

Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia Química

Área de concentração:

Engenharia de Processos

***Modelagem e Simulação da Separação das Proteínas
 α -Lactalbumina e β -Lactoglobulina por Cromatografia
Preparativa em Resinas Trocadoras de Ânions
Utilizando Leito Móvel Simulado***

Autor:

Eng^o. Sérgio Luiz de Lucena

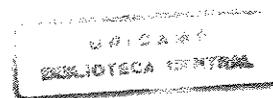
Orientador:

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

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

Doutor em Engenharia Química

Campinas (SP), Novembro de 1999



20 000507

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	L963m
V.	Ex.
FÓRNO	39.936
PREÇO	278,00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	288,11,00
DATA	12/04/00
N.º CPD	

CM-00137790-4

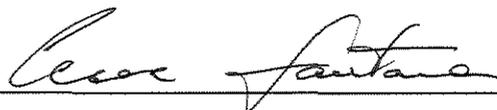
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

L963m Lucena, Sérgio Luiz de
Modelagem e simulação da separação das proteínas α -Lactalbumina e β -Lactoglobulina por cromatografia preparativa em resinas trocadoras de ânions utilizando leite móvel simulado / Sérgio Luiz de Lucena.--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

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

1. Separação (Tecnologia). 2. Adsorção. 3. Proteínas - Separação. 4. Cromatografia contracorrente. 5. Cromatografia de troca iônica. I. Santana, Cesar Costapinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

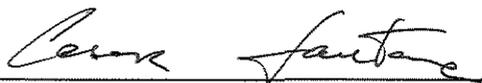
Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por *Sérgio Luiz de Lucena* e aprovada pela comissão julgadora em 24/11/1999.

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

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Professor Orientador

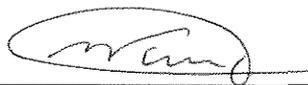
Tese de Doutorado defendida por *Sérgio Luiz de Lucena* em 24 de novembro de 1999 e aprovada pela Banca Examinadora constituída pelos Professores e Doutores:



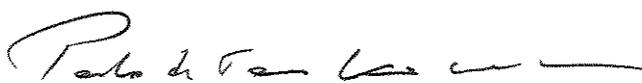
Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana



Prof. Dr. Célio Loureiro Cavalcante Júnior



Prof. Dr. Satoshi Tobinaga



Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa



Dr. Luís Tadeu Furlan

Aos meus pais Gilson e Verônica,

Aos meus irmãos Júnior e Vera

Aos meus sobrinhos:

Patrícia, Diego, Bruno e Willian

e a que vem chegando...

Meu eterno carinho!

Agradecimentos

- ♥ Aos *meus pais* e demais membros de *minha família* que tiveram paciência e apoiaram minhas decisões para que eu pudesse chegar até aqui.
- Meus sinceros agradecimentos ao *Prof. Cesar C. Santana* do Departamento de Processos Biotecnológicos (DPB/FEQ/Unicamp) pelas sugestões e orientações no transcorrer deste trabalho, pela solicitude e respeito ao aluno. Sempre terá minha admiração.
- Ao casal *Eduardo Arruda e Ive* pela amizade e mensagens encorajadoras. Que Deus os abençoe. Sempre serão lembrados com carinho e gratidão.
- Ao casal *Júlio Rupp e Prof.^a Celina* que me acompanham desde meus primeiros semestres de graduação na Universidade Estadual de Maringá (PR). Obrigado pela amizade, apoio e estímulo. A distância nos separa, mas minha alma nunca esquece e está cheia de gratidão.
- Aos amigos e colegas: *Adriano, Ana, Eduardo, Elcimar, Fábio, Líbia, Marisa, Paulo, Rosana, Salah, Sandra, Vinícius*, entre outros que me proporcionaram dias agradáveis no laboratório, deram sugestões e foram compreensivos.
- À Sr^a *Eliana Delgado* (de Neuquém, Argentina) muito amiga e conselheira, também inesquecível; mãezona e "sogra".
- Ao *CNPq* e à *Capes* pela bolsa de estudos e apoio financeiro aos projetos sem os quais este trabalho não teria sido possível.
- Aos demais colegas, professores e funcionários da Unicamp que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.
- À todos os professores que tive, desde o primário na EEPSