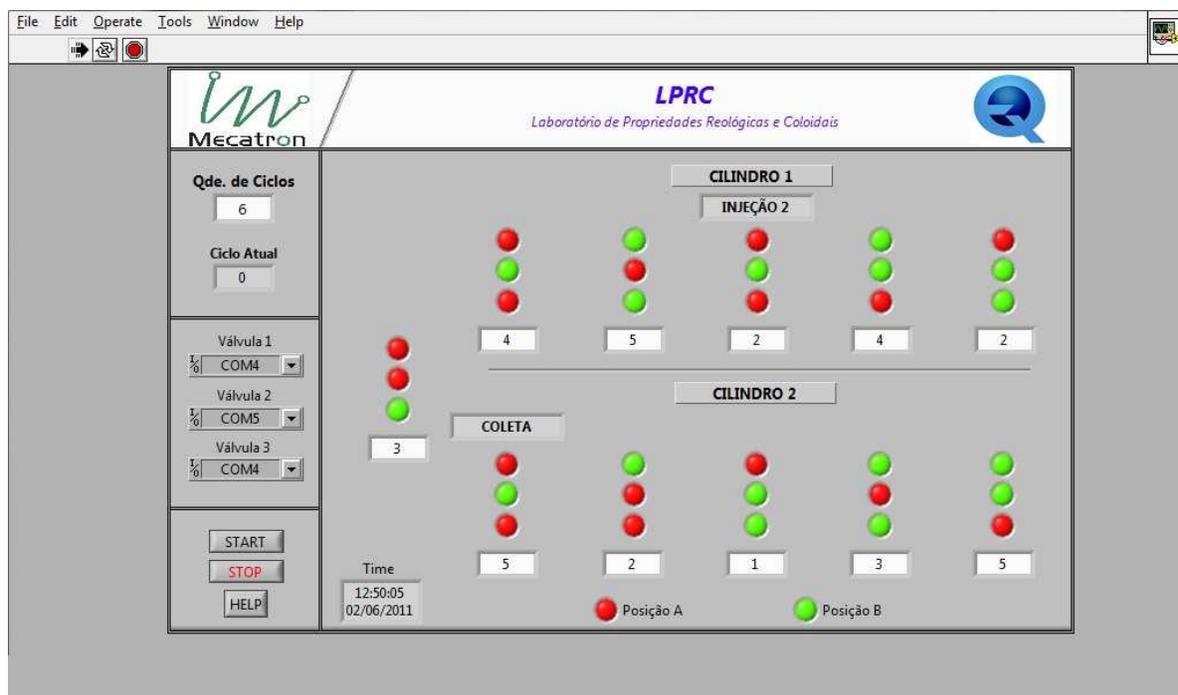
### 3.2.5. Separação do Ácido Hialurônico em Reciclo Externo Estacionário

A separação do AH, utilizando o sistema de reciclo externo estacionário, foi avaliada utilizando duas colunas XK 16/20, empacotadas com gel de exclusão por tamanho (Sephacryl S-300HR), ambas com a mesma altura de leito (13 cm) e mesmo diâmetro (1,6 cm), conectadas por três válvulas de quatro vias (avaliadas na forma manual e automática). O sistema REE consta ainda de duas bombas, um injetor, um detector de UV e um computador para a aquisição de dados. A Figura 3.5 ilustra o esquema do aparato experimental com controle de válvulas manual utilizado neste trabalho, que é semelhante ao reportado por NÓBREGA (2004).



**Figura 3.5:** Aparato experimental utilizado para a separação do AH em REE. A e B: bombas cromatográficas líquidas de baixa e média pressão. C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>: colunas de leito fixo de gel de exclusão por tamanho. V<sub>1</sub> e V<sub>3</sub>: válvulas de 4 vias para recirculação. V<sub>2</sub>: válvula de coleta de frações. Injetor para inserção de amostra no sistema. Detector de UV: sistema de detecção em linha (adaptado de NÓBREGA, 2004).

A operação do sistema com a automação das válvulas é realizada por um programa computacional para o controle das mesmas, tendo sido desenvolvido pela empresa MECATRON – Projetos e Consultoria Jr utilizando o software labVIEW, cuja interface do programa está ilustrada na Figura 3.6. Este software é manipulado por outro computador diferente do utilizado para aquisição de dados.



**Figura 3.6:** Interface do programa computacional utilizado para o controle automático das válvulas do sistema REE, desenvolvido pela Empresa MECATRON – Projetos e Consultoria Jr utilizando o software labVIEW.

Para os experimentos em REE, uma amostra de AH foi inserida no sistema com duas colunas, sob as mesmas condições cromatográficas utilizadas para a coluna XK 16/20 no sistema em batelada. Foram realizadas coletas durante os ciclos de eluição, referentes à 1ª e 2ª frações expelidas do sistema, A e B, respectivamente. Estas frações foram analisadas em uma coluna analítica Phenomenex PolySep-SEC 6000 e posteriormente quantificadas

com relação ao teor de AH e contaminantes protéicos, conforme o procedimento utilizado para operação em batelada.

A seqüência de comandos operacionais durante os ciclos cromatográficos em REE foi dividida em etapas que serão descritas a seguir:

Etapa 1 - Inicialmente, a fase móvel é bombeada pelas bombas A e B para as colunas  $C_1$  e  $C_2$ , respectivamente, direcionados pela válvula  $V_3$ , para o condicionamento das colunas. A válvula  $V_1$  direciona a saída da coluna  $C_1$  para o detector e a saída da coluna  $C_2$  para o descarte. A válvula  $V_2$  está direcionando a saída do detector para o coletor de frações.

Etapa 2 - Passada 1 hora de condicionamento, aproximadamente, é realizada a injeção da amostra pelo acionamento do injetor, enquanto as demais válvulas dão as condições para a amostra ser introduzida inicialmente na coluna  $C_1$ . No início do perfil cromatográfico, após um tempo de 5 minutos, tem-se início a coleta da 1ª fração - A.

Etapa 3 - Coletada a 1ª fração - A, oriunda da coluna  $C_1$ , a válvula  $V_2$  envia o fluxo que sai da coluna  $C_1$  para a válvula  $V_3$  que permite a inserção da fração recirculada na coluna  $C_2$ , esta fração recirculada corresponde à primeira zona do reciclo, no caso  $R_1$ . Neste momento a bomba A é pausada. A bomba B impulsiona o fluxo de todo o sistema em reciclo passando pela coluna  $C_1$  através da mudança de direção da válvula  $V_3$  e seguindo para a coluna  $C_2$ .

Etapa 4 - Recirculada a 1ª fração do reciclo, a bomba B é, então, pausada e a bomba A é ativada para a realização de uma nova injeção de amostra, desta vez na coluna  $C_2$ , através da válvula  $V_3$ . A saída da coluna  $C_2$  permanece direcionada para o descarte através da válvula  $V_1$ .

Etapa 5 - Após a segunda injeção, a bomba A é novamente pausada, acionando-se a bomba B que através da válvula  $V_3$  impulsiona o fluxo do sistema em reciclo passando inicialmente pela coluna  $C_1$  e seguindo em direção a coluna  $C_2$ , dando início ao 2º

reciclo, no caso  $R_2$ , que corresponde ao fluxo que vem da coluna  $C_1$  e é direcionado para a coluna  $C_2$ , cuja saída permanece direcionada para o descarte através da válvula  $V_1$ .

Etapa 6 - Após o segundo reciclo, a bomba A é novamente acionada, funcionando juntamente com a bomba B. Neste momento a válvula  $V_3$  permite que a bomba A impulsione o fluxo para a coluna  $C_2$  e a bomba B para a coluna  $C_1$ . A saída da coluna  $C_2$  permanece direcionada para o descarte através da válvula  $V_1$ . A válvula  $V_2$  é posicionada de modo a direcionar o fluxo que sai do detector, oriundo da coluna  $C_1$  através da válvula  $V_1$ , para o coletor de frações e tem-se o início da coleta da 2ª fração - B, que corresponde ao final do perfil cromatográfico que sai da coluna  $C_1$ . Assim, finaliza-se um ciclo.

Etapa 7 - Coletada a 2ª fração - B, a válvula  $V_1$  é posicionada de modo a direcionar o fluxo de saída da coluna  $C_2$  para o detector e o da coluna  $C_1$  para o descarte. Mantém-se a posição da válvula  $V_2$  para a coleta da 1ª fração - A, vinda da coluna  $C_2$ , proveniente da segunda injeção (Etapa 4). A posição da válvula  $V_3$  também é mantida. Inicia-se um novo ciclo.

Etapa 8 - Coletada a 1ª fração - A, agora oriunda da coluna  $C_2$ , a válvula  $V_2$  envia o fluxo que sai da coluna  $C_2$  para a válvula  $V_3$  que muda de posição, permitindo a inserção da fração recirculada na coluna  $C_1$ , esta fração recirculada corresponde à  $R_1$ . Neste momento a bomba A é pausada. A bomba B impulsiona o fluxo de todo o sistema em reciclo passando pela coluna  $C_2$  através da mudança de direção da válvula  $V_3$  e seguindo para a coluna  $C_1$ . Esta etapa é semelhante à Etapa 3, porém trocando-se a ordem das colunas.

Etapa 9 - Após o primeiro reciclo  $R_1$ , a bomba B é, então, pausada e a bomba A é ativada para a realização da terceira injeção de amostra, desta vez na coluna  $C_1$  novamente, através da válvula  $V_3$ . A saída da coluna  $C_1$  é direcionada para o descarte através da válvula  $V_1$ .

Etapa 10 - Após a terceira injeção, a bomba A é novamente pausada, acionando-se a bomba B que através da válvula V<sub>3</sub> impulsiona o fluxo do sistema em reciclo passando pela coluna C<sub>2</sub> e seguindo em direção a coluna C<sub>1</sub>, dando início ao reciclo R<sub>2</sub>, que corresponde ao fluxo que vem da coluna C<sub>2</sub> e é direcionado para a coluna C<sub>1</sub>, cuja saída permanece direcionada para o descarte através da válvula V<sub>1</sub>.

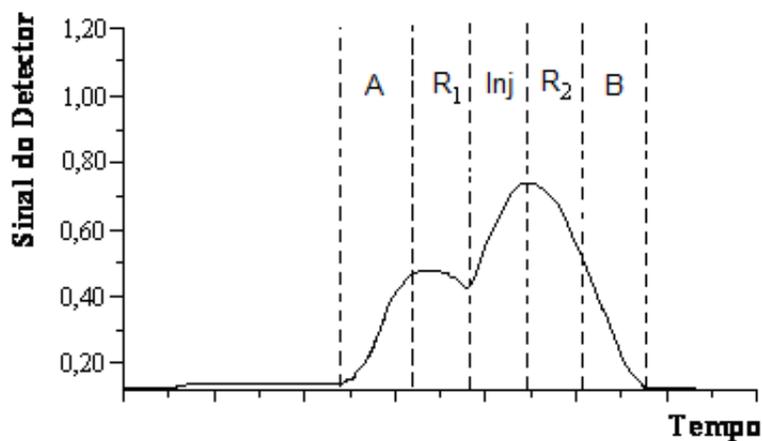
Etapa 11 - Recirculado o segundo reciclo, R<sub>2</sub>, a bomba A é novamente acionada, funcionando em conjunto com a bomba B. Neste momento a válvula V<sub>3</sub> permite que a bomba A impulsiona o fluxo para a coluna C<sub>1</sub> e a bomba B para a coluna C<sub>2</sub>. A saída da coluna C<sub>1</sub> permanece direcionada para o descarte através da válvula V<sub>1</sub>. A válvula V<sub>2</sub> direciona o fluxo que sai do detector, oriundo da coluna C<sub>2</sub>, através da válvula V<sub>1</sub>, para a coleta e tem-se início a coleta da 2<sup>a</sup> fração - B, que corresponde ao final do perfil cromatográfico que sai da coluna C<sub>2</sub>. Assim, finaliza-se outro ciclo.

Etapa 12 - Coletada a 2<sup>a</sup> fração - B, posiciona-se a válvula V<sub>1</sub> de modo a direcionar o fluxo de saída da coluna C<sub>1</sub> para o detector e o da coluna C<sub>2</sub> para o descarte. Mantém-se a posição da válvula V<sub>2</sub> para a coleta da 1<sup>a</sup> fração - A, vinda da coluna C<sub>1</sub>, proveniente da terceira injeção (Etapa 9). A posição da válvula V<sub>3</sub> também é mantida. Inicia-se, então, mais um novo ciclo.

A partir da Etapa 3 ocorre uma repetição de tarefas, variando a seqüência das colunas, conforme o número de ciclos requisitados para o experimento. No presente trabalho, para cada experimento realizaram-se até 12 ciclos. Ao final de cada experimento, as colunas foram lavadas com a mesma solução da fase móvel, para a retirada de qualquer resíduo remanescente, e em seguida foram acondicionadas em água.

Um cromatograma representativo do perfil de um ciclo cromatográfico de uma amostra de AH no sistema REE pode ser observado na Figura 3.7. As distintas zonas, ao longo do ciclo, estão representadas por linhas tracejadas para melhor visualização. A e B

são as frações coletadas mais ricas em AH e proteínas, respectivamente.  $R_1$  e  $R_2$  são as frações recirculadas contendo a mistura entre AH e proteínas, sendo que na fração  $R_1$  a concentração de AH está em maior proporção e na  $R_2$  a concentração de AH encontra-se em menor proporção. Estas frações,  $R_1$  e  $R_2$ , são as recirculadas no sistema, conforme as Etapas 3 e 5, detalhadas anteriormente.



**Figura 3.7:** Cromatograma característico do perfil de um ciclo cromatográfico de uma amostra de AH (contendo a mistura de AH e proteínas) no sistema REE. A e B são as frações coletadas ricas em AH e proteínas, respectivamente.  $R_1$  e  $R_2$  são as frações recirculadas no sistema, sendo que na fração  $R_1$  a concentração de AH está em maior proporção e na  $R_2$  a concentração de AH encontra-se em menor proporção. A injeção da amostra em cada ciclo é realizada entre as zonas de reciclo ( $R_1$  e  $R_2$ )

### 3.2.6. Detecção da Presença de Ácido Hialurônico e Contaminantes Protéicos

Para a detecção do AH, em todas as frações coletadas, realizaram-se análises em um sistema de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) com detector de índice de refração. A presença de contaminantes protéicos foi também detectada por análises em CLAE com detector de UV-Vis com comprimento de onda de 280 nm. Utilizaram-se as seguintes condições cromatográficas: coluna analítica Phenomenex PolySep GPC 6000,

pré-coluna, temperatura ambiente, solução de 0,1 M de NaNO<sub>3</sub> como fase móvel, vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL.

### 3.2.7. Quantificação do Ácido Hialurônico

A concentração de AH, nas frações coletadas, foi determinada por dois métodos: Método Químico Carbazol, proposto por BITTER e MUIR (1962), que vem a ser uma modificação do método criado por DISCHE (1946), e pelo Método Turbidimétrico CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio), proposto por CHEN e WANG (2009).

No método químico Carbazol, o procedimento consiste da adição lenta de 0,5 mL da amostra a 3,0 mL de solução 0,025 M de Tetraborato de Sódio em Ácido Sulfúrico, previamente resfriado a 4° C por 5 minutos. A mistura é aquecida por 10 minutos a 100°C, e em seguida resfriada à temperatura ambiente, quando então são adicionados 100 µL de solução alcoólica de carbazol 0,125 %. A mistura é novamente aquecida por 15 minutos a 100°C, sendo em seguida resfriada à temperatura ambiente. A absorbância das soluções é medida, após o resfriamento, em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 530 nm. Como referência, construiu-se uma curva analítica utilizando hialuronato de sódio (Hylumed®) como padrão em diferentes concentrações, variando-se de 25 a 200 mg/L.

Antes da quantificação pelo método químico Carbazol, faz-se necessário a dessalinização das amostras, devido a presença de nitrato de sódio que é interferente no desenvolvimento da análise, mascarando a coloração rosa característica do método químico Carbazol e apresentando uma coloração esverdeada. A dessalinização das amostras foi realizada submetendo-se 1,0 mL das frações de AH a colunas de dessalinização (Bio-rad, econo-pac 10 DG), previamente equilibradas com 15 mL de água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore). A eluição é dada gravitacionalmente, sem o uso de bombas, por tratar-se de coluna aberta. Em seguida, o AH é coletado em 2,0 mL de água deionizada (a mesma utilizada para o equilíbrio do sistema).

O método turbidimétrico CTAB baseia-se na formação de uma turvação entre o AH e o CTAB, que é um surfactante catiônico. Esta turvação apresenta-se mais intensa com o aumento da concentração de AH na solução. A análise consiste da adição de 2 mL de solução 2,5% de CTAB em Cloreto de Sódio 0,2 M a 1 mL da amostra, seguido de agitação. A absorbância das soluções é medida, após 10 minutos, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 400 nm. Como referência, construiu-se uma curva analítica para este método utilizando-se, como padrão, soluções de hialuronato de sódio (Hylumed®) no intervalo de concentração de 20 a 160 mg/L.

CHEN e WANG (2009) compararam o método turbidimétrico CTAB com o método químico Carbazol, modificado por BITTER e MUIR (1962) que, até então, vem sendo o mais confiável para determinação da concentração de AH. Eles concluíram que, em termos de acurácia, precisão e sensibilidade, o método turbidimétrico CTAB é tão eficiente quanto o método químico Carbazol, além de ser uma análise mais rápida, menos laboriosa e mais segura, uma vez que no método sugerido inicialmente por DISCHE (1946), é utilizado ácido sulfúrico concentrado como principal reagente (CHEN e WANG, 2009). Baseando-se no trabalho realizado por CHEN e WANG (2009), optou-se por quantificar o AH apenas pelo método turbidimétrico CTAB no desenrolar dos experimentos do presente trabalho, pois além da rapidez da análise, seria eliminada do processo de separação a etapa de dessalinização das amostras, que é necessária no ensaio analítico pelo método químico Carbazol. A quantificação do AH pelo método turbidimétrico CTAB foi então realizada após a análise de todas as frações coletadas por CLAE que possibilita a visualização do pico referente ao AH no detector de índice de refração, bem como o pico referente as proteínas no detector de UV com comprimento de onda de 280 nm.

### **3.2.8. Quantificação dos Contaminantes Protéicos**

A quantificação dos contaminantes protéicos foi conduzida pelo método de BRADFORD (1976), que se baseia na interação entre o corante (Coomassie brilliant blue BG-250) presente no reagente ácido de Bradford com as proteínas solúveis no meio,

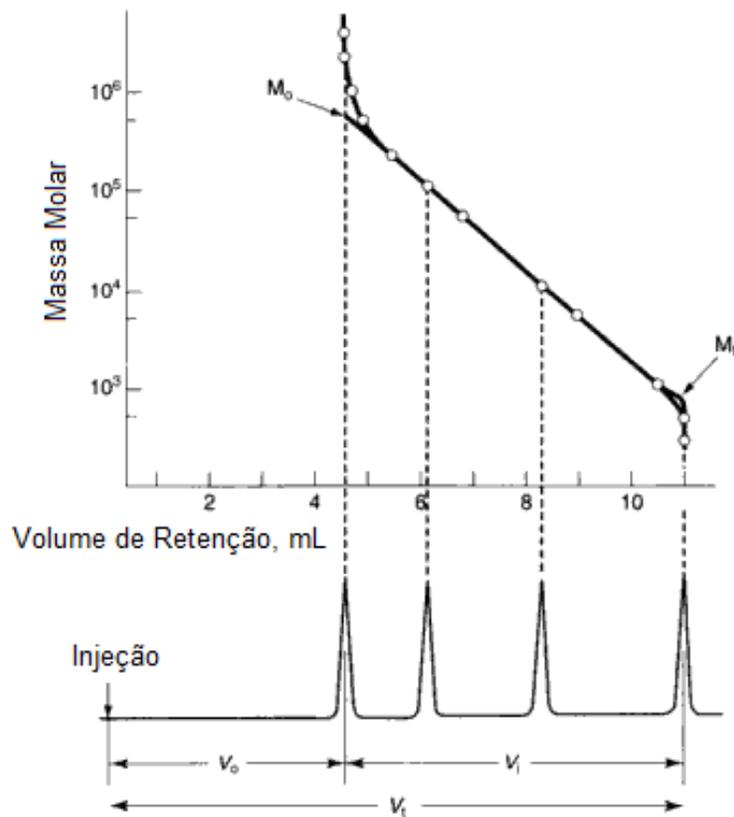
formando um complexo de cor azul. Este complexo tem sua tonalidade aumentada conforme o aumento da concentração de proteínas.

A análise consiste da adição de 1,0 mL do reagente de Bradford a 100 µL de amostra. A absorbância das soluções é medida, após 10 minutos, em espectrofotômetro, sob o comprimento de onda de 595 nm (BRADFORD, 1976). Como referência, construiu-se uma curva analítica utilizando padrões de BSA (Bovine Serum Albumin) no intervalo de concentração de 0,1 a 1,0 mg/mL.

### **3.2.9. Determinação da Massa Molar do Ácido Hialurônico e dos Contaminantes Protéicos**

Para avaliar a massa molar do AH e das proteínas nas frações coletadas, inicialmente, fez-se necessária a construção de uma curva padrão de massa molar (CANEVAROLO, 2002). Esta curva possibilita a relação entre o volume de eluição ou tempo de retenção de um referencial padrão à massa molar destes padrões, devidamente conhecidas construída sob as mesmas condições cromatográficas utilizadas para a análise das amostras, conforme ilustra a Figura 3.8. Desta forma, construiu-se uma curva padrão de massa molar utilizando padrões de AH com diferentes e conhecidas massas molares ( $5,0 \times 10^4$  a  $1,0 \times 10^6$  Da).

A massa molar das frações de AH e de proteínas foram determinadas por CLAE acoplada a dois detectores ligados em série (índice de refração e UV-Vis, em 280 nm), coluna analítica Phenomenex PolySep GPC 6000 e pré-coluna. As condições cromatográficas utilizadas foram: 0,1 M de  $\text{NaNO}_3$  pH 7,0 como fase móvel, temperatura ambiente, vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL. Os tempos de retenção obtidos tanto para o AH quanto para as proteínas, nas respectivas frações A e B foram então, inferidos na curva padrão de massa molar construída com padrões de AH, nas mesmas condições cromatográficas, possibilitando a obtenção da massa molar de cada componente (AH e proteínas) nas referidas frações.



**Figura 3.8:** Típica curva de calibração em SEC ilustrando pontos de massa molar *versus* volume de eluição ou volume de retenção de uma série de padrões poliméricos de massa molar conhecida. O volume de permeação total da coluna,  $V_t$ , é igual ao volume de vazios da coluna,  $V_0$ , mais o volume dos poros das partículas do leito,  $V_i$ .  $M_0$  é a massa molar definida como limite de exclusão da coluna e  $M_t$  é a massa molar definida como limite de permeação total da coluna (MORI e BARTH, 1999).

# Capítulo 4

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Empacotamento do Leito Cromatográfico

As colunas preparativas XK 16/20, 16/40 e XK 50/30 foram empacotadas com o gel Sephacryl S-300 HR, estando ilustrado na Figura 4.1. Outro gel estudado foi Sephacryl S-500 HR para a coluna XK 16/20, apenas. A Tabela 4.1 apresenta as diferentes colunas utilizadas, suas dimensões e os respectivos géis trabalhados. O empacotamento das colunas se deu bombeando-se uma solução de etanol 20% (v/v), equivalente a que se encontrava armazenado o gel de trabalho, conforme descrito anteriormente no tópico 3.2.1 do Capítulo de Material e Métodos. As duas colunas XK 16/20 empacotadas com o gel Sephacryl S-

300HR foram caracterizadas em termos de sua hidrodinâmica, cujos dados obtidos estão expostos nos próximos tópicos a serem abordados durante a leitura deste capítulo, conforme método experimental descrito no tópico 3.2.2 do Capítulo de Material e Métodos.



(A) (B) (C) (D)

**Figura 4.1:** Colunas preparativas empregadas na realização dos experimentos do respectivo trabalho: (A) coluna de troca iônica utilizada com a resina aniônica, Q-Sepharose Fast-Flow, ou catiônica, SP-Sepharose Fast-Flow; (B) XK 16/20; (C) XK 16/40 e (D) XK 50/30 empacotadas com o gel de SEC Sephacryl S-300 HR.

Após o empacotamento das respectivas colunas, as mesmas foram lavadas com água deionizada pelo sistema Milli-Q e condicionadas com a fase móvel a ser utilizada. Foram, então, realizados ensaios de separação do AH nas referidas colunas,

individualmente, em modo batelada sob condições experimentais detalhadas nos tópicos a seguir, ainda neste capítulo.

**Tabela 4.1:** Dimensões das colunas XK utilizadas e os respectivos géis de recheio.

Coluna	Diâmetro Interno (cm)	Altura do Leito (cm)	Gel utilizado como Recheio
XK 16/20	1,6	13,0	Sephacryl S-300HR Sephacryl S-500HR
XK 16/40	1,6	29,0	Sephacryl S-300HR
XK 50/30	5,0	25,0	Sephacryl S-300HR
Troca Iônica	1,5	8,1	Q-Sepharose Fast Flow SP-Sepharose Fast Flow

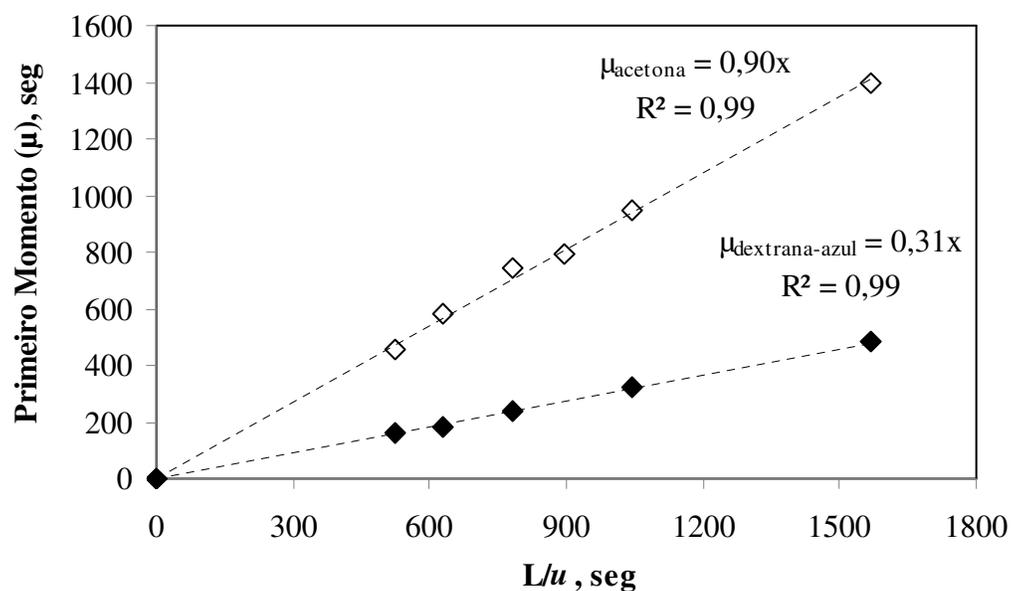
## 4.2. Hidrodinâmica das Colunas do Sistema de Reciclo Externo Estacionário

### 4.2.1. Determinação das Porosidades do Leito e da Partícula

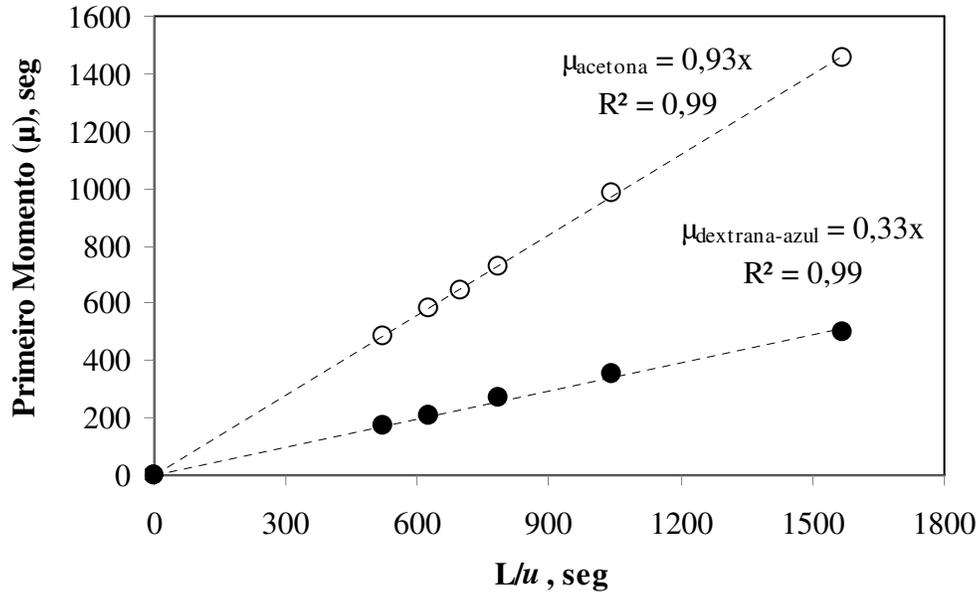
A porosidade do leito de gel das duas colunas XK 16/20 utilizadas no sistema de reciclo externo estacionário, bem como a porosidade das partículas deste gel, Sephacryl S-300HR, foram determinadas por meio do método de análise dos momentos. Para o desenvolvimento de tal método, realizou-se a injeção dos traçadores de alta e baixa massa molar, dextrana azul 0,2% (v/v) e acetona 0,1% (v/v), respectivamente, variando-se as vazões de 0,5 a 3,0 mL/min nas duas colunas confeccionadas em vidro, comercializadas

como XK 16/20, individualmente. A coluna XK 16/20 empacotada com o gel Sephacryl S-300HR possui uma altura de leito de 13,0 cm e 1,6 cm de diâmetro.

Os experimentos foram realizados no equipamento utilizado para o sistema de REE, embora empregando-se apenas uma coluna por vez, contendo uma bomba, um detector de UV em 280 nm e um computador para a aquisição dos dados. As Figuras 4.2 e 4.3 ilustram os dados experimentais plotados para as duas colunas XK 16/20 utilizadas no sistema REE, agora nomeadas Coluna 1 e Coluna 2, em relação ao primeiro momento relativos ao leito de gel empregando os traçadores supra citados.



**Figura 4.2:** Dados experimentais da determinação do primeiro momento, em um leito fixo de gel, com os traçadores acetona ( $\diamond$ ) e dextrana-azul ( $\blacklozenge$ ) para a coluna 1 – XK 16/20 (d.i. 1,6 cm e altura do leito de 13 cm) – do sistema REE, e o ajuste linear para cada traçador (-).



**Figura 4.3:** Dados experimentais da determinação do primeiro momento, em um leito fixo de gel, com os traçadores acetona (○) e dextrana-azul (●) para a coluna 2 – XK 16/20 (d.i. 1,6 cm e altura do leito de 13 cm) – do sistema REE, e o ajuste linear para cada traçador (-).

Avaliando-se a Figura 4.2, tem-se que o ajuste linear aos dados experimentais obtidos com o traçador acetona para a coluna 1 do sistema REE, considerando o volume morto para a referida coluna com o respectivo traçador, é representado pela Equação 4.1.

$$\mu = 0,90 \cdot \left( \frac{L}{u} \right) \quad (4.1)$$

Equação na qual  $L$  é o comprimento do leito,  $u$  é a velocidade superficial,  $\mu$  é o primeiro momento e a inclinação da reta fornece a porosidade total,  $\varepsilon_T$ , no valor de 0,90, equivalente a  $[\varepsilon + (1 - \varepsilon) \varepsilon_p]$ , conforme Equação 3.3.

A porosidade do leito,  $\varepsilon$ , para a coluna 1 do sistema REE é alcançada através da inclinação da reta de ajuste linear aos dados obtidos com o traçador dextrana-azul,

considerando o volume morto para a respectiva coluna com o referido traçador, exposta pela Equação 4.2.

$$\mu = 0,31 \cdot \left( \frac{L}{u} \right) \quad (4.2)$$

Equação na qual a porosidade do leito  $\varepsilon = 0,31$ .

De posse das porosidades do leito,  $\varepsilon$ , e total,  $\varepsilon_T$ , a porosidade da partícula do leito da coluna 1 do sistema REE é calculada, a partir da Equação 3.3, como sendo  $\varepsilon_P = 0,86$ . A mesma avaliação utilizada para o cálculo das porosidades total, do leito e da partícula na coluna 1 foi também empregada para a coluna 2 do sistema REE e os resultados estão apresentados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Resultados alcançados através do cálculo das porosidades total, da partícula e do leito para as duas colunas pertencentes ao sistema REE.

	COLUNA 1	COLUNA 2
<b>Porosidade Total (<math>\varepsilon_T</math>)</b>	0,90	0,93
<b>Porosidade do Leito (<math>\varepsilon</math>)</b>	0,31	0,33
<b>Porosidade da Partícula (<math>\varepsilon_P</math>)</b>	0,86	0,89

#### 4.2.2. Determinação do Número de Pratos Teóricos

O número de pratos teóricos (N) das colunas 1 e 2 – XK 16/20 – do sistema REE foi determinado utilizando-se o traçador acetona 0,1% (v/v) em diferentes vazões, variando-se de 0,5 a 3,0 mL/min. Para cada pico cromatográfico, referente à acetona, em determinada vazão, obteve-se a largura do pico à meia altura,  $w_{1/2}$ , e o tempo de retenção,  $t_R$ , através da sua derivada primeira. De posse dos valores calculados, obteve-se um número

de pratos teóricos médio para cada coluna, através da Equação 3.5. Os resultados obtidos para cada coluna estão expostos na Tabela 4.3.

Verifica-se que o número de pratos teóricos,  $N$ , para a coluna 2 do sistema REE é superior ao calculado para a coluna 1, o que implica na obtenção de picos um pouco menos largos, apresentando  $w_{1/2}$  menor em relação à coluna 1. Todavia, isto não se mostrou agravante no processo de separação, uma vez que o perfil cromatográfico exibido pelas duas colunas comportou-se de modo semelhante. O número de pratos teóricos calculado para ambas as colunas apresentou um valor de, aproximadamente,  $3000 \text{ m}^{-1}$ , enquanto que o valor de  $N$  para colunas de vidro comerciais, devidamente empacotadas com o mesmo gel utilizado neste trabalho, atinge um número de pratos teóricos em torno de  $5000 \text{ m}^{-1}$ .

**Tabela 4.3:** Resultados obtidos através do cálculo do número de pratos teóricos por metro para as duas colunas pertencentes ao sistema REE.

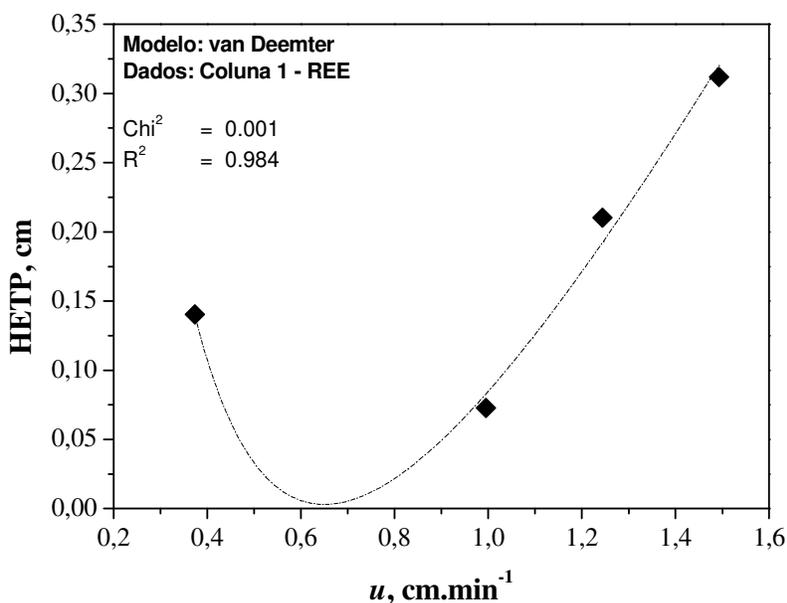
	COLUNA 1	COLUNA 2
<b>L (cm)</b>	13	13
<b>HETP (cm)</b>	0,15	0,15
<b>N (<math>\text{m}^{-1}</math>)</b>	3036	3889

Segundo informações do fabricante do gel, GE Healthcare, avaliando-se o valor de HETP que é obtido pela Equação 3.6, pode-se dizer que colunas com valores de HETP entre 0,06 e 0,10 cm apresentam-se com uma boa eficiência de separação. Enquanto que, colunas com valores de HETP inferiores a 0,06 cm mostram-se como excelentes, e valores entre 0,10 e 0,15 cm apresentam-se como aceitáveis. Pode-se dizer que o valor de  $N$  calculado para o empacotamento em laboratório, mesmo apresentando-se distante do valor de  $N$  disponível no mercado, guardadas as devidas condições operacionais, mostra-se apto para o emprego nos processos de separação, uma vez que ambas as colunas apresentaram valores de HETP em torno de 0,15 cm de acordo com a Tabela 4.3, e classificam-se como

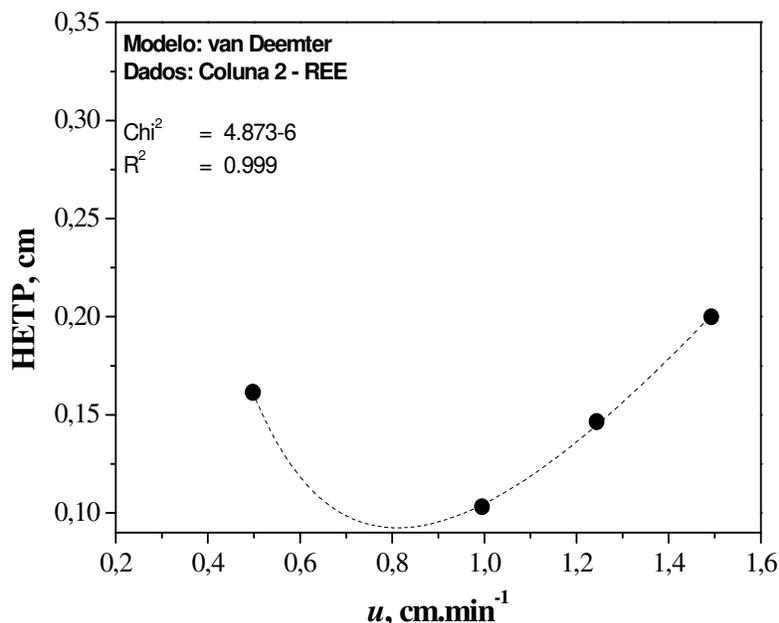
colunas com eficiência de separação aceitáveis de acordo com as especificações do fabricante. Pequenos valores de HETP indicam elevados valores de N e maior eficiência da coluna. Quanto maior for o número de pratos teóricos, maior será o número de estágios de equilíbrio, melhor a eficiência da coluna e, conseqüentemente, melhor a separação (SNYDER e KIRKLAND, 1979).

#### 4.2.3. Determinação do Coeficiente de Dispersão Axial

O coeficiente de dispersão axial,  $D_{ax}$ , para as colunas 1 e 2 – XK 16/20 – do sistema REE foi determinado de acordo com a Equação 3.7, tomando-se como base os termos A e B da equação de van Deemter, representada pela Equação 3.8. A referida equação foi obtida a partir do ajuste aos dados obtidos com o traçador dextrana-azul 0,2% (v/v) plotados no gráfico HETP *versus*  $u$ , conforme ilustram as Figuras 4.4 e 4.5, respectivamente.



**Figura 4.4:** Curva de van Deemter (-) obtida através do ajuste dos pontos experimentais (♦) obtidos com o traçador dextrana-azul (0,2 %) na coluna 1 do sistema REE, empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, utilizando  $\text{NaNO}_3$  0,1 M pH 7,0 como fase móvel.



**Figura 4.5:** Curva de van Deemter (-) obtida através do ajuste dos pontos experimentais (●) obtidos com o traçador dextrana-azul (0,2 %) na coluna 2 do sistema REE, empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, utilizando NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel.

Observando as Figuras 4.4 e 4.5, as quais ilustram o perfil resultante do comportamento da altura equivalente a um prato teórico em função da velocidade superficial da fase móvel, verifica-se que, segundo KRIJGSMAN (1992), o menor valor de HETP exibido no gráfico corresponde a um valor ótimo de velocidade superficial para cada coluna. Assim sendo, comparando-se as duas Figuras 4.4 e 4.5, optou-se por um valor de velocidade superficial médio que fosse ótimo para a utilização em ambas as colunas, não sofrendo a influência dos efeitos de dispersão axial, no caso  $u = 0,75$  cm/s, que corresponde a uma vazão de 1,5 mL/min, que foi a vazão tomada como padrão em todos os experimentos tanto em batelada como no sistema REE para as duas colunas XK 16/20 empacotadas com o gel Sephacryl S-300HR.

Tomando-se os termos A e B da equação de van Deemter, que representam os efeitos de dispersão axial e difusão molecular, respectivamente, e comparando-os à

Equação 3.7, obtém-se o coeficiente de dispersão axial relativo a cada coluna empregada no sistema REE, colunas 1 e 2. Os resultados obtidos, bem como os termos A, B e C da equação de van Deemter e seus respectivos desvios padrão conseguidos para as colunas 1 e 2 do sistema REE estão expostos na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4:** Parâmetros da equação de van Deemter e coeficiente de dispersão axial ( $D_{ax}$ ) obtidos para as colunas 1 e 2 do sistema REE, empacotadas com o gel Sephacryl S-300 HR.

	A	B	C	$D_{ax}$ ( $\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ )
<b>COLUNA 1</b>	$0,86 \pm 0,16$	$0,67 \pm 0,09$	$0,28 \pm 0,05$	$0,33 + 0,43u$
<b>COLUNA 2</b>	$0,47 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,01$	$0,29 + 0,24u$

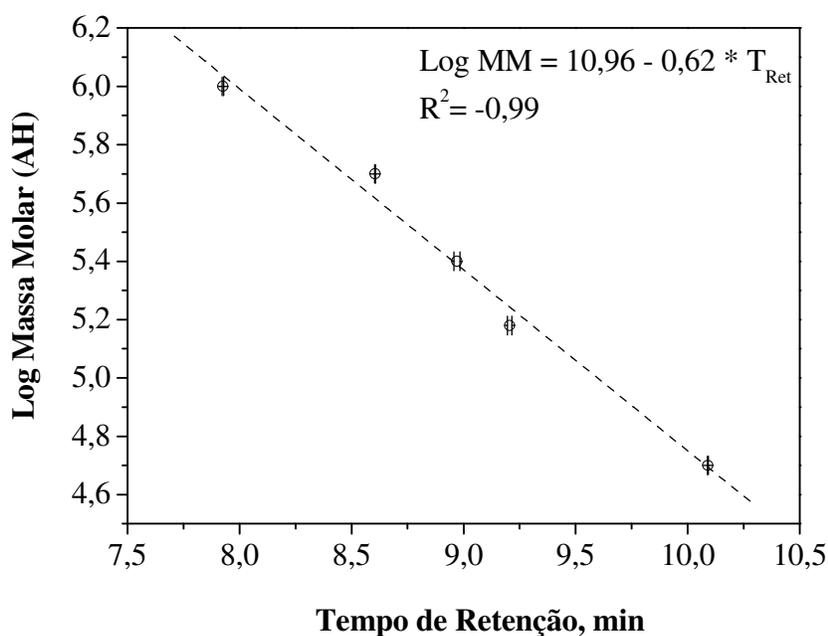
Com base nos dados apresentados na Tabela 4.4, observa-se que o coeficiente de dispersão axial calculado para a coluna 1 é maior que o obtido para a coluna 2, o que vem a refletir o fato do número de pratos teóricos da coluna 1 apresentar-se inferior ao da coluna 2, entretanto isto também não se mostrou como agravante para a separação uma vez que o perfil cromatográfico de separação de ambas as colunas apresentaram-se semelhantes. Esta diferença encontrada no número de pratos teóricos e no coeficiente de dispersão axial das colunas do sistema REE pode ser justificada pela forma manual de empacotamento das mesmas.

### 4.3. Avaliação da Massa Molar

Para avaliar a massa molar dos componentes estudados fez-se necessária a construção de uma curva padrão de massa molar, a qual possibilita a relação entre o tempo de retenção ou volume de eluição do referido composto com sua respectiva massa molar. A

curva padrão de massa molar foi construída com padrões de AH comercializados em diferentes faixas de massa molar devidamente conhecida, no intervalo de  $5,0 \times 10^4$  a  $1,0 \times 10^6$  Da. Uma solução de cada padrão de AH foi preparada em água, e em seguida analisada por CLAE com detector de índice de refração, coluna analítica Phenomenex PolySep GPC 6000 e pré-coluna, sob as condições cromatográficas descritas anteriormente no Tópico 3.2.8. A curva padrão de massa molar obtida com padrões de AH pode ser visualizada na Figura 4.6. O ajuste linear aos pontos experimentais obtidos foi realizado utilizando o programa computacional Microcal Origin - versão 6.0, representado pela Equação 4.3.

$$\log(\text{MM}) = 10,96 - 0,62 \cdot T_{\text{Reten\c{a}o}} \quad (4.3)$$



**Figura 4.6:** Curva padrão de massa molar construída com padrões de ácido hialurônico utilizando coluna analítica Phenomenex PolySep GPC 6000 e pré-coluna, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , temperatura ambiente, vazão de 1,0 mL/min, detector de índice de refração e  $\text{NaNO}_3$  0,1 M pH 7,0 como fase móvel.

#### 4.4. Ensaios de separação do Ácido Hialurônico por Cromatografia de Exclusão por Tamanho em modo Batelada

Os ensaios de separação do AH, em batelada, foram realizados por dois diferentes métodos: o primeiro empregou-se uma coluna empacotada com uma resina de troca iônica ligada em série e antes da coluna empacotada com gel de exclusão por tamanho; já no segundo método fez uso apenas da coluna empacotada com gel de exclusão por tamanho. O estudo dos diferentes métodos tem como intuito avaliar a melhoria no processo de separação do AH no modo batelada fazendo uso do material disponível no laboratório de trabalho. Os diferentes métodos serão abordados e detalhados nos tópicos a seguir.

Para a alimentação de todos os ensaios de separação do AH utilizou-se a amostra de AH oriunda da etapa de pré-purificação, descrita no tópico 3.2.3 do capítulo de Material e Métodos, após três precipitações em etanol e ressuspensões em NaCl 0,15 M. A distribuição da massa molar da referida amostra foi realizada por CLAE com detector de índice de refração, coluna analítica Phenomenex PolySep GPC 6000 e pré-coluna, sob as condições cromatográficas descritas anteriormente no Tópico 3.2.8. O resultado para a distribuição de massa molar em relação ao AH para a amostra inicial é obtido através do fracionamento do pico cromatográfico visualizado por CLAE com detector de índice de refração e é dada pela Tabela 4.5.

**Tabela 4.5:** Distribuição de massa molar para o AH (com relação ao percentual em área do fracionamento referente ao pico cromatográfico do AH visualizado por CLAE) da amostra inicial de AH após três precipitações em EtOH e ressuspensões em NaCl 0,15M.

---

<b>Distribuição de Massa Molar para o AH na Amostra Inicial</b>					
	<b>10<sup>3</sup> Da</b>	<b>10<sup>4</sup> Da</b>	<b>10<sup>5</sup> Da</b>	<b>10<sup>6</sup> Da</b>	<b>&gt; 10<sup>6</sup> Da</b>
<b>Quantidade de AH em área percentual (%)</b>	5	11	51	31	2

---

#### **4.4.1. Ensaio utilizando Coluna empacotada com Resina de Troca Iônica ligada a uma Coluna com Gel de Exclusão por Tamanho**

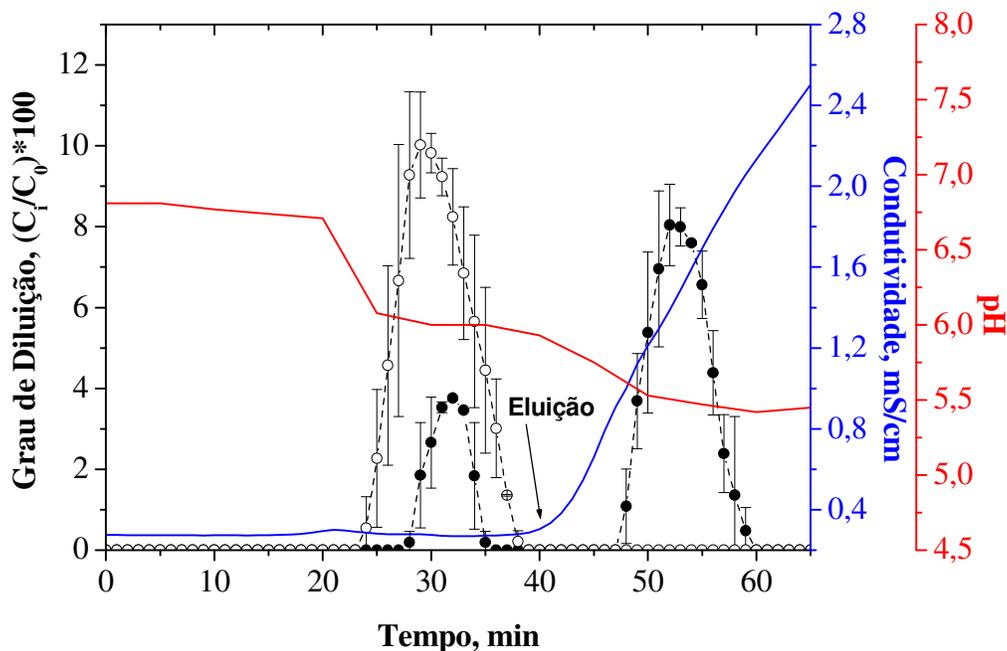
A inserção de uma coluna de troca iônica acoplada e anterior à coluna de exclusão por tamanho surgiu como possível ferramenta para a eliminação dos contaminantes protéicos da amostra de AH. A idéia nasceu baseada em estudos realizados em diversos trabalhos disponíveis na literatura envolvendo a purificação de proteínas por cromatografia de troca iônica (NEBINGER, 1985; STEKOLNIKOV e KORNILOVA, 1997;. LAGO et al., 2005). No entanto, como a carga residual da proteína em questão é, até então desconhecida, realizaram-se testes com resinas de troca aniônica e catiônica. Os resultados obtidos mostraram-se interessantes e serão visualizados e debatidos nos tópicos a seguir.

##### **4.4.1.1. Coluna empacotada com Resina de Troca Aniônica ligada a uma Coluna com Gel de Exclusão por Tamanho**

A opção pela resina aniônica veio do fato que o AH, quando em solução salina, é encontrado na forma de hialuronato de sódio, com carga residual negativa, o que implica na retenção do AH quando na utilização de uma resina de troca aniônica, como no caso em questão. De posse dessa informação, acoplou-se uma coluna empacotada com a resina Q-Sepharose Fast-Flow, forte trocadora aniônica, em série e anterior a uma coluna preparativa empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR. O ensaio experimental ocorreu sob as seguintes condições cromatográficas: vazão de 1,5 mL/min, solução de NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel, temperatura ambiente e volume de injeção de 1,5 mL de amostra de AH contendo uma concentração inicial de AH de 0,57 mg/mL e de proteínas de 0,21 mg/mL. Para a eluição do componente retido na coluna utilizou-se uma solução de NaCl 1,0 M no modo gradiente de eluição (0 a 100%). Ao longo de toda corrida cromatográfica, realizada em triplicata, coletaram-se alíquotas de 1,5 mL a cada minuto à saída do detector de UV no comprimento de onda de 280 nm para posterior análise da concentração de AH e contaminantes protéicos, as quais deram origem ao gráfico do grau de diluição, com seus respectivos desvios, condutividade e pH *versus* o tempo de corrida, ilustrado na Figura 4.7.

O cálculo do percentual de diluição relaciona a concentração do composto na alíquota coletada com a concentração inicial do referido composto, conforme Equação 4.4.

$$(\%) \text{ Grau de Diluição}_x = \left( \frac{C_{\text{aliquota}_x}}{C_{\text{inicial}_x}} \right) \cdot 100 \quad (4.4)$$



**Figura 4.7:** Perfil do grau de diluição médio do AH (●) e dos contaminantes protéicos (○), bem como o comportamento da Condutividade (—) e do pH (—) ao longo da corrida cromatográfica, *versus* o tempo, obtidos no ensaio de separação da amostra de AH, após três precipitações em etanol e ressuspensões em NaCl 0,15M, utilizando uma coluna empacotada com a resina aniônica Q-Sepharose Fast-Flow, em série, a uma coluna preparativa com o gel Sephacryl S-300 HR, numa vazão de 1,5 mL/min, NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel, NaCl 1,0 M para eluição do componente retido no modo gradiente, volume de injeção de 1,5 mL e temperatura ambiente.

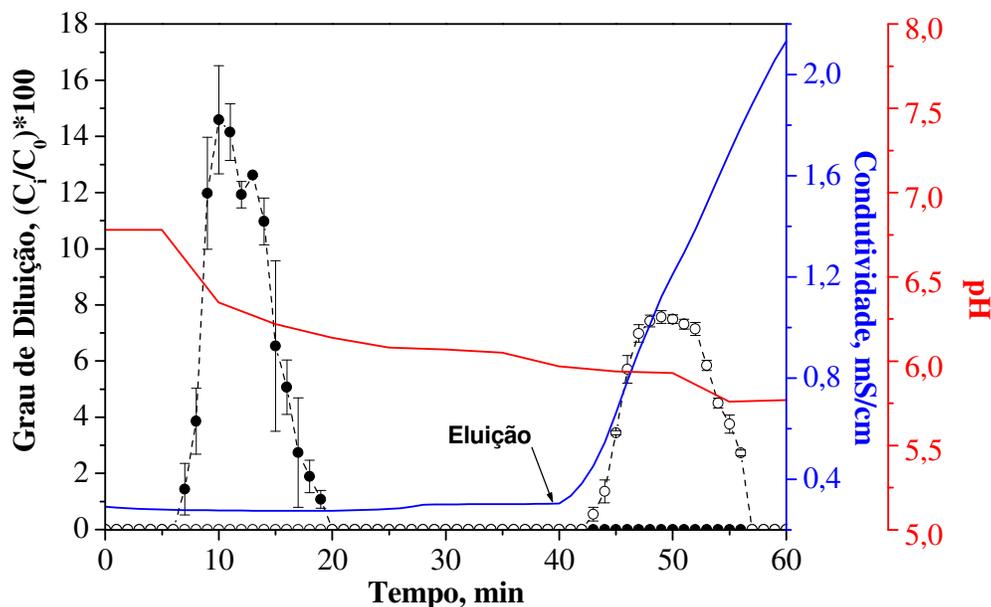
Observa-se através da Figura 4.7 que o uso de uma coluna de troca aniônica não se mostrou eficiente para a eliminação dos contaminantes protéicos das amostras, o que pode ser observado pela eluição conjunta do AH e dos contaminantes protéicos no intervalo entre 20 e 40 minutos. O perfil observado na Figura 4.7 também ilustra a etapa de eluição do componente retido na coluna, no caso o AH, mudando-se a fase móvel para NaCl 1,0 M em gradiente de eluição de 0 a 100 % para total eluição do componente retido. O emprego da coluna de troca aniônica apresentou a capacidade de retenção do AH, detentor de carga residual negativa, eliminando-o somente quando saturada, em torno de 30 minutos. Percebe-se também que os contaminantes protéicos, presentes nas amostras de AH, devem apresentar carga residual positiva, uma vez que não sofreram influência no grau de diluição frente à coluna de troca aniônica. O percentual do AH retido na coluna aniônica durante o ensaio de separação, calculado através da relação entre a massa de AH eluída pela massa de AH injetada, foi de 50,84%, apresentando uma perda considerável de amostra, no entanto com uma pureza em torno de 97,19%, calculada conforme a Equação 4.5.

$$(\%)Pureza_{AH} = \left( \frac{Massa_{AH}}{(Massa_{AH+Pr\ oteínas})} \right) \cdot 100 \quad (4.5)$$

#### 4.4.1.2. Coluna empacotada com Resina de Troca Catiônica ligada a uma Coluna com Gel de Exclusão por Tamanho

Com base nos resultados obtidos com o uso da resina aniônica, optou-se pelo uso de uma resina catiônica com o intuito de eliminar os contaminantes protéicos da amostra de AH. Assim, realizou-se um ensaio de separação alocando uma coluna empacotada com a resina SP-Sepharose Fast-Flow, forte trocadora catiônica em série e anterior a uma coluna preparativa empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR. O respectivo ensaio ocorreu sob as mesmas condições cromatográficas utilizadas no experimento citado anteriormente no tópico 4.4.1.1. A concentração inicial da amostra de alimentação é de 0,57 mg/mL para o AH e de 0,21 mg/mL para as proteínas. Para a eluição do componente retido na coluna utilizou-se uma solução de NaCl 1,0 M no modo gradiente de eluição (0 a 100 %).

Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas a cada minuto durante toda corrida cromatográfica, realizada em triplicata, à saída do detector de UV no comprimento de onda de 280 nm para posterior análise da concentração de AH e contaminantes protéicos, as quais serviram para a construção do gráfico do percentual de diluição, com seus respectivos desvios, calculado pela Equação 4.4, condutividade e pH *versus* o tempo de corrida, ilustrado na Figura 4.8.



**Figura 4.8:** Perfil do grau de diluição médio do AH (●) e dos contaminantes protéicos (○), bem como o comportamento da Condutividade (—) e do pH (—) ao longo da corrida cromatográfica, *versus* o tempo, obtidos no ensaio de separação da amostra de AH, após três precipitações em etanol e ressuspensões em NaCl 0,15M, utilizando uma coluna empacotada com a resina catiônica SP-Sepharose Fast-Flow, em série, a uma coluna preparativa com o gel Sephacryl S-300 HR, numa vazão de 1,5 mL/min, NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel, NaCl 1,0 M para eluição do componente retido no modo gradiente, volume de injeção de 1,5 mL e temperatura ambiente.

Percebe-se na Figura 4.8 que o uso da coluna de troca catiônica, antes da coluna de exclusão por tamanho, mostrou-se eficiente no tocante à eliminação dos contaminantes

protéicos das amostras de AH. Isto pode ser elucidado pela eluição do AH nitidamente separado das proteínas, que só vieram a eluir da coluna após a inserção de NaCl 1,0 M em gradiente de eluição de 0 a 100 %. O AH foi eluído com um percentual de rendimento 99,47 % apresentando um teor de pureza de 98,97 %, conforme a Equação 4.5. A coluna de troca catiônica apresentou-se capaz de reter os contaminantes protéicos que, ao que tudo indica, são detentores de carga residual positiva, sendo eliminados após o tempo de 40 minutos com a inserção de NaCl 1,0 M no modo gradiente de eluição. Verifica-se também que não houve perda mássica considerável de AH durante o ensaio, uma vez que o percentual de rendimento de eluição foi de 99,47 %.

Baseando-se nos resultados expostos nos tópicos 4.4.1.1 e 4.4.1.2, optou-se dar seguimento aos experimentos utilizando apenas a coluna de exclusão por tamanho; uma vez que a inserção da coluna de troca iônica acoplada antes da exclusão por tamanho exige as etapas de dessorção e regeneração da coluna, dificultando o uso em um sistema contínuo, que vem a ser o foco do trabalho.

#### **4.4.2. Ensaio utilizando Coluna empacotada com Gel de Exclusão por Tamanho**

Um volume de 1,5 mL de amostra de AH com uma concentração inicial de 1,10 mg/mL para o AH e de 0,39 mg/mL para as proteínas, foi inserida na coluna preparativa empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR à uma vazão de 1,5 mL/min de solução de NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel. Durante toda a corrida cromatográfica realizaram-se coletas de alíquotas de 1,5 mL à saída da coluna, a cada minuto, iniciando após a injeção da amostra. Cada alíquota foi, posteriormente, analisada em CLAE com coluna analítica Phenomenex PolySep GPC 6000, utilizando-se os detectores IR e UV-Vis em 280 nm nas seguintes condições cromatográficas: solução de 0,1 M de NaNO<sub>3</sub> pH 7,0 como fase móvel, temperatura ambiente, vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL. O mesmo ensaio foi realizado, em batelada, para as colunas XK 16/20, XK 16/40 e XK 50/30, reservando-se os devidos cuidados quanto à vazão de trabalho, a fim de manter-se a mesma velocidade superficial, e o volume de injeção da amostra, calculados a partir das Equações

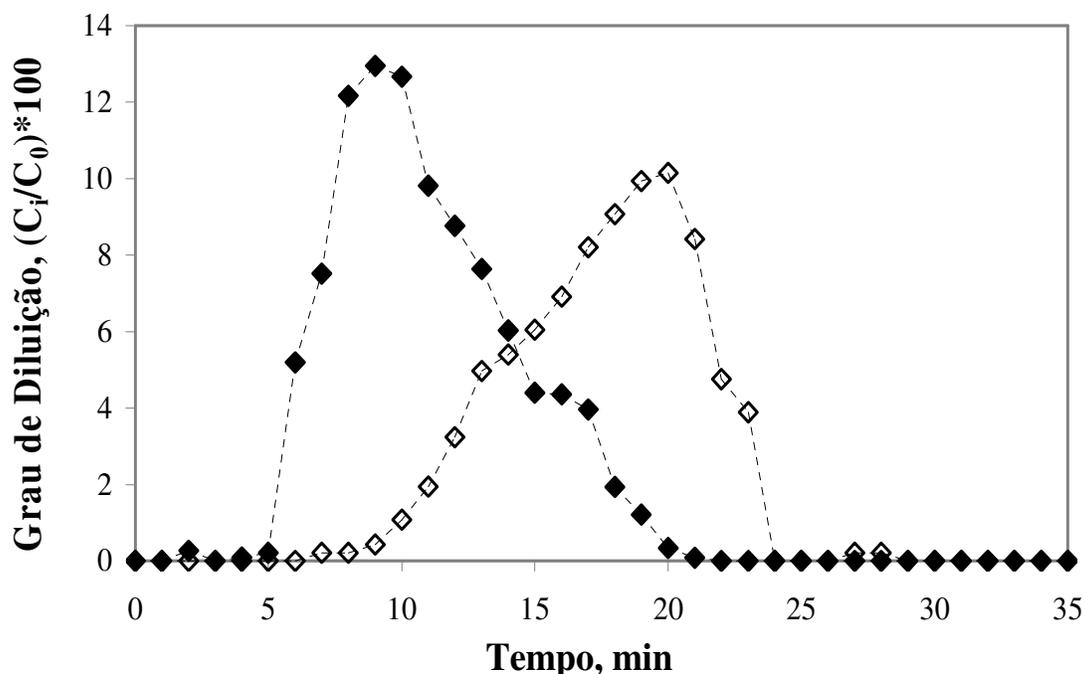
2.3 e 2.2, respectivamente. A Tabela 4.6 apresenta alguns parâmetros utilizados no ensaio em batelada para as diferentes colunas preparativas empacotadas com o gel Sephacryl S-300HR.

**Tabela 4.6:** Alguns parâmetros experimentais obtidos para as colunas preparativas XK 16/20, XK 16/40 e XK 50/30 empacotadas com o gel Sephacryl S-300 HR, utilizados no ensaio em batelada.

Coluna	Altura do Leito (cm)	Massa de Gel (g)	Volume de Injeção (mL)	Vazão (mL/min)	Concentração Inicial de AH (mg/mL)	Concentração Inicial de Proteínas (mg/mL)
XK 16/20	13	26,26	1,5	1,5	1,10	0,39
XK 16/40	29	58,60	3,0	1,5	1,10	0,39
XK 50/30	25	493,32	30	15	2,01	0,72

#### 4.4.2.1. Coluna XK 16/20 empacotada com gel Sephacryl S-300

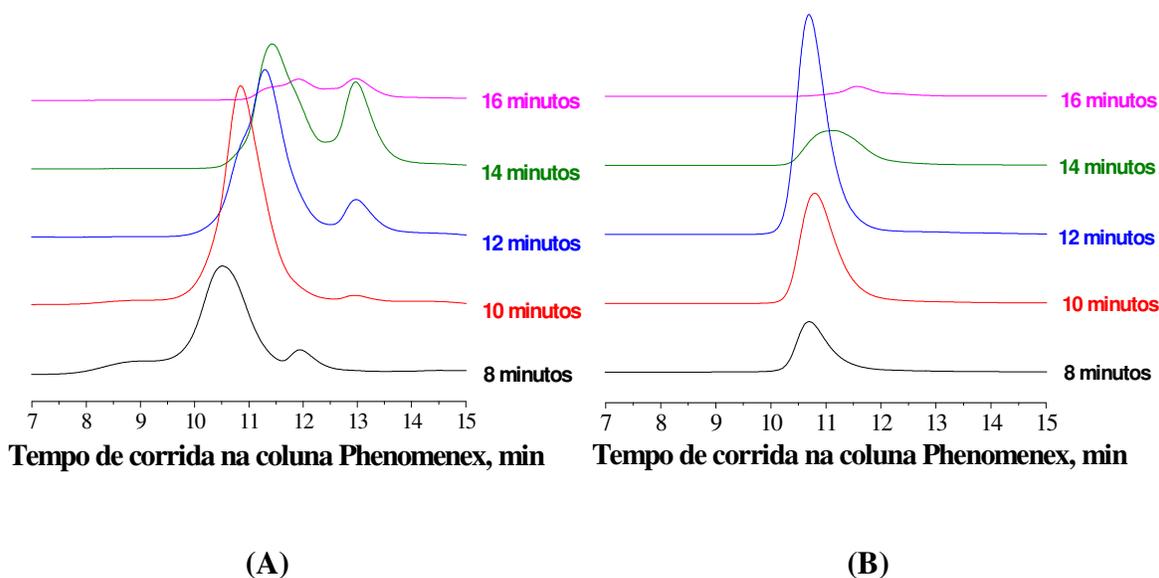
O ensaio de separação da amostra de AH, com uma concentração inicial de 1,10 mg/mL para o AH e de 0,39 mg/mL para as proteínas, foi realizado na coluna XK 16/20 empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, no modo batelada, sob as condições mencionadas no tópico 4.4.2 e Tabela 4.6. Os pontos experimentais obtidos estão ilustrados na Figura 4.9 e foram plotados considerando o grau de diluição de cada composto em cada minuto, conforme a Equação 4.4.



**Figura 4.9:** Perfil cromatográfico do ensaio de separação, em batelada, de AH após três precipitações com Etanol e ressuspensões em NaCl 0,15 M, na coluna XK 16/20 empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, nas seguintes condições experimentais: vazão de 1,5 mL/min, volume de injeção de 1,5 mL, temperatura ambiente e NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel. As alíquotas coletadas a cada minuto foram submetidas à análise para determinação da concentração de AH e proteínas, o que possibilitou o cálculo do grau de diluição de AH (◆) e proteínas (◇).

É possível observar, através da Figura 4.9, a eluição mútua entre o AH e as proteínas no intervalo entre 8 e 20 minutos da corrida cromatográfica. Assim sendo, estas mesmas alíquotas foram, também, submetidas à análise em CLAE com coluna analítica Phenomenex PolySep GPC 6000, para confirmação da co-eluição, o que pode ser visualizado na Figura 4.10 (A) que ilustra alguns dos cromatogramas em detector de índice de refração, o qual permite a detecção do AH, e a Figura 4.10 (B) que expõe os mesmos cromatogramas visualizados em detector UV-Vis em comprimento de onda de 280 nm que

é compatível com a detecção dos contaminantes protéicos, nas condições cromatográficas citadas no tópico 4.4.2.



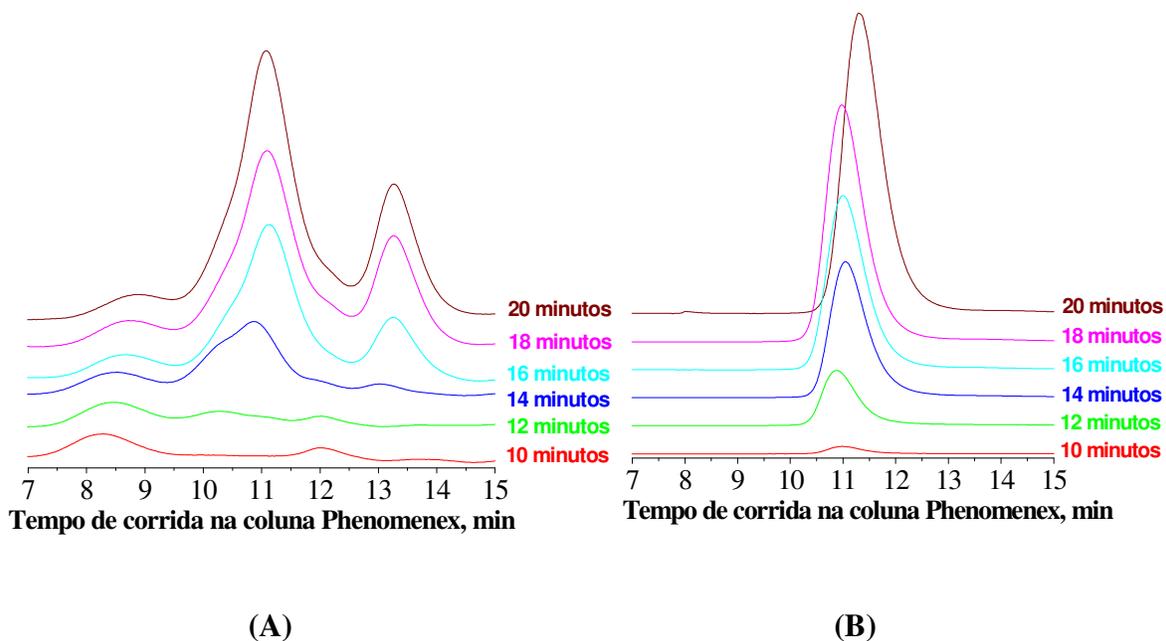
**Figura 4.10:** Cromatogramas das análises de algumas alíquotas coletadas, na saída da coluna XK 16/20 empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, durante a análise da amostra de AH após três precipitações com Etanol e ressuspensões em  $\text{NaNO}_3$  0,1 M, utilizando-se a coluna Phenomenex PolySep GPC 6000, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , temperatura ambiente,  $\text{NaNO}_3$  0,1 M pH 7,0 como fase móvel, (A) detector de índice de refração e (B) detector UV-Vis em comprimento de onda de 280 nm.

Observa-se na Figura 4.10 (A) que a amostra de AH apresentou distribuições de massas molares bem definidas, justificada pelos diferentes tempos de retenção, visualizados a partir da coleta em 8 minutos, confirmando que há uma variação na ordem de grandeza da massa molar de AH. As mesmas alíquotas, examinadas pelo detector UV-Vis em 280 nm, apresenta alguns picos cromatográficos no intervalo de tempo entre 10 e 12 minutos, também a partir da coleta realizada em 10 minutos, conforme a Figura 4.10 (B), o que comprova que os contaminantes protéicos co-eluem junto com o AH de massa molar

intermediária. Todavia, antes deste intervalo consegue-se obter uma pequena quantidade de AH de elevada massa molar, livre de contaminantes protéicos.

Ainda nesta coluna, XK 16/20, também foi avaliado outro gel de exclusão por tamanho, no caso Sephacryl S-500. Durante os ensaios, mantiveram-se constantes as condições experimentais utilizadas visando avaliar o comportamento do referido gel diante da amostra de AH contaminada. As concentrações iniciais para o AH e para as proteínas também foram as mesmas utilizadas no ensaio citado anteriormente: 1,10 mg/mL e 0,39 mg/mL, respectivamente. Assim, foram coletadas alíquotas de 1,5 mL a cada minuto no decorrer de todo o ensaio para posterior análise. A Figura 4.11 (A) ilustra alguns dos cromatogramas das alíquotas, coletadas a saída da coluna XK 16/20 preenchida com o gel Sephacryl S-500, realizadas em CLAE com coluna analítica Phenomenex PolySep GPC 6000 para o detector de índice de refração, e a Figura 4.11 (B) apresenta os mesmos cromatogramas no detector UV-Vis em 280 nm.

O perfil cromatográfico obtido na Figura 4.11 mostrou-se semelhante ao obtido com o gel Sephacryl S-300HR, conforme ilustrado na Figura 4.10. O gel empregado na Figura 4.11, Sephacryl S-500HR, também se mostrou eficiente no tocante ao fracionamento do AH. No entanto, apresentou-se pouco seletivo em relação à retenção protéica, dificultando a separação entre o AH e as proteínas, apresentando eluição mútua do AH e das proteínas em todas as frações coletadas ao longo da corrida. Isto pode ser explicado pela faixa de exclusão do respectivo gel Sephacryl S-500HR ( $4 \times 10^4$  a  $4 \times 10^7$  Da, avaliado com padrões de dextrana pelo fabricante GE Healthcare) que é maior que a do gel Sephacryl S-300HR ( $5 \times 10^3$  a  $1,5 \times 10^6$  Da, avaliado com padrões de proteínas pelo fabricante GE Healthcare), conforme WILLIAMS e HAGEL (1999), logo proteínas com massa molar da ordem de  $10^3$  Da eluem juntamente com as proteínas de massa molar da ordem de  $10^4$  Da e, conseqüentemente, eluíram também em conjunto com o AH de massa molar na ordem de  $10^4$  Da.

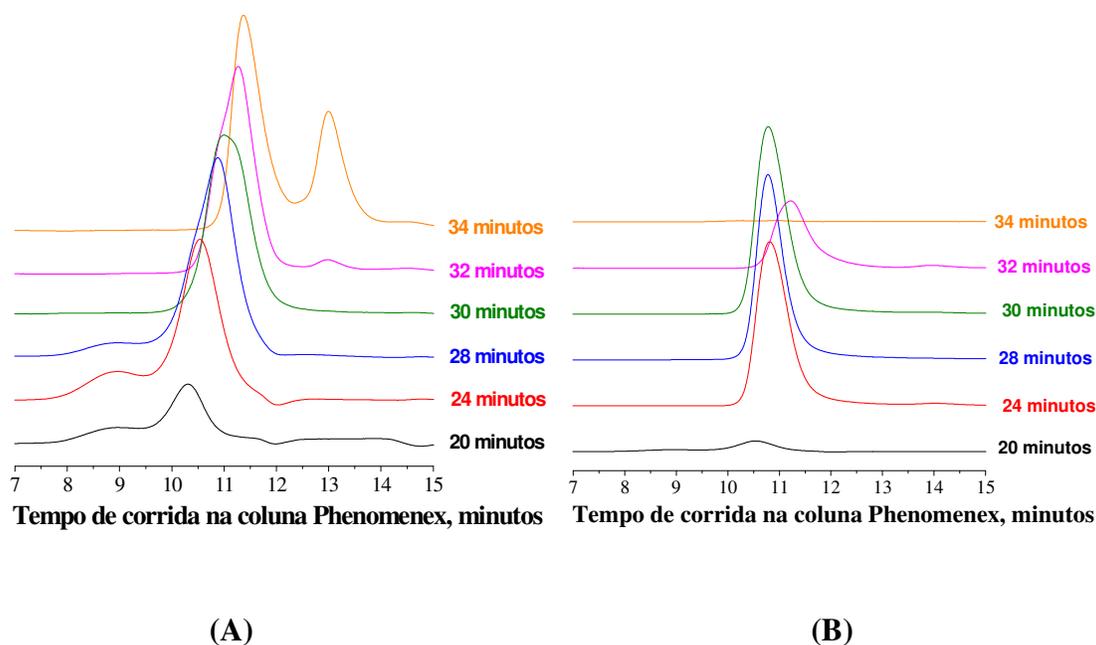


**Figura 4.11:** Cromatogramas das análises de algumas alíquotas coletadas, na saída da coluna XK 16/20 empacotada com o gel Sephacryl S-500 HR, durante a análise da amostra de AH após três precipitações com Etanol e ressuspensões em  $\text{NaNO}_3$  0,1 M, utilizando-se a coluna Phenomenex PolySep GPC 6000, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , temperatura ambiente,  $\text{NaNO}_3$  0,1 M pH 7,0 como fase móvel, (A) detector de índice de refração e (B) detector UV-Vis em comprimento de onda de 280 nm.

#### 4.4.2.2. Coluna XK 16/40 empacotada com gel Sephacryl S-300

Outra coluna, no caso XK 16/40, com altura de leito de 29 cm, maior que a anterior, foi avaliada com intuito de melhorar a separação do AH. A Figura 4.12 (A) ilustra alguns dos cromatogramas das análises das alíquotas realizadas em CLAE com coluna analítica Phenomenex PolySep GPC 6000 para o detector de índice de refração, e a Figura 4.12 (B) apresenta os mesmos cromatogramas no detector UV-Vis no comprimento de onda de 280 nm. Estas alíquotas foram coletadas no ensaio em batelada, na saída da coluna XK 16/40 empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, durante a análise da amostra de AH nas mesmas condições citadas anteriormente no Tópico 4.4.2, no entanto, respeitando o

aumento da altura do leito para este ensaio alguns parâmetros foram calculados e estão expostos na Tabela 4.6.



**Figura 4.12:** Cromatogramas das análises de algumas alíquotas coletadas, na saída da coluna XK 16/40 empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, durante a análise da amostra de AH após três precipitações com Etanol e ressuspensões em  $\text{NaNO}_3$  0,1 M, utilizando-se a coluna Phenomenex PolySep GPC 6000, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , temperatura ambiente,  $\text{NaNO}_3$  0,1 M pH 7,0 como fase móvel, (A) detector de índice de refração e (B) detector UV-Vis em  $\lambda = 280$  nm.

Observa-se na Figura 4.12 (A) que a amostra de AH analisada também apresentou uma distribuição de sua massa molar confirmada pelos diferentes tempos de retenção dos picos cromatográficos, perceptíveis a partir da coleta em 20 minutos. Já na Figura 4.12 (B), também foram observados a presença de alguns picos cromatográficos referentes aos contaminantes protéicos, coeluinto com o AH de média e baixa massa molar, porém antes deste intervalo de tempo é possível obter AH de massa molar elevada, livre destes contaminantes. Constata-se, no entanto, que o comportamento mostrou-se semelhante ao

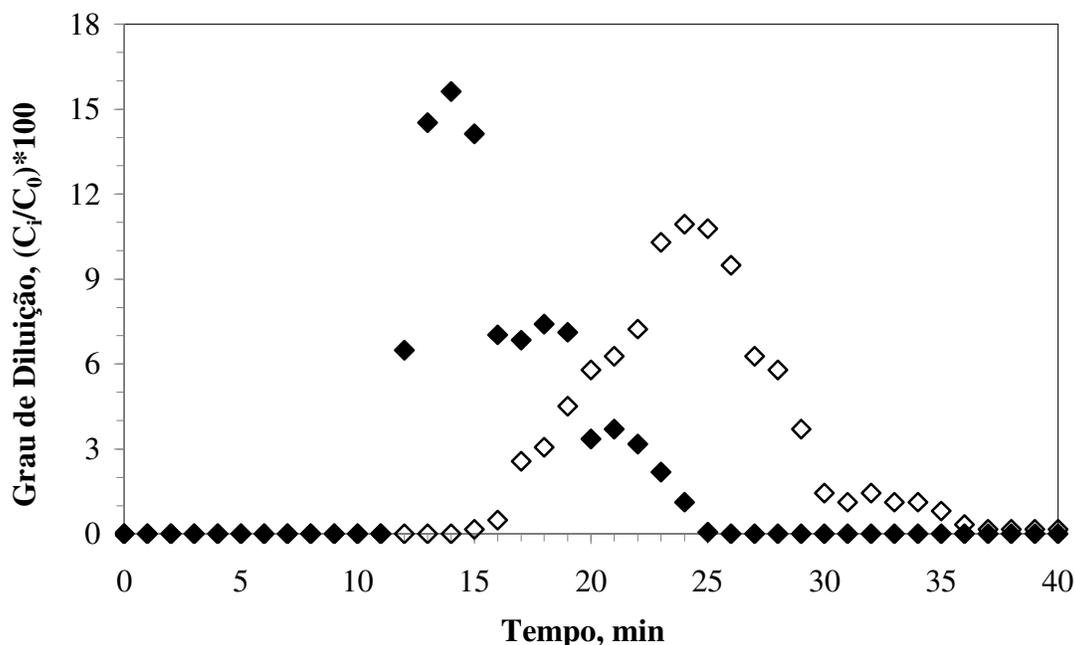
obtido na coluna XK 16/20, mesmo utilizando uma coluna com o dobro do comprimento da coluna utilizada na Figura 4.10.

Diante do exposto, optou-se por prosseguir os experimentos utilizando duas colunas XK 16/20 com igual altura de leito, ao invés de uma XK 16/40, em um sistema semicontínuo com REE, com o intuito de aprimorar o processo de separação do AH. O gel selecionado para as etapas futuras foi o gel Sephacryl S-300HR por apresentar melhor desempenho na separação do AH, conforme descrito no tópico 4.4.2.1 deste capítulo.

#### **4.4.2.3. Coluna XK 50/30 empacotada com gel Sephacryl S-300**

Avaliou-se, também, a coluna XK 50/30 quanto ao desempenho na separação do AH. A referida coluna foi empacotada com um leito de gel Sephacryl S-300 HR atingindo uma altura de leito de 25 cm. O experimento se deu inserindo um volume de injeção de 30 mL, o qual foi calculado a partir da Equação 2.4 e compatível com o volume da coluna, de amostra de AH com uma concentração inicial de 2,01 mg/mL para o AH e de 0,72 mg/mL para as proteínas. Em seguida, a amostra foi eluída com a fase móvel  $\text{NaNO}_3$  0,1 M pH 7,0 a uma vazão de 15 mL/min, calculada conforme a Equação 2.5, mantendo-se a mesma velocidade superficial conseguida com o uso da coluna XK 16/20. A Figura 4.13 apresenta os dados de grau de diluição em relação ao AH e aos contaminantes protéicos adquiridos a partir da determinação da concentração na entrada e na saída de ambos, com base nos métodos experimentais descritos no tópico 3.2.7 e 3.2.9, respectivamente.

O perfil alcançado na Figura 4.13 se mostra semelhante ao perfil obtido com a coluna XK 16/20, empacotada com o próprio gel em questão. Isto indicia que o escalonamento para este processo é possível e, comprovadamente, reprodutivo em relação ao gel Sephacryl S-300 HR, uma vez que ao variarem as dimensões da coluna, o comportamento dos percentuais mássicos obtidos, para ambos os compostos detectados, mantiveram-se semelhantes.

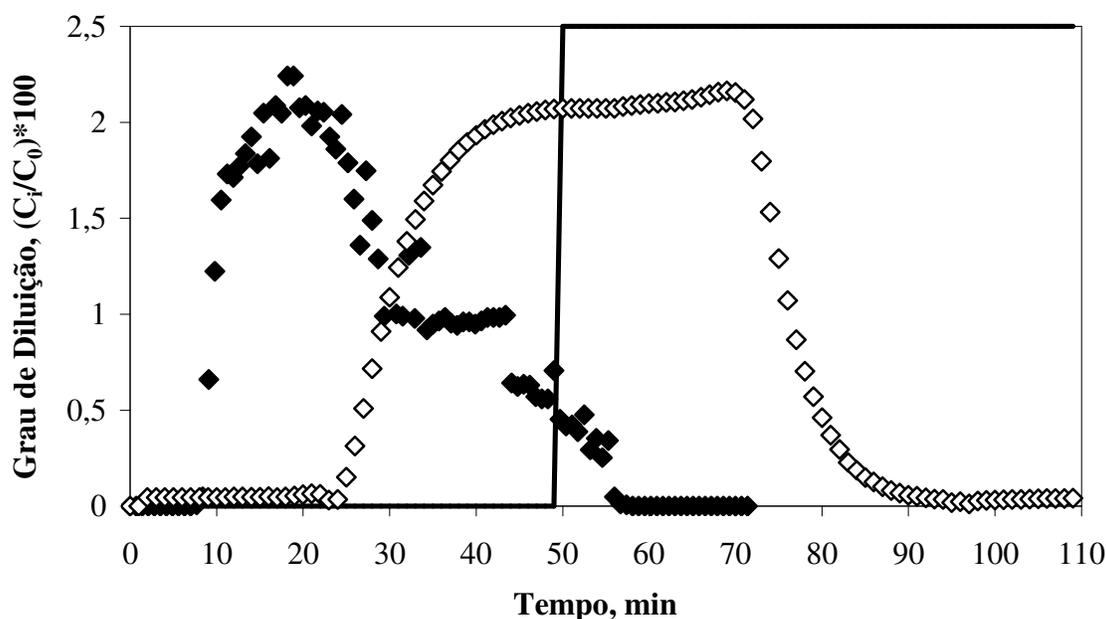


**Figura 4.13:** Cromatogramas do ensaio de separação de AH após três precipitações com Etanol e ressuspensões em NaCl 0,15 M, na coluna XK 50/30 empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, nas seguintes condições experimentais: vazão de 15 mL/min, volume de injeção de 30 mL, temperatura ambiente e NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel. As alíquotas coletadas foram submetidas à análise para determinação da concentração de AH e proteínas, o que possibilitou o cálculo do grau de diluição de AH (♦) e proteínas (◇).

#### 4.4.3. Ensaio de Saturação do Leito de Exclusão por Tamanho

O ensaio de saturação do leito objetivou o cálculo da concentração mássica máxima suportada pelo gel de exclusão por tamanho, uma vez que este vem a ser um dado importante para o escalonamento do processo, futuramente. Para isso, tomou-se a coluna XK 16/20, escolhida para a continuação dos experimentos, empacotada com o gel Sephacryl S-300HR, também selecionado para o prosseguimento das etapas do presente trabalho.

O procedimento experimental ocorreu bombeando-se uma amostra de AH com uma concentração inicial de 0,10 mg/mL para o AH e de 0,045 mg/mL para as proteínas, na vazão de 1,5 mL/min, sendo acompanhado por um detector UV no comprimento de onda de 280nm, à saída da coluna, o qual permitiu a visualização da variação da concentração de proteínas através de um software computacional. A saturação foi observada a partir da formação de um nítido patamar de equilíbrio para a concentração de proteínas, quando, então, bombeou-se uma solução de NaNO<sub>3</sub> 0,1 M, até a eluição total da amostra remanescente no leito. As frações coletadas a cada minuto ao longo do ensaio de saturação do leito, ilustrado na Figura 4.14, serviram para a quantificação do AH e das proteínas, e posterior cálculo do percentual de diluição, relacionando a concentração de saída e a concentração de entrada para cada componente.



**Figura 4.14:** Perfil de saturação do leito de gel Sephacryl S-300HR na coluna XK 16/20 utilizando uma amostra de AH após três precipitações com Etanol e ressuspensões em NaCl 0,15 M, nas seguintes condições experimentais: vazão de 1,5 mL/min, temperatura ambiente e NaNO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,0 como fase móvel. As alíquotas coletadas foram submetidas à análise para determinação da concentração de AH e proteínas, o que possibilitou o cálculo do grau de diluição de AH (◆) e das proteínas (◇).

As etapas de saturação e eluição para as proteínas, respectivamente, podem ser claramente visualizadas na Figura 4.14, como sendo os pontos antes e depois do traço vertical contínuo, em preto, que representa a entrada da fase móvel no sistema. Verifica-se que, para as proteínas, é perceptível o patamar de saturação formado; enquanto que para o AH, esse patamar não é observado. O comportamento para o AH é diferente do esperado, uma vez que deveria tender a um valor constante e semelhante a concentração da alimentação, no entanto, pode ser entendido do seguinte modo: as proteínas apresentam-se acumuladas dentro da coluna por possuírem uma menor massa molar, saturando-a e eluindo apenas com a inserção da fase móvel; já o AH não se mostra acumulado na coluna, limitando-se apenas a porosidade do leito e eluindo antes do bombeamento da fase móvel. Verifica-se, também, que a concentração de AH, averiguada através do método turbidimétrico CTAB, atinge um valor máximo em torno de 2,5% no tempo de 20 minutos, mostrando-se decrescente a partir deste tempo. Vale ressaltar que, até então, não foram encontrados na literatura trabalhos que apresentasse algum experimento semelhante a este para fins de comparação e melhor embasamento para discussão do comportamento inusitado do AH.

#### **4.5. Ensaio de Separação do Ácido Hialurônico no Sistema de Reciclo Externo Estacionário**

O sistema de reciclo externo estacionário (REE) é composto por duas colunas, com dimensões semelhantes, três válvulas de direcionamento de fluxo, uma bomba, um coletor de frações, um detector e um computador para aquisição de dados, conforme ilustrado na Figura 3.5. O funcionamento deste sistema possibilita a variação da vazão nas colunas ao longo da corrida cromatográfica, sem prejudicar a separação, uma vez que as frações de interesse são eluídas e coletadas no início e no final do perfil cromatográfico, nomeadas como fração A, rica em AH, e fração B, rica em proteínas.

Durante a operação do sistema REE, a formação do perfil cromatográfico revela uma coeluição, referente à mistura de AH e proteínas, nomeadas de R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>. Estas frações são direcionadas para a coluna seguinte, e assim são eluídas em um novo ciclo, junto com uma nova injeção de amostra, enriquecendo e retardando a separação das respectivas frações.

Os resultados obtidos, em batelada, com a coluna XK 16/20 empacotada com o gel Sephacryl S-300 HR, serviram como base para o estabelecimento das condições a serem utilizadas nos ciclos processuais do sistema REE. Nestes resultados, verificou-se que com a vazão de 1,5 mL/min, um volume de 1,5 mL de amostra de AH oriunda da etapa de pré-purificação seria, completamente, eluído em até 15 minutos, apresentando um cromatograma equivalente ao representado pela Figura 3.7. A Tabela 4.7 expõe as condições operacionais averiguadas nos experimentos.

**Tabela 4.7:** Condições operacionais estudadas durante os ensaios no sistema REE.

<b>Ensaio</b>	<b>Volume de Injeção (mL)</b>	<b>Tempo total de 1 Ciclo (min)</b>	<b>Volume das Frações Recirculadas R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> (mL)</b>	<b>Concentração inicial de AH (mg/mL)</b>	<b>Concentração inicial de Proteínas (mg/mL)</b>
1	1,4	15	1,0 e 1,0	1,54	0,84
2			1,5 e 1,5	1,80	0,72
3			2,25 e 2,25	1,69	0,80
4			3,0 e 3,0	1,53	0,83

Na prática, o volume real de amostra injetada foi equivalente a 1,4 mL, o que corresponde a 5,3 % do volume da coluna que é de, aproximadamente, 26 mL. Esta diferença pode ser atribuída, principalmente, ao controle manual de direção do fluxo nas válvulas de reciclo pertencentes ao sistema. No entanto, segundo COLLINS et al. (2006), o volume de amostra deve ser de 1,0 a 5,0 % do volume da coluna, podendo ser aumentado

até 30 %, em separações de misturas de compostos. Enquanto que, de acordo com NÓBREGA (2004), o volume de injeção em colunas de exclusão por tamanho deve ser de 2,0 a 6,0 % do volume da coluna quando processados, respectivamente, de 0,5 a 5% do volume da coluna por hora.

Com base nos dados expostos na Tabela 4.7, verifica-se que os ensaios de separação foram realizados variando-se o volume das frações recirculadas  $R_1$  e  $R_2$ , além das concentrações iniciais do AH e das proteínas. Estas referidas frações exercem a função de manterem-se no sistema, retardando a separação da mistura entre AH e proteína, ao juntar-se em novos ciclos de eluição ao longo do processo.

A geração de ciclos subseqüentes, oriundos da recirculação das frações  $R_1$  e  $R_2$ , bem como da injeção de uma quantidade mássica constante de amostra, favorece o enriquecimento das frações de interesse A e B, com elevado teor de pureza, tendendo a ascensão da relação  $C_{final}/C_{inicial}$  de ambas as frações. Em termos percentuais, objetiva-se que esta relação alcance valores em torno de 100%, o que significa uma quantidade mássica eluída semelhante à alimentada no ciclo, anunciando a chegada ao estado estacionário.

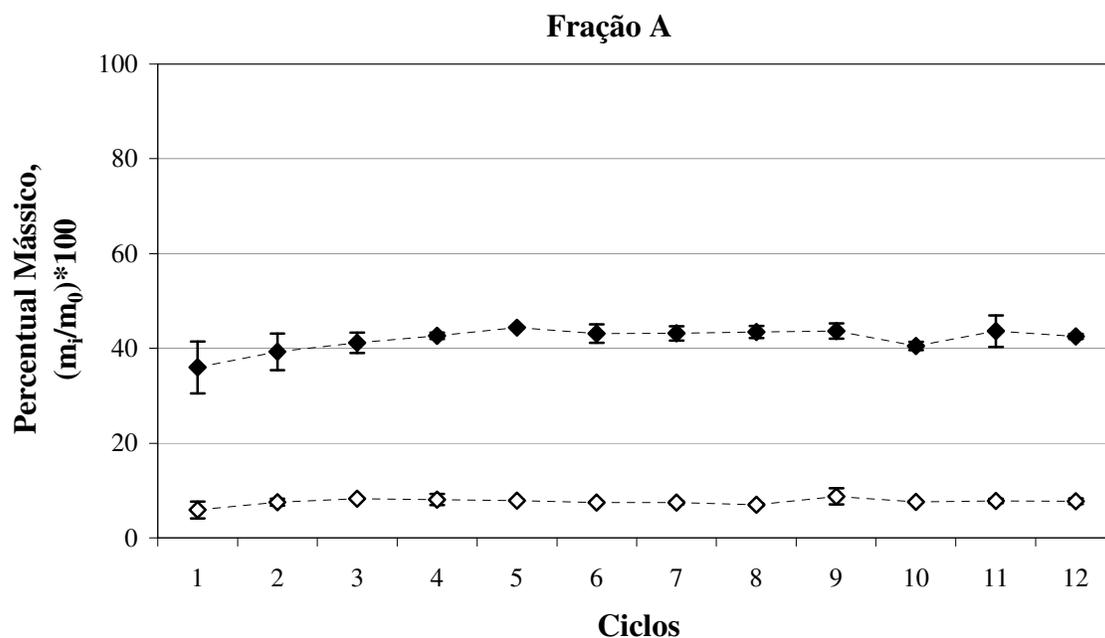
Os dados obtidos com a realização dos ensaios experimentais indicados na Tabela 4.7, foram expressos em gráficos, relacionando os ciclos *versus* percentual mássico, obtido tanto para o AH quanto para a proteína, conforme Equações 4.6 e 4.7, respectivamente. O cálculo do percentual mássico considera a relação entre a massa do composto coletada no final do ciclo com a massa do composto inserida no início do respectivo ciclo.

$$(\%)Mássico_{AH} = \left( \frac{C_{final_{AH}} \cdot V_{coletado}}{C_{inicial_{AH}} \cdot V_{injetado}} \right) \cdot 100 \quad (4.6)$$

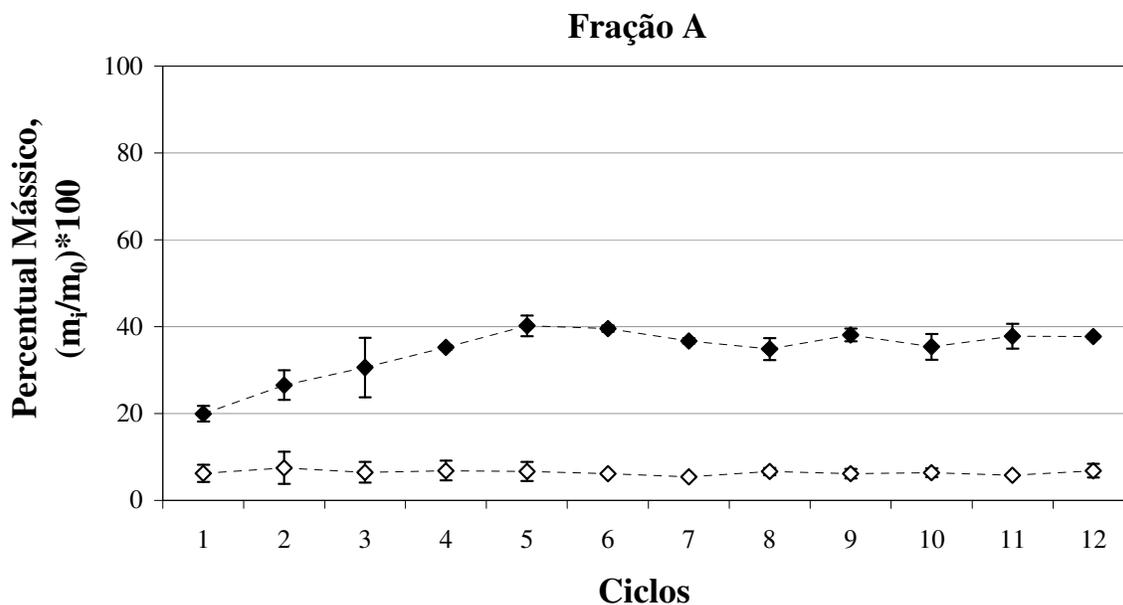
$$(\%)Mássico_{Proteínas} = \left( \frac{C_{final_{Proteínas}} \cdot V_{coletado}}{C_{inicial_{Proteínas}} \cdot V_{injetado}} \right) \cdot 100 \quad (4.7)$$

As Figuras 4.15, 4.16, 4.17 e 4.18 ilustram o perfil de rendimento para a primeira fração a ser eluída da coluna, a fração A, referente ao AH, em termos do número de ciclos

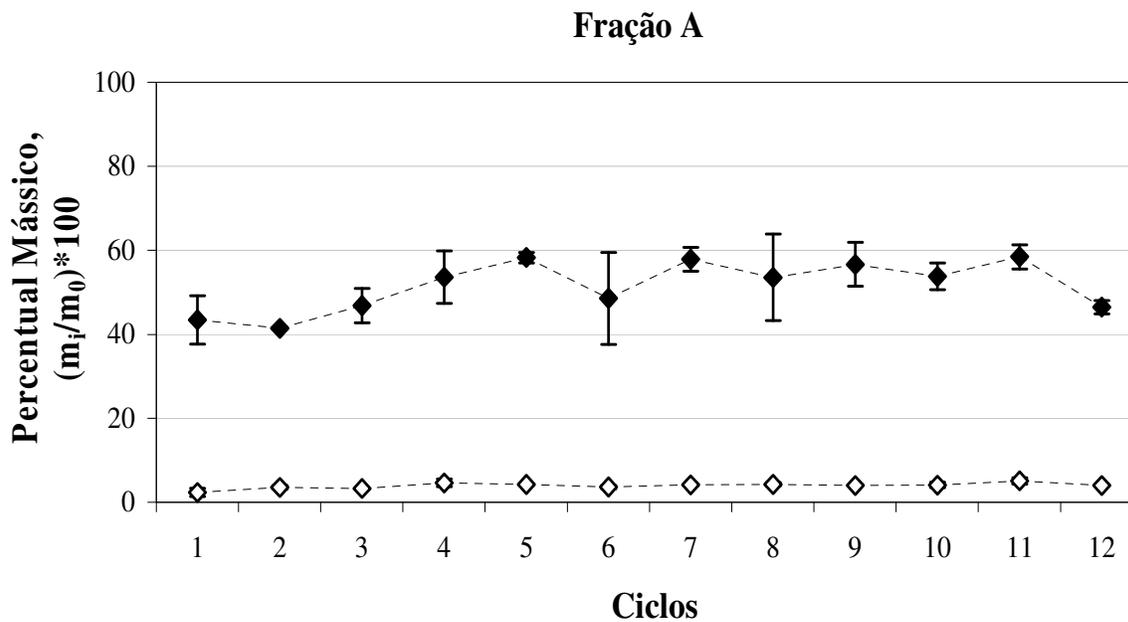
realizados, variando-se as frações de reciclo, conforme as condições operacionais apontadas na Tabela 4.7. É possível observar nas figuras abaixo que o estado estacionário é atingido em torno do 6º ciclo de processo.



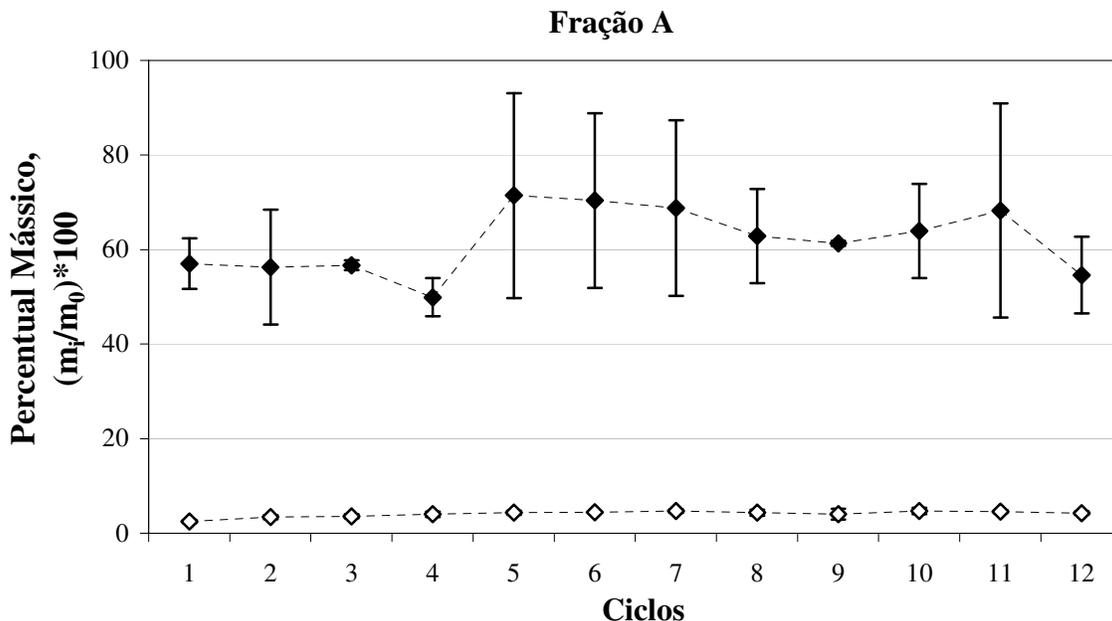
**Figura 4.15:** Perfil de rendimento obtido para o AH (◆) e as proteínas (◇) na fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 1,0 mL.



**Figura 4.16:** Perfil de rendimento obtido para o AH (♦) e as proteínas (◇) na fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 1,5 mL.



**Figura 4.17:** Perfil de rendimento obtido para o AH (♦) e as proteínas (◇) na fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 2,0 mL.

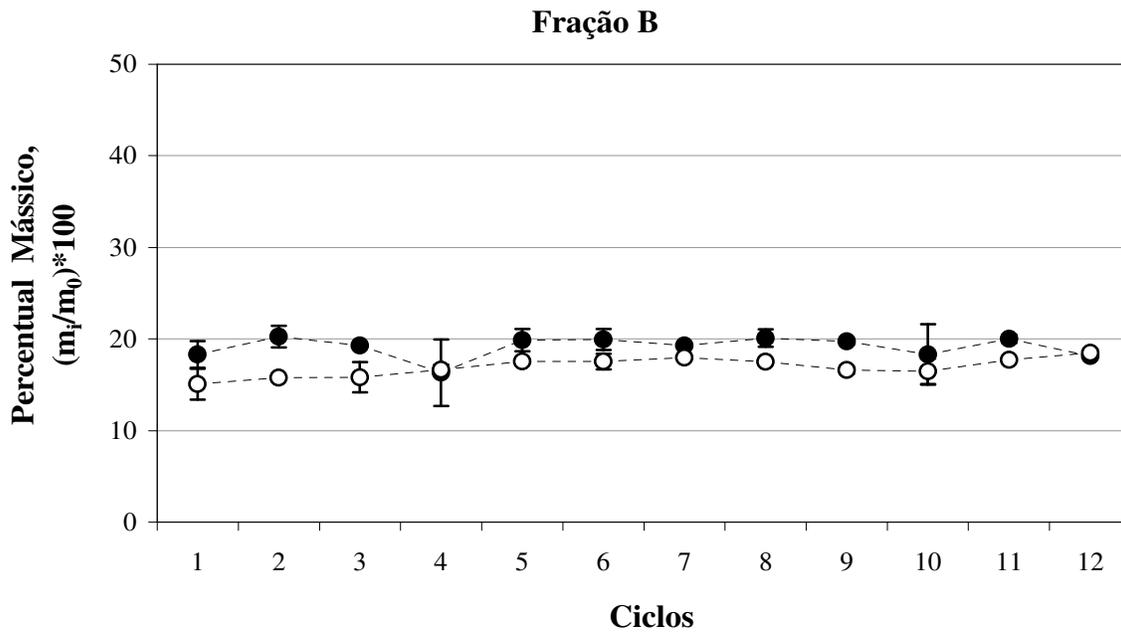


**Figura 4.18:** Perfil de rendimento obtido para o AH (◆) e as proteínas (◇) na fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 3,0 mL.

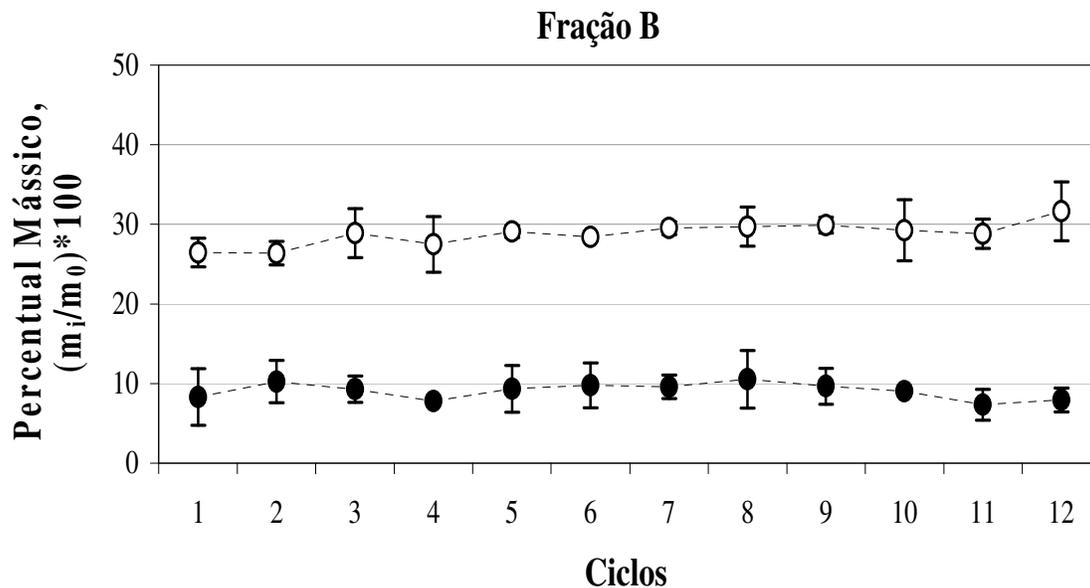
Verifica-se nas figuras anteriores que trabalhando com volumes de recirculação entre 1,0 a 3,0 mL, o percentual mássico médio atingido para o AH, na fração A, foi em torno de 50 %. Este percentual mostra-se crescente à medida em que se aumenta o volume de reciclo, chegando a atingir valores em torno de 70%, para o AH, considerando um volume de reciclo de 3,0 mL. No entanto, ainda na fração A, observa-se que o percentual mássico para as proteínas também se apresenta constante, por volta de 10%, variando-se o volume da fração de reciclo entre 1,0 e 3,0 mL. Observa-se também que trabalhando-se com volumes de reciclo maiores há uma maior variação do desvio padrão para as médias dos percentuais mássicos referentes ao AH, isto pode ser explicado pela elevada vazão empregada durante o reciclo requerendo maior velocidade e precisão no giro das válvulas de direção de fluxo durante o controle manual. Este problema deve ser sanado com o ensaio

sob o controle automático das válvulas, o qual será exibido ao longo da leitura deste capítulo.

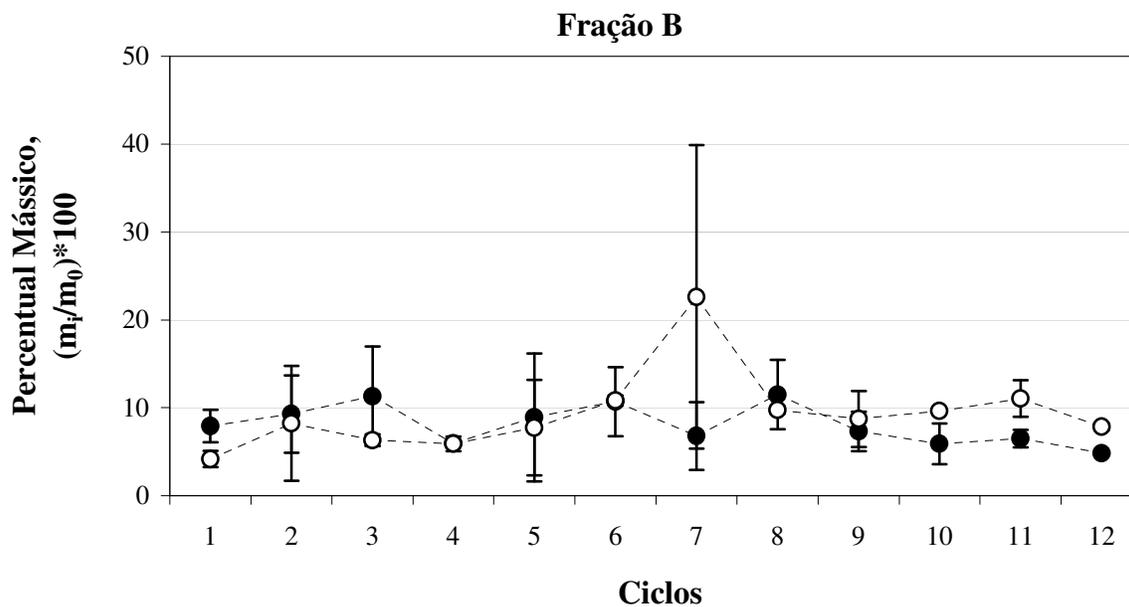
As Figuras 4.19, 4.20, 4.21 e 4.22 apresentam o perfil do rendimento para a segunda fração a ser eluída da coluna, a fração B, referente aos contaminantes protéicos, em termos do número de ciclos realizados, variando-se as frações de reciclo, conforme as condições operacionais apontadas na Tabela 4.7.



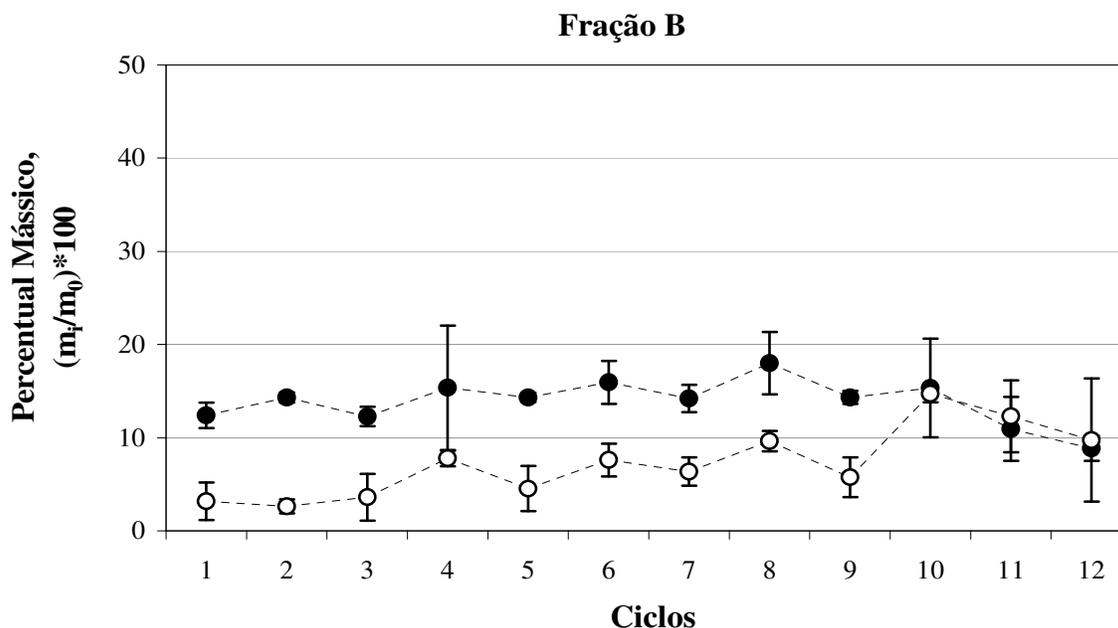
**Figura 4.19:** Perfil de rendimento obtido para as proteínas (○) e o AH (●) na fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 1,0 mL.



**Figura 4.20:** Perfil de rendimento obtido para as proteínas (○) e o AH (●) na fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> iguais a 1,5 mL.



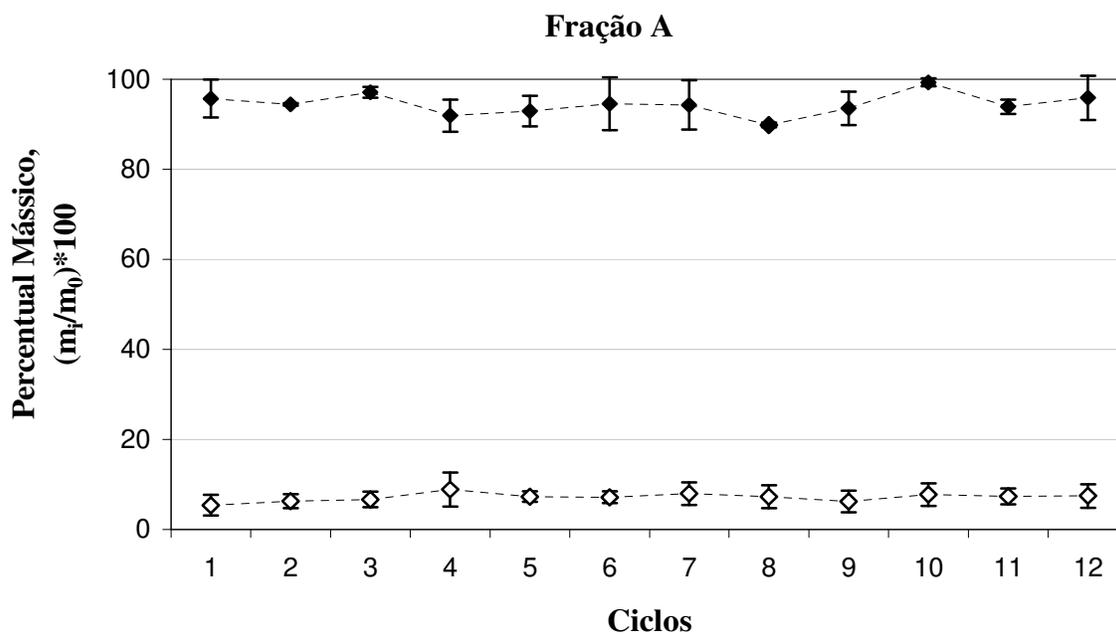
**Figura 4.21:** Perfil de rendimento obtido para as proteínas (○) e o AH (●) na fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> iguais a 2,25 mL.



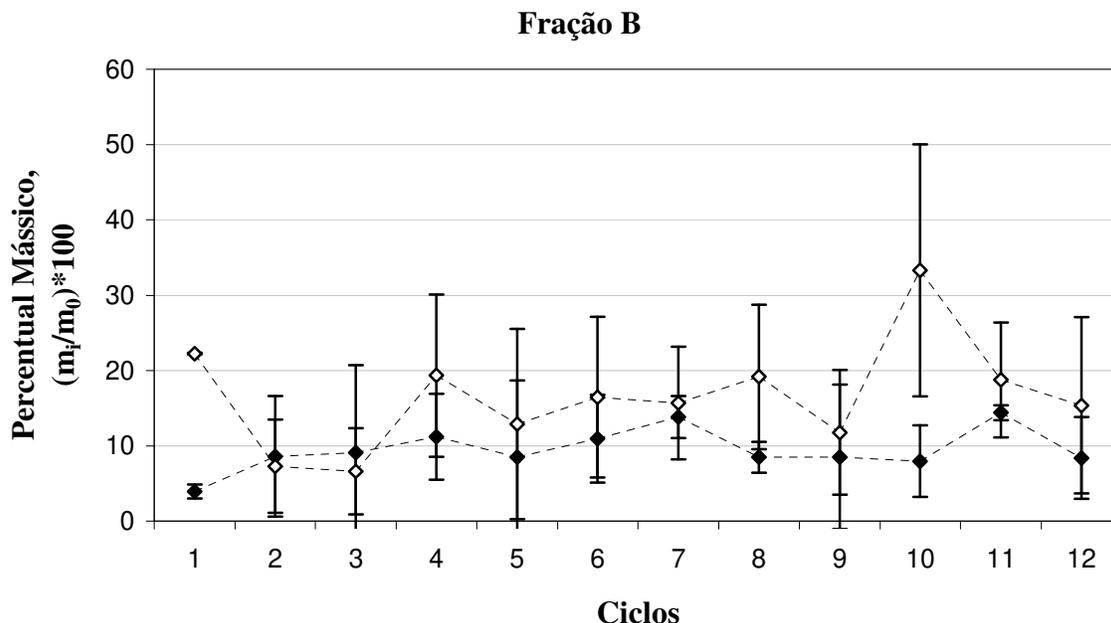
**Figura 4.22:** Perfil de rendimento obtido para as proteínas (○) e o AH (●) na fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 3,0 mL.

O melhor percentual mássico alcançado para as proteínas, na fração B, foi de 30%, trabalhando-se com um volume de reciclo de 1,5 mL, entretanto para esta mesma fração B o percentual mássico de AH foi em torno de 10%. Todavia, almejava-se um percentual mássico de proteínas na fração B, pelo menos, em torno de 70%, valor equivalente ao conseguido para o AH na fração A, o que não foi atingido, provavelmente, devido à vasta distribuição de massa molar do AH, ou talvez devido ao fato do controle manual das válvulas de mudança de fluxo. O interesse no aumento da concentração das proteínas na fração B vem como meta adicional ao trabalho, visando a caracterização das mesmas. Contudo, possibilitou-se a realização de outro experimento utilizando o controle automático das válvulas a fim de avaliar se seria isto um fator determinante para o problema encontrado. O referido experimento foi realizado utilizando apenas a fração de reciclo de 3,0 mL, preservando-se as demais condições experimentais. As concentrações iniciais para

o AH e para as proteínas estão expostas na Tabela 4.7. O perfil de rendimento obtido para a fração A, referente ao AH, e para a fração B, referentes às proteínas, em termos do número de ciclos realizados estão ilustrados nas Figuras 4.23 e 4.24, respectivamente.



**Figura 4.23:** Perfil de rendimento obtido para o AH (♦) e as proteínas (◇) na fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle automático de válvulas, considerando os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 3,0 mL.



**Figura 4.24:** Perfil de rendimento obtido para as proteínas ( $\circ$ ) e o AH ( $\bullet$ ) na fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle automático de válvulas, considerando os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 3,0 mL.

Comparando as Figuras 4.23 e 4.24, obtidas com o controle automático das válvulas, com as Figuras 4.18 e 4.22, respectivamente, obtidas com o controle manual das válvulas, percebe-se uma nítida melhoria atingida para a Fração A em termos de percentual mássico do AH. Trabalhando manualmente com as válvulas obteve-se um percentual mássico em torno de 60% para o AH, confirmado pela Figura 4.18; o mesmo experimento realizado com o controle automático de válvulas alcançou um percentual mássico de, aproximadamente, 95% para o AH, conforme ilustra a Figura 4.23, confirmando o melhor desempenho conseguido com a automação das válvulas. Já para as proteínas, Fração B, percebeu-se uma discreta melhora em que as proteínas apresentam-se ligeiramente mais concentradas que o AH, o que pode ser observado através da comparação das Figuras 4.22 e 4.24, obtidas com controle manual e automático das válvulas, respectivamente.

As frações A e B também foram avaliadas em relação ao teor de pureza apresentado por cada um dos compostos nas referidas frações de interesse. A pureza das frações coletadas, A e B, em cada ciclo, foi avaliada através de gráficos expressos em termos do percentual de pureza *versus* o número de ciclos realizados ao longo da corrida. O percentual de pureza para cada componente foi calculado, ao final dos ciclos, relacionando a massa de cada composto presente na referida fração e a massa total da mistura presente na respectiva fração, de acordo com as Equações 4.8 e 4.9.

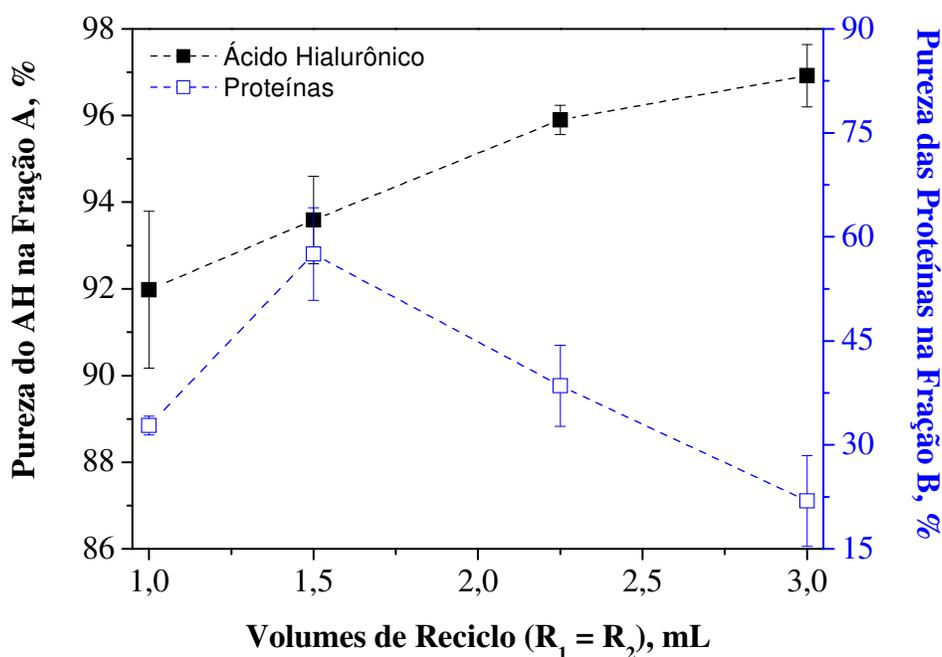
$$(\%)Pureza_{AH \text{ fração}} = \left( \frac{Massa_{AH \text{ fração}}}{(Massa_{AH} + Massa_{Pr \text{ proteínas}}) \text{ fração}} \right) \cdot 100 \quad (4.8)$$

$$(\%)Pureza_{Pr \text{ proteínas} \text{ fração}} = \left( \frac{Massa_{Pr \text{ proteínas} \text{ fração}}}{(Massa_{AH} + Massa_{Pr \text{ proteínas}}) \text{ fração}} \right) \cdot 100 \quad (4.9)$$

A Figura 4.25 apresenta o perfil dos valores médios de pureza e seus respectivos desvios padrão obtido para a fração A, que corresponde a fração rica em AH, e para a fração B, segunda fração a ser eluída da coluna, correspondente a fração rica em proteínas, frente aos diferentes volumes de reciclo ( $R_1$  e  $R_2$ ) trabalhados, conforme as condições operacionais apontadas na Tabela 4.7. Os percentuais médios de pureza para cada fração foram calculados considerando a pureza do referido componente conseguida em cada ciclo em termos do número de ciclos realizados ao longo do ensaio de separação, baseando-se nos perfis de rendimento das Figuras 4.15 a 4.18, ilustradas anteriormente, com as respectivas variações das frações de reciclo.

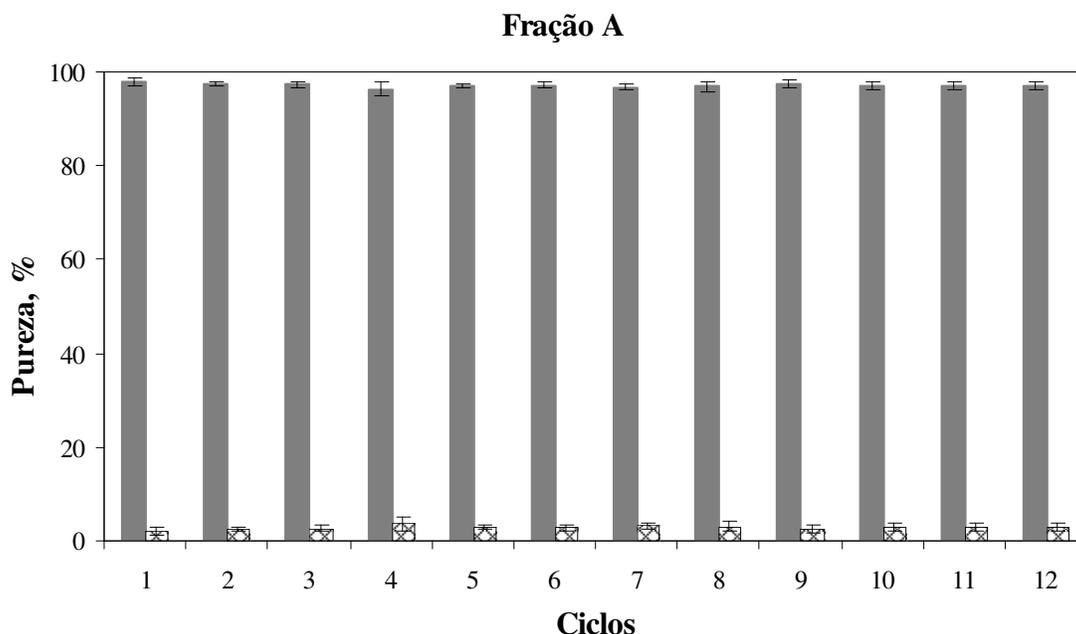
Verifica-se na Figura 4.25 que se obteve um percentual de pureza variando entre 92 a 97% para o AH, na fração A. Este percentual apresenta-se crescente à medida que se aumenta o volume de reciclo de 1,0 a 3,0 mL, chegando a atingir valores máximos de pureza em torno de 97% para o AH, trabalhando com um volume de reciclo de 3,0 mL. No entanto, na mesma fração A, as proteínas mostram-se presentes em pequenos percentuais variando de 3 a 8%. Ainda na Figura 4.25, percebe-se que o melhor percentual de pureza alcançado para as proteínas, na fração B, foi em torno de 60%, trabalhando-se com um volume de reciclo de 1,5 mL; entretanto esta fração apresenta-se contaminada pela presença

de AH em torno de 40 %. Aumentando o volume de reciclo para 3,0 mL, observa-se na fração B que o percentual de pureza das proteínas decresce consideravelmente, chegando a atingir um mínimo de 20%. Isto não condiz com o esperado, uma vez que a fração B deveria estar enriquecida com proteínas e não com AH. Estes dados nos confirmam que, para as proteínas, a pureza alcançada não foi satisfatória utilizando este processo de purificação, enquanto que para o AH, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios.

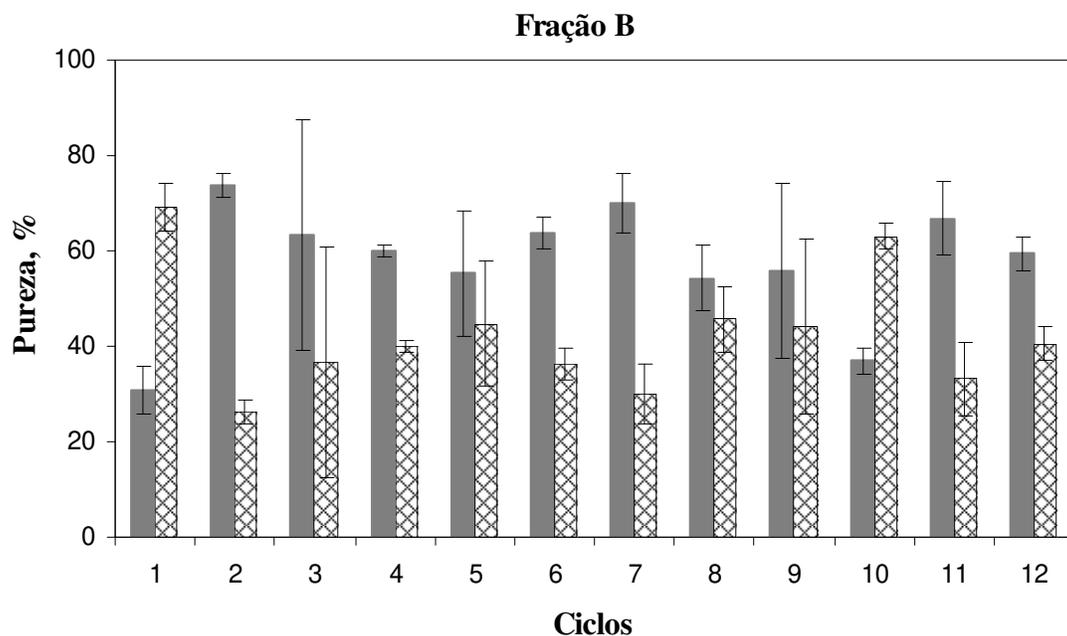


**Figura 4.25:** Comportamento da pureza média relativa apresentada pelo AH (■) na Fração A e pelas proteínas (□) na Fração B para os diferentes volumes de reciclo  $R_1 = R_2$  durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas.

Avaliou-se ainda o teor de pureza das frações A e B obtidas no experimento utilizando o controle automático das válvulas, trabalhando-se com a fração de reciclo de 3,0 mL, preservando-se as demais condições experimentais, bem como as concentrações iniciais para o AH e para as proteínas, conforme a Tabela 4.7. O percentual de pureza obtido para o AH, na fração A, e para as proteínas, na fração B, em termos do número de ciclos realizados estão expostos nas Figuras 4.26 e 4.27, respectivamente.

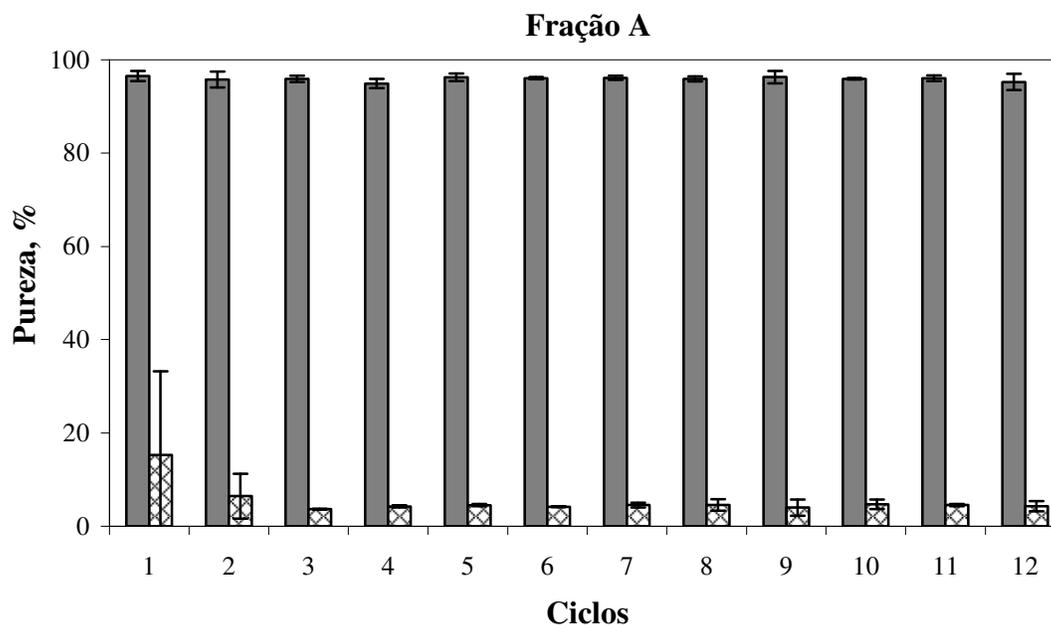


**Figura 4.26:** Pureza relativa do AH (■) e das proteínas (▣) obtida para a fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle automático de válvulas, considerando os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 3,0 mL.

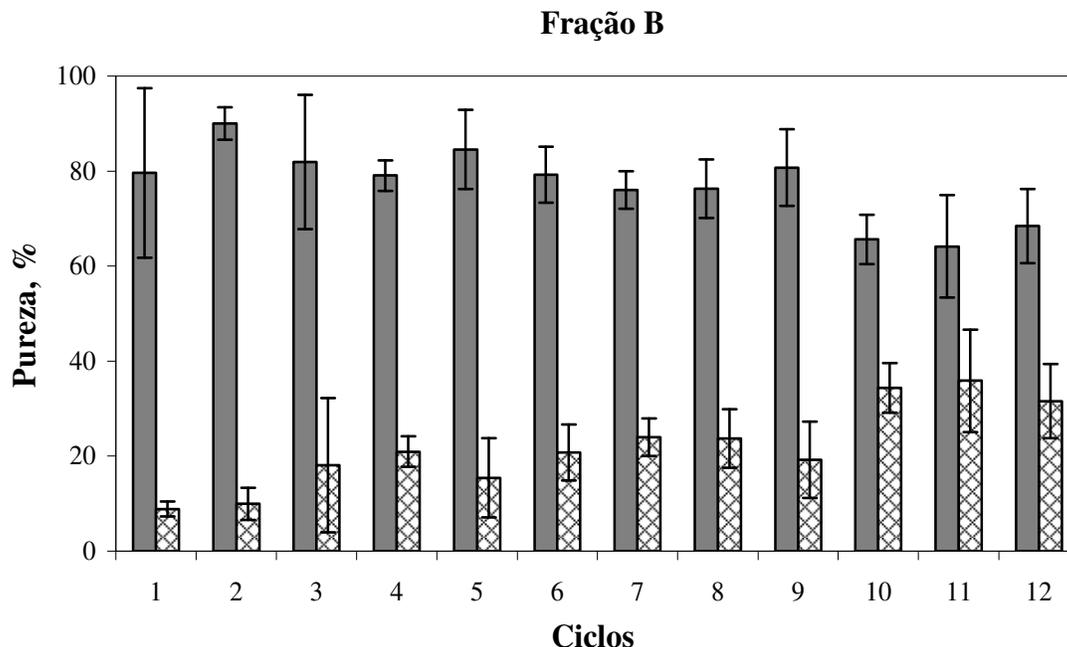


**Figura 4.27:** Pureza relativa das proteínas (▣) e do AH (■) obtida para a fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle automático de válvulas, considerando os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 3,0 mL.

Analisando as Figuras 4.26 e 4.27, obtidas com o ensaio sob automação das válvulas, e comparando-as com as Figuras 4.28 e 4.29, respectivamente, obtidas com o controle manual das válvulas, pode-se dizer que não houve grandes variações em relação ao teor de pureza dos componentes na fração A, permanecendo um teor de pureza em torno de 97 % para o AH. Entretanto, para a fração B, referente às proteínas, observa-se uma discreta melhora em termos de percentual de pureza, no entanto ainda verifica-se a presença de um percentual elevado de AH, que vem a ser contaminante para a fração B. Uma sugestão para melhorar a pureza das proteínas na fração B, seria o uso de volumes de reciclo distintos para as diferentes frações de reciclo ( $R_1$  e  $R_2$ ). Como avaliado anteriormente, verifica-se que elevados volumes de reciclo fornece ao AH na fração A teores de pureza elevados, enquanto que para as proteínas na fração B, o melhor teor alcançado foi obtido trabalhando-se com volumes de reciclo de 1,5 mL. Assim sendo, uma boa opção seria um ensaio de separação com um volume de 3,0 mL para a primeira fração de reciclo, no caso  $R_1$ , e um volume de 1,5 mL para a segunda fração de reciclo, no caso  $R_2$ .



**Figura 4.28:** Pureza relativa do AH (■) e das proteínas (▣) obtida para a fração A durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 3,0 mL.



**Figura 4.29:** Pureza relativa das proteínas (▨) e do AH (■) obtida para a fração B durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas, considerando os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  iguais a 3,0 mL.

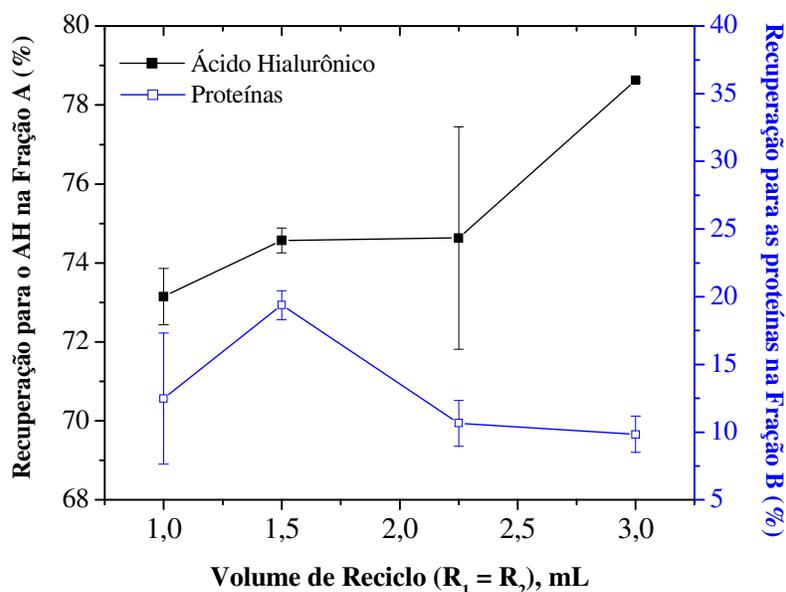
Outro parâmetro também avaliado foi o percentual de recuperação para o AH na fração A e para as proteínas na fração B frente aos diferentes volumes de reciclo avaliados ( $R_1 = R_2$ ), conforme mostrado na Tabela 4.7. O cálculo do percentual de recuperação para o AH e para as proteínas nas referidas frações A e B foi realizado através das Equações 4.10 e 4.11, respectivamente.

$$(\%) \text{Recuperação}_{AH_{\text{Fração A}}} = \left( \frac{C_{AH_{\text{Fração A}}} \cdot Q_{\text{Coleta}_{\text{Fração A}}}}{C_{\text{Total}_{\text{Alimentação}}} \cdot Q_{\text{Alimentação}}} \right) \cdot 100 \quad (4.10)$$

$$(\%) \text{Recuperação}_{\text{Proteínas}_{\text{Fração B}}} = \left( \frac{C_{\text{Proteínas}_{\text{Fração B}}} \cdot Q_{\text{Coleta}_{\text{Fração B}}}}{C_{\text{Total}_{\text{Alimentação}}} \cdot Q_{\text{Alimentação}}} \right) \cdot 100 \quad (4.11)$$

Equações em que  $Q_{\text{Alimentação}}$  é a vazão na alimentação,  $C_{\text{Total Alimentação}}$  é a concentração total na alimentação,  $C_{\text{AH Fração-A}}$  é a concentração de AH na fração A,  $C_{\text{Proteínas Fração-B}}$  é a concentração de proteínas na fração B e  $Q_{\text{Coleta}}$  é a vazão na coleta da respectiva fração.

A Figura 4.30 ilustra o perfil de recuperação médio para o AH na fração A e para as proteínas na fração B, com seus respectivos desvios oriundos do ensaio em triplicata, frente aos diferentes volumes de reciclo trabalhados ( $R_1 = R_2$ ). Observa-se através da Figura 4.30 que o percentual de recuperação para o AH apresenta-se crescente com o aumento do volume de reciclo ( $R_1 = R_2$ ), atingindo um máximo de 79% para um volume de reciclo de 3,0 mL. Já para as proteínas, o perfil de recuperação apresenta um comportamento variável com os diferentes volumes de reciclo, atingindo um máximo de 20% para um volume de reciclo de 1,5 mL. Para a melhoria do percentual de recuperação das proteínas na fração B, é recomendável a utilização de volumes de reciclo diferentes para  $R_1$  e  $R_2$  ao invés de volumes iguais, trabalhando-se com pequenos volumes para  $R_2$  e maiores volumes para  $R_1$ .



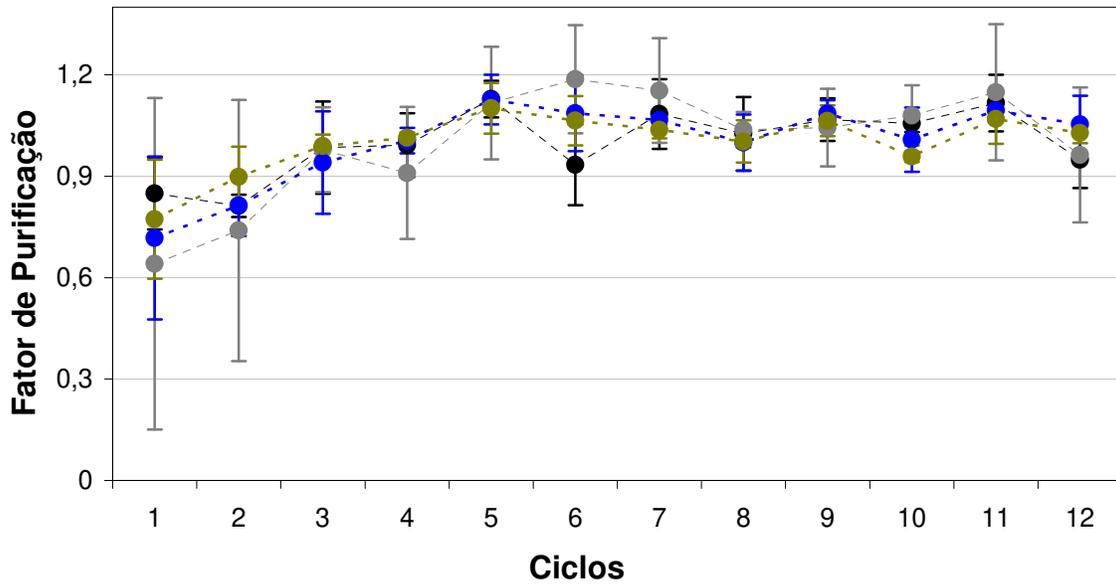
**Figura 4.30:** Perfil de recuperação médio para o AH (■) na Fração A e pelas proteínas (□) na Fração B para os diferentes volumes de reciclo  $R_1 = R_2$  durante os ciclos de eluição no sistema REE com controle manual de válvulas.

#### 4.6. Avaliação do Coeficiente de Purificação das Frações A e B

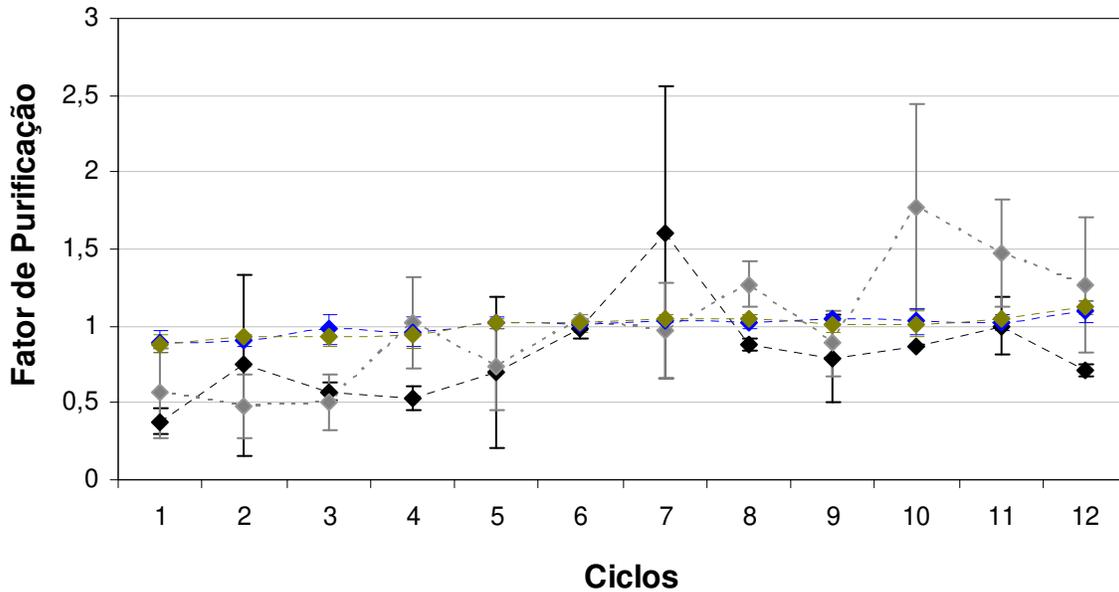
Segundo LADISCH (2001), o grau de purificação é definido pela razão entre a massa do produto na fração pela massa total do mesmo em todos os ciclos dividido pela razão entre a massa do produto inserida no ciclo pela massa total na alimentação. Assim sendo, a purificação é medida pelo grau de enriquecimento de um componente em relação aos outros componentes presentes no produto. A purificação de um componente da mistura de  $n$  componentes pode ser expressa em termos do coeficiente de purificação, dado pela Equação 4.12. Este referido coeficiente, segundo discussão de LADISCH (2001), averigua o enriquecimento em cada ciclo do processo REE, sendo desejáveis valores em torno de 1, pois para valores de coeficiente de purificação abaixo de 1, significa uma perda mássica na coleta da fração do componente em questão; enquanto que valores acima de 1 para o respectivo coeficiente indica a perda mássica do referido componente na alimentação do sistema.

$$r_{\text{Purificação}} = \frac{\left( \frac{x_{p,i}}{\sum_{i=1}^n (x_{p,i})} \right)}{\left( \frac{x_{f,i}}{\sum_{i=1}^n x_{f,i}} \right)} \quad (4.12)$$

O coeficiente de purificação para o AH e para as proteínas, nas respectivas frações coletadas, A e B, em cada ciclo, variando-se os volumes de reciclo ( $R_1$  e  $R_2$ ) entre 1,0 mL e 3,0 mL, foi avaliado com base na Equação 4.12 e está representado nas Figuras 4.31 e 4.32, respectivamente.



**Figura 4.31:** Comportamento do coeficiente de purificação para a fração A, rica em AH, ao longo dos ciclos de eluição no REE, variando-se os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  em 1,0 mL (●); 1,5 mL (●); 2,25 mL (●) e 3,0 mL (●).



**Figura 4.32:** Comportamento do coeficiente de purificação para a fração B, rica em proteínas, ao longo dos ciclos de eluição no REE, variando-se os volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$  em 1,0 mL (◆); 1,5 mL (◆); 2,25 mL (◆) e 3,0 mL (◆).

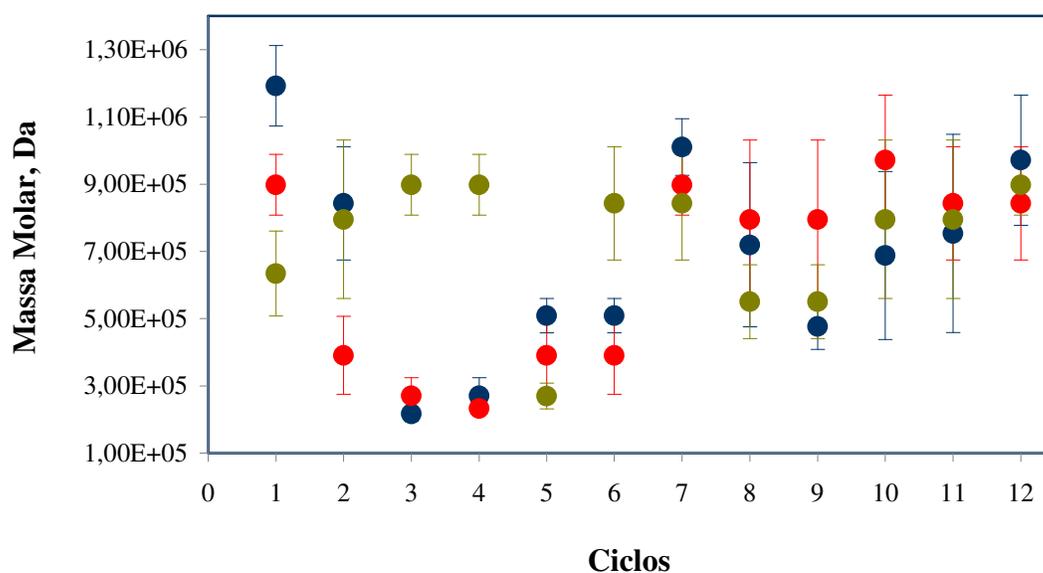
Observa-se que na fração A, rica em AH, Figura 4.31, o coeficiente de purificação mantém o mesmo perfil oscilatório em todas as variações de volume de reciclo, na região em torno de 1, enquanto que, para a fração B, Figura 4.32, este coeficiente não mantém o mesmo perfil oscilatório para os volumes de reciclo de 2,0 e 3,0 mL, apresentando comportamento característico de perda mássica na coleta das frações até o sexto ciclo de eluição; e perda mássica na alimentação do sistema a partir do sexto ciclo. Verifica-se, também, que alguns ciclos de eluição da fração B apresentaram desvios padrão consideráveis, enquanto que para a fração A os desvios padrão foram mais discrepantes nos ciclos iniciais. Isto pode ser explicado pelo fato da operação manual do controle das válvulas de direção de fluxo, que acarreta diferentes velocidades fornecidas no giro das respectivas válvulas.

#### **4.7. Determinação da Massa Molar das Frações A e B**

A massa molar das frações coletadas, A e B, foi determinada baseando-se em uma curva analítica obtida com padrões de AH em diferentes faixas de massa molar, apresentada na Figura 4.6 no Tópico 4.3 deste Capítulo. As análises das frações coletadas foram realizadas por CLAE, utilizando-se dois detectores, um de índice de refração e outro de UV-Vis com comprimento de onda em 280 nm. As condições cromatográficas foram: coluna analítica Phenomenex PolySep-SEC 6000 e uma pré-coluna Phenomenex PolySep GPC, temperatura ambiente,  $\text{NaNO}_3$  pH 7,0 como fase móvel, vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . Para a obtenção da massa molar do AH, tomou-se o tempo de retenção do pico referente ao AH no cromatograma fornecido pelo detector de índice de refração inserindo-se na curva padrão de massa molar, conforme Equação 4.3, obtida através do ajuste dos dados experimentais ilustrados na Figura 4.6. A Figura 4.33 mostra a variação da massa molar do AH, na fração A, ao longo dos ciclos de eluição do sistema REE.

É possível visualizar através da Figura 4.33 que a massa molar do AH na fração A, a saída do sistema REE, com pureza em torno de 92 a 97%, obtida com os diferentes volumes de reciclo apontados na Tabela 4.7, varia em ordem de grandeza de  $10^5$  a  $10^6$  Da, ou seja, caracteriza-se como uma massa molar elevada. Comparando-se com a distribuição de massa molar para o AH na amostra inicial, mostrada na Tabela 4.5, verifica-se que esta referida ordem de grandeza ( $10^5$  a  $10^6$  Da) apresentava-se como maioria na amostra, em torno de 80%.

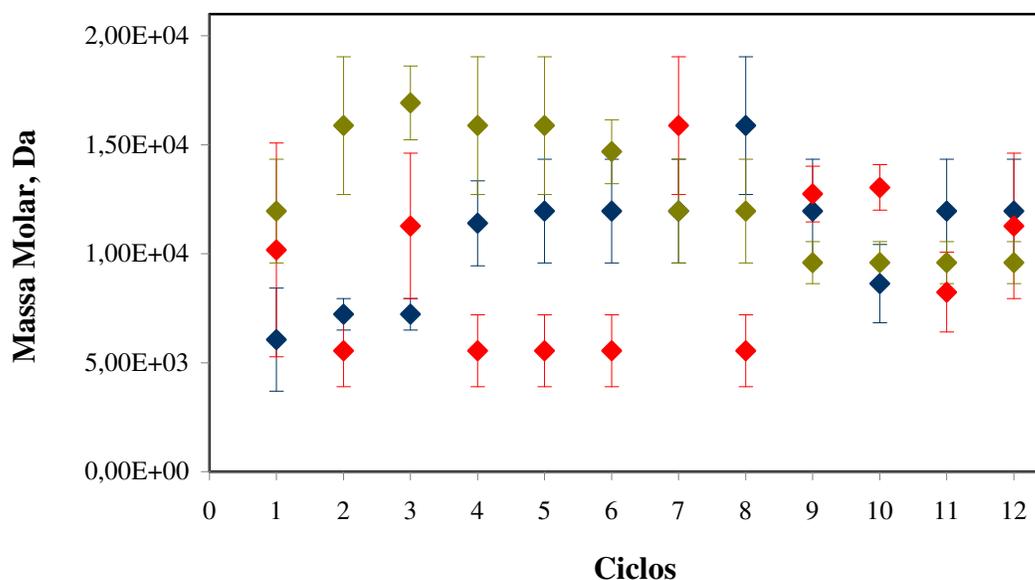
No tocante aos contaminantes protéicos observou-se a faixa de massa molar que ainda persiste a eluição em conjunto com o AH, observado através dos perfis de pureza ilustrados para a fração B, na Figura 4.25.



**Figura 4.33:** Variação da Massa Molar do AH na fração A ao longo dos ciclos de eluição no sistema REE, com os diferentes volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$ : (●) 3,0 mL; (●) 2,25 mL e (●) 1,5 mL.

Observa-se na Figura 4.34 que as proteínas, presentes na fração B, última fração coletada ao longo dos ciclos no sistema REE, são de média e baixa massa molar,

apresentando uma variação na ordem de grandeza de  $10^3$  a  $10^4$  Da. Portanto, o AH, ainda presente nesta fração, deve apresentar massa molar nessa faixa de ordem de grandeza, confirmando a coeluição mútua na ordem de grandeza referente à massa molar intermediária. Isto confirma que a técnica cromatográfica de exclusão por tamanho, mesmo operando em modo de reciclo externo estacionário, não se mostra suficiente para a eliminação protéica das amostras de AH, necessitando de outra técnica acoplada. Como sugestão testada e comprovada na presente tese para a eliminação protéica da referida amostra de AH, tem-se o emprego da cromatografia de troca iônica com resina catiônica, que se revelou satisfatória na remoção protéica fornecendo ao AH um teor de pureza em torno de 98,97%, maior que o obtido com uso da cromatografia de exclusão por tamanho operando no modo reciclo externo estacionário que foi de 97%.



**Figura 4.34:** Variação da Massa Molar das proteínas na fração B ao longo dos ciclos de eluição no sistema REE, com os diferentes volumes de reciclo  $R_1$  e  $R_2$ : (♦) 3,0 mL; (♦) 2,25 mL e (♦) 1,5 mL.

# Capítulo 5

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1. Conclusões

As conclusões gerais atingidas ao final da presente tese de doutorado são expressas a seguir, divididas e enumeradas por assunto para facilitar a leitura e a compreensão do leitor.

### **5.1.1. Cromatografia de Exclusão por Tamanho em Batelada**

A Cromatografia de Exclusão por Tamanho, em modo batelada, mostrou-se viável no tocante à separação do Ácido Hialurônico de maior massa molar, bem como à aplicação ao fracionamento da massa molar da referida molécula, não se mostrando suficiente para a eliminação dos contaminantes protéicos. A ausência de interação entre a fase estacionária e o material a ser separado faz com que a Cromatografia de Exclusão por Tamanho seja uma técnica de separação versátil e com uma vida útil prolongada. O emprego de fases móveis aquosas é um diferencial relevante, uma vez que apresenta um baixo custo para a aquisição, facilidade no manuseio, além de contribuir para a preservação do meio ambiente e para a saúde dos que fazem uso dela. Os diferentes géis disponíveis no comércio possibilitam a escolha adequada, em termos de pressão máxima de trabalho suportável, limite de exclusão e a capacidade do uso com solventes orgânicos, para os respectivos compostos a serem estudados.

### **5.1.2. Cromatografia de Troca Iônica acoplada à Cromatografia de Exclusão por Tamanho**

Os resultados alcançados com o emprego de duas técnicas cromatográficas acopladas em série mostraram-se promissores no tocante à eliminação protéica, principalmente com o uso da coluna de troca catiônica acoplada à exclusão por tamanho, que revelou uma purificação de 98,97 %. Já para os dados conseguidos com a coluna de troca aniônica acoplada a exclusão por tamanho, obteve-se uma purificação de 97,19 %, no entanto uma quantidade significativa de AH foi perdida durante a análise, revelando um percentual de 50,84 % de massa de AH retido na coluna. A inserção da coluna de troca iônica também foi útil para a confirmação da carga residual positiva para os contaminantes protéicos.

### **5.1.3. Sistema de Reciclo Externo Estacionário com Cromatografia de Exclusão por Tamanho**

A adição do processo de Reciclo Externo Estacionário à Cromatografia de Exclusão por Tamanho veio, com a realização deste trabalho, mostrar-se como uma etapa inovadora no setor de purificação do Ácido Hialurônico que apresenta um histórico rico no uso de diferentes técnicas para este objetivo. A versatilidade exibida neste processo, em termos de variações de vazão, ao longo da separação, em determinadas zonas de co-eluição mútua entre o AH e os contaminantes protéicos, apresenta-se como um diferencial no presente trabalho, expondo resultados interessantes com percentuais de pureza acima de 90% para o AH de elevada massa molar, chegando a atingir uma pureza máxima de 97 %, trabalhando-se com volumes de reciclo de 3,0 mL. Vale ressaltar, no entanto, as dificuldades enfrentadas em termos de diluição do material obtido, fazendo-se necessário uma etapa de concentração ao final do processo.

Os resultados obtidos com o processo de Reciclo Externo Estacionário aplicado à Cromatografia de Exclusão por Tamanho revelaram que para uma melhor pureza do AH, faz-se necessário o uso de frações de reciclo elevadas, ou seja, elevadas vazões na zona da primeira fração – R<sub>1</sub>. Com relação à pureza das proteínas, utilizando o processo REE, o mesmo comportamento já não foi observado. Em termos de percentuais de pureza o valor máximo conseguido para as proteínas na Fração B foi trabalhando-se com um volume de reciclo de 1,5 mL, atingindo valores próximos a 60 %, no entanto, o AH continua presente em todos os ciclos. Isto pode ser explicado pelo fato de as proteínas apresentarem o mesmo tamanho molecular do AH de baixa massa molar, em torno de 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> Da, fazendo-se necessário o emprego de outro recurso, ao final do processo, visando à eliminação total das proteínas e recuperação do AH de baixa e média massa molar. Direcionando o pensamento para esta idéia, foram realizados ensaios com a adição de outra ferramenta cromatográfica em conjunto com a exclusão por tamanho, no caso a troca iônica, que, por sua vez, surgiu com igual intuito de introdução de novidades ao setor de purificação do AH, expondo perfis curiosos e interessantes.

A automação das válvulas de direção de fluxo contribuiu para uma melhoria em termos de percentual mássico do AH na Fração A. Com a operação manual das válvulas, obteve-se um percentual mássico para o AH em torno de 60 %, trabalhando-se com um volume de reciclo de 3,0 mL, já com o controle automático das válvulas este respectivo percentual atingiu valores próximos a 95 %, para as mesmas condições operacionais, confirmando o melhor desempenho conseguido com a automação das válvulas. No caso das proteínas na Fração B, não foram observados mudanças no perfil, permanecendo o mesmo comportamento tanto para o controle manual quanto automático das válvulas. Em termos de percentual de pureza não foram percebidas grandes alterações entre o controle manual e automático das válvulas para o AH na fração A; para as proteínas, na fração B, verifica-se uma discreta melhoria em termos de pureza, no entanto, ainda é nítida a presença de AH na referida fração.

#### **5.1.4. Escalonamento em Cromatografia de Exclusão por Tamanho**

O escalonamento do processo Cromatográfico de Exclusão por Tamanho, também averiguado no presente trabalho, mostrou-se de igual modo com um caráter inovador à separação do AH, exibindo comportamento semelhante à escala preparativa, o que possibilita o manuseio com base em variáveis obtidas e matematicamente escalonáveis.

Em se tratando do escalonamento, ainda foi verificada a capacidade de saturação do leito, obtendo-se um perfil interessante e até então não verificado na literatura para o AH. Conforme visualizado nos resultados atingidos, observou-se que o patamar de equilíbrio foi verificado apenas para os contaminantes protéicos; já para o AH, um aspecto interessante foi obtido quando da formação de três nítidos patamares de equilíbrios, com percentuais mássicos e tempos de eluição diferentes. Isto, possivelmente, pode ser explanado pelos diferentes tamanhos moleculares apresentados na amostra de AH, uma vez que os patamares se apresentam em tempos diferentes de eluição. Já a diferença apresentada nos percentuais mássicos pode ser justificada em termos de concentração da respectiva massa molar presente em cada patamar, dessa forma verifica-se que a maior

concentração é de AH de elevada massa molar. Verifica-se também que o patamar referente aos contaminantes protéicos apresenta eluição mútua com o patamar do AH de média e baixa massa molar, o que confirma a conclusão alcançada através do sistema REE.

## 5.2. Sugestões para Futuros Trabalhos

Como sugestões para futuros trabalhos, seguindo a linha de purificação do Ácido Hialurônico, elencou-se uma relação com algumas propostas atraentes que são expostas a seguir:

- Modelagem Matemática para a separação do Ácido Hialurônico por Cromatografia de exclusão por tamanho através do sistema de Reciclo Externo Estacionário, uma vez que o escalonamento experimental mostrou-se viável e coerente com a escala preparativa;
- Isolamento e identificação das proteínas presentes e persistentes nas amostras de Ácido Hialurônico;
- Realização de ensaios *in vivo* do Ácido Hialurônico purificado por Cromatografia de exclusão por tamanho através do sistema de Reciclo Externo Estacionário;
- Separação do Ácido Hialurônico, diretamente do caldo fermentado, utilizando coluna de bolhas e espuma.

# Referências Bibliográficas

- AKDAMAR, H. A.; SARIOZLU, N. Y.; OZCAN, A. A.; ERSOZ, A.; DENIZLI, A.; SAY, R. Separation and purification of hyaluronic acid by glucuronic acid imprinted microbeads. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, p. 1404-1408, 2009.
- AL-SOMALI, A. M.; KRUEGER, K. M.; FALKNER, J. C.; COLVIN, V. L. Recycling size exclusion chromatography for the analysis and separation of nanocrystalline gold. *Analytical Chemistry*, v. 76, p. 5903-5910, 2004.
- ANDERSSON, T.; CARLSSON, M.; HAGEL, L.; PERNEMALM, P. A.; JANSON J. C. Agarose-based media for high-resolution gel-filtration of bio-polymers. *Journal of chromatography*, v. 326, p. 33-44, 1985.
- ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Liquid chromatography plate height equations. *Journal of chromatography*, v. 330, p. 159-166, 1985.
- BAILLY, M.; TONDEUR, D. Recycle optimization in non-linear productive chromatography - I Mixing recycle with fresh feed. *Chemical Engineering Science*. v. 37, n. 8, p. 1199-1212, 1982.
- BALAZS, E. A. Sodium hyaluronate in viscosurgery. In: MILLER, D.; STEGMAN, R. *Healon (sodium hyaluronate): a guide to its use in ophthalmic surgery*. New York. Wiley Medical, 1983, p. 5-28.
- BALAZS, E. A. Therapeutic use of hyaluronan. *Journal of Structural Chemistry*, v.20, p. 341-349, 2009.
- BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 4, p. 330-334, 1962.

- BLUSTEIN, R.; MIGLIORE, S. A.; THONARD, J. C. Isolation of hyaluronic acid from broth cultures of *Streptococcus*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 239, p. 726-728, 1964.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROWN, K. K.; JONES, S. A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 19, p. 308-318, 2005.
- BROWN, K. K.; RUIZ, L. L. C.; VANDERIJN, I.; GREENE, N. D.; TRUMP, S. L.; WILSON, C. D. e BRYANT, S. A. *Method for the microbiological production of non-antigenic hyaluronic acid*. MOBAY CORPORATION. Pittsburgh, PA. United States Patent, n. 5.316.926. Maio, 31, 1994.
- CANEVAROLO JR., S. V. *Ciência dos Polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. São Paulo. Editora Artliber, 2002.
- CHEN, Y. H.; WANG, Q. Establishment of CTAB turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, p. 178-181, 2009.
- CHONG, B. F.; BLANK, L. M.; MCLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L. K. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.66, n.4, p. 341-351, 2005.
- CHURMS, S. C. Recent progress in carbohydrate separation by high performance liquid chromatography based on size exclusion. *Journal of chromatography A*, v. 720, p. 151-166, 1996.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L; BONATO, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas - SP, Editora da Unicamp, 2006, 425p.

- COWMAN, M. K.; MATSUOKA, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 791-809, 2005.
- COWMAN, M. K.; MENDICHI, R. In: *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. GARG, H.G. e HALES, C.A. Amsterdam. Editora Elsevier, cap. 3, 2004.
- CRAWFORD, M. E.; STEVENS, J. M.; ROENNEBURG, L.; YANIK, G. Optimization of steady state recycling parameters utilizing polarimetry in chiral separations. *Journal of Chromatography A*, v. 1178, p. 56-59, 2008.
- CUNICO, R. L.; GOODING, K. M.; WEHR, T. *Basic HPLC and CE of Biomolecules*. Richmond - CA. Editora Bay Bioanalytical Laboratory, 1998, 388p.
- DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. *Journal of Biological Chemistry*, v.167, p.189-198, 1946.
- DUBIN, P. *Aqueous Size-Exclusion Chromatography*. Indianapolis – IN. Editora Elsevier, 1988, 453p.
- GABORIEAU, M. e CASTIGNOLLES, P. Size Exclusion Chromatography (SEC) of branched polymers and polysaccharides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 399, p. 1413-1423, 2011.
- GARG, H. G. e HALES, C. A. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Amsterdam. Editora Elsevier Science; 2004, 624p.
- GIBBS, S. J. e LIGHTFOOD, E. W. Scaling up gradient elution chromatography. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals*, v. 25, 490-498, 1986.
- GRAY, S. D.; THIBEAULT, S. L.; WARD, P. D. Hyaluronic acid: Its role in voice. *Journal of Voice*, v. 16(3), p. 303-309, 2002.

- GRILL, C. M. e 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 chromatographic technique. *Isolation & Purification*, v. 3, p. 29-50, 1999.
- GRILL, C. M.; MILLER, L.; YAN, T. Q. Resolution of a racemic pharmaceutical intermediate – A comparison of preparative HPLC, steady state recycling, and simulated moving bed. *Journal of Chromatography A*, v. 1026, p. 101-108, 2004.
- GUIOCHON, G. Preparative liquid chromatography – Review. *Journal of Chromatography A*, v. 965, p. 129-161, 2002.
- HAN, H. Y.; JANG, S. H.; KIM, E. C.; PARK, J. K.; HAN, Y. J.; LEE, C.; PARK, H. S.; KIM, Y. C. e PARK, H. J.; KOLON LIFE SCIENCE, INC.; Daejeon (KR); United States Patent; n. US 7.575.914 B2, 18 de agosto de 2009.
- HARDINGHAM, T. Solution properties of hyaluronan. In: GARG, H. G.; HALES, C. A. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Amsterdam. Editora Elsevier Science, 2004, p. 1-19.
- HARGITTAI, I.; HARGITTAI, M. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry*, v. 19, p. 697-717, 2008.
- HARRIS, E. L. e ANGAL, S. *Protein purification methods: a practical approach*. Oxford. IRL Press at Oxford University Press, 1995, 336p.
- HASCALL, V. C.; LAURENT, T.C. Hyaluronan: structure and physical properties. In: HASCALL, V. C.; YANAGISHITA, M. *Hyaluronan Today*. 1997. Disponível em: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>
- HOKPUTSA, S.; JUMEL, K.; ALEXANDER, C.; HERDING, S.E. A comparison of molecular mass determination of hyaluronic acid using SEC/MALLS and sedimentation

- equilibrium. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, v. 32 (5), p. 450-456, 2003.
- HORKAY, F.; BASSER, P. J.; LONDONO, D. J.; HECHT, A. M.; GEISLER, E. Ions in hyaluronic acid solutions. *The Journal of Chemical Physics*, v. 131, p. 184902, 2009.
- HUNTER, A. K.; CARTA, G. Protein adsorption on novel acrylamido-based polymeric ion-exchangers. I. Morphology and equilibrium adsorption. *Journal of Chromatography A*, v. 897, p. 65-80, 2000.
- JIANG, D.; LIANG, J.; NOBLE, P. W. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 23, p. 435-461, 2007.
- KAKEHI, K.; KINOSHITA, M.; YASUEDA, S. Hyaluronic acid: separation and biological implications (Review). *Journal of Chromatography B*, v. 797, p. 347-355, 2003.
- KENNEDY, J. H.; BELVO, M. D.; SHARP, V. S.; WILLIAMS, J. D. Comparison of separation efficiency of early phase active pharmaceutical intermediates by steady state recycle and batch chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, v. 1046, p. 55-60, 2004.
- KIM, J. H.; YOO, S. J.; OH, D. K.; KWEON, Y. G.; PARK, D. W.; LEE, C. H. e GIL, G. H. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, v.19 (6), p. 440-445, 1996.
- KIM, T. H.; KIM, H. L.; PARK, S. Y.; JANG, D. K. *Method for purifying hyaluronic acid using calcium salt and phosphate salt or calcium phosphate salt*. T & LIFE SYSTEM CO. LTD.; Chungcheongnam-do (KR). Patent Application Publication, n. US 2008/0194810 A1, Agosto, 14, 2008.
- KOGAN, G.; SOLTES, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, v. 29, p. 17-25, 2007.

- KRIJGSMAN, J. Purification. In: *Product Recovery in Bioprocess Technology*. England. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1st ed., cap. 7, p. 163-207, 1992.
- LADISCH, M. R. *Bioseparations Engineering: Principles, Practice and Economics*. New York – NY. John Wiley & Sons Inc., 2001, 760p.
- LAGO, G.; ORUÑA, L.; CREMATA, J.A.; PÉREZ, C.; COTO, G.; LAUZAN, E.; KENNEDY, J.F. Isolation, purification and characterization of hyaluronan from human umbilical cord residues. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 321-326, 2005.
- LANÇAS, F. M. *Cromatografia Moderna Líquida: HPLC/CLAE*. Campinas - SP. Editora Átomo, 2009.
- LAPCIK, L.; LAPCIK JR., L.; SMEDT, S.; DEMEESTER, J.; CHABRECEK, P. Hyaluronan: preparation, structure, properties and applications. *Chemical Reviews*; v. 98, p. 2663-2684, 1998.
- LAURENT, T. C.; RYAN, M.; PIETRUSZKIEWICZ, A. Fractionation of hyaluronic acid - the polydispersity of hyaluronic acid from the bovine vitreous body. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 42 (3), p. 476-485, 1960.
- LI, H.; TOLLEY, H. D.; LEE, M. L. Size exclusion separation of proteins using a biocompatible polymeric monolithic capillary column with mesoporosity. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 8181-8185, 2010.
- MARECAK, D.; YEUNG, B. Molecular weight determination of hyaluronic acid by gel filtration chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 852, p. 573-581, 1999.
- MEYER, K.; PALMER, J.W. The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 107, p. 629-634, 1934.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. A kinetic study of mass transfer in reversed-phase liquid chromatography on a C18-silica gel. *Analytical Chemistry*, v. 72 (21), p. 5162-5171, 2000.

MORI, S. e BARTH, H. G. *Size Exclusion Chromatography*. Berlim. 1<sup>st</sup> Edição. Editora Springer Verlag Pod, 1999, 248p.

MORRA, M. Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan. *Macromolecules*, v. 6(3), p. 1205-1223, 2005.

MURATA, H.; FUKUDA, K. *Method for purification of hyaluronic acid salt*. OMORI & YAGUCHI USA, LLC. Philadelphia – USA. Patent Application Publication, n. US 2009/0162905 A1, Junho. 25, 2009.

NEBINGER, P. Comparison of gel permeation and ion-exchange chromatographic procedures for the separation of hyaluronate oligosaccharides. *Journal of Chromatography A*, v. 320 (2), p. 351-359, 1985.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L.; BRAUNER, P.; KOLAR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, v. 53(8), p. 397-411, 2008.

NIMROD, A.; GREENMAN, B.; KANNER, D.; LANDSBERG, M.; BECK, Y. *Method of producing high molecular weight sodium hyaluronate by fermentation of Streptococcus*. BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORP. United States Patent, n. 4.780.414. Outubro. 25, 1988.

NÓBREGA, ELCIMAR DA SILVA. *Separação de Misturas Binárias Protéicas de  $\alpha$ -Lactoalbumina e  $\beta$ -Lactoglobulina em um Sistema Cromatográfico Utilizando a Técnica de Reciclo Externo Estacionário*. Campinas – SP. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. 127p. Tese (Doutorado).

PIRES, ALINE MARA BARBOSA. *Estudos metabólicos para otimização de condições nutricionais e de cultivo para a produção microbiana de ácido hialurônico*. Campinas –

- SP. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. Tese (Doutorado).
- PITKÄNEN, L.; TENKANEN, M.; TUOMAINEN, P. Behavior of polysaccharide assemblies in field-flow fractionation and size-exclusion chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 399 (4), p. 1467-1472, 2011.
- PORATH, J. e FLODIN, P. Gel Filtration: A method for desalting and group separation. *Nature*, v. 183, p. 1657-1659, 1959.
- QUIÑONES, I.; GRILL, C. M.; MILLER, L.; GUIOCHON, G. Modeling of separations by closed-loop steady-state recycling chromatography of a racemic pharmaceutical intermediate. *Journal of Chromatography A*, v. 867, p. 1-21, 2000.
- RANGASWAMY, V.; JAIN, D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*. *Biotechnology Letters*, v. 30, p. 493-496, 2008.
- ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por Exclusão. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. 1<sup>st</sup> Edição. Editora da Unicamp, p. 139-166, 2006.
- RUTHVEN, D. M. Principles of Adsorption and Adsorption Process. New York. Editora John Wiley & Sons, 1984, 433p.
- SAINIO, T.; KASPEREIT, M. Analysis of steady state recycling chromatography using equilibrium theory. *Separation and Purification Technology*, v. 66, p. 9-18, 2009.
- SCHLINGE, D.; SCHERPIAN, P.; SCHEMBECKER, G. Comparison of process concepts for preparative chromatography. *Chemical Engineering Science*, v. 65, p. 5373-5381, 2010.

- SHIMADA, E.; NAKAMURA, K. T. Determination of stokes radii and molecular masses of sodium hyaluronates by sephacryl gel chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 685, p. 172–177, 1994.
- SIITONEN, J.; SAINIO, T.; KASPEREIT, M. Theoretical analysis of steady state recycling chromatography with solvent removal. *Separation and Purification Technology*, v. 78, p. 21–32, 2011.
- SNYDER, L. R. e KIRKLAND, J. J. Basic concepts and control of separation. In: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2<sup>nd</sup> edição. Nova York. Editora John Wiley & Sons, cap. 2, p. 15-82, 1979.
- SOUSA, A. S.; GUIMARÃES, A. P.; GONÇALVES, C. V.; SILVA JR., I. J.; CAVALCANTE JR., C. L.; AZEVEDO, D. C. S. Purification and characterization of microbial hyaluronic acid by solvent precipitation and size-exclusion chromatography. *Separation Science and Technology*, v. 44, p. 906-923, 2009.
- STEKOLNIKOV, L. I. e KORNILOVA, A. A. *Production of hyaluronic acid – includes aerobic fermentation of specified microorganism on aqueous culture medium, and separation by centrifuging and chromatographic purification with ion-exchange resin*. NART RES. PRODN FIRM (NART – Soviet Institute). RU2074863-C1, 1997.
- SUNWOO, H. H.; NAKANO, T.; SIM, J. S. Isolation and characterization of proteoglycans from growing antlers of wapiti. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v. 121, p. 437–442, 1998.
- TAMMI, R. e TAMMI, M. Hyaluronan in epidermis. In: LAURENT T. C. *Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives*. Londres. Wenner-Gren International Series. Editora Portland Press, v. 72, Cap. 4, 1998.
- TARAFDER, A.; STROHLEIN, G.; AUMANN, L.; MORBIDELLI, M. Role of recycling in improving the performance of chromatographic solvent gradient purifications. *Journal of Chromatography A*, v. 1183, p. 87-99, 2008.

- VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J., KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*, v. 5, p. 271-289, 1956.
- WANG, X.; CHING, C. B. Kinetic and equilibrium study of the separation of three chiral center drug, nadolol, by HPLC on a novel perphenyl carbamoylated b-cyclodextrin bonded chiral stationary phase. *Separation Science and Technology*, v. 37, n. 11, p. 2567-2586, 2002.
- WANKAT, P. C. e KOO, Y. M. Scaling rules for isocratic elution chromatography. *AICHE J.*, v. 34 (6), p. 1006-1019, 1988.
- WEISSMANN, B. e MEYER, K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *Journal of the American Chemical Society*, v. 76 (7), p. 1753-1757, 1954.
- WILLIAMS, A.; HAGEL, L. Size exclusion for analysis and purification of aqueous macromolecules. In: WU, C. S. *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*. London, Academic Press, p. 27-74, 1999.
- WINZOR, D. J. Analytical Exclusion Chromatography – Review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 56, p. 15-52, 2003.
- WON, T.Y.; LEE, C.; SEO, S.H. *Method for purifying hyaluronic acid*. LG LIFE SCIENCES LTDA., Seoul, South Korea, International application published under the patent cooperation treaty – PCT; WO 2008/062998 A1. Maio. 29, 2008.
- YAN, T. Q. e ORIHUELA, C. Rapid and high throughput separation technologies – Steady state recycling and supercritical fluid chromatography for chiral resolution of pharmaceutical intermediates. *Journal of Chromatography A*, v. 1156, p. 220-227, 2007.
- YANG, H. I. e KORNILOVA, A. A. *Method for purification of high molecular hyaluronic acid*. SHINSUNG PATENT FIRM; WO 2004/096863 A1; 2004.

YANG, P. F. e LEE, C. K. Hyaluronic acid interaction with chitosan-conjugated magnetic particles and its purification. *Biochemical Engineering Journal*, v. 33, p. 284-289, 2007.

YAO, Y.; LENHOFF, A. M. Determination of pore size distributions of porous chromatographic adsorbents by inverse size-exclusion chromatography – Review. *Journal of Chromatography A*, v. 1037, p. 273–282, 2004.

ZELIC, B. e NESEK, B. Mathematical modeling of size exclusion chromatography; *Engineering in Life Sciences*. v. 6, p. 163-169, 2006.

ZHOU, H.; NI, J.; HUANG, W.; ZHANG, J. Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, v. 52, p. 29-38, 2006.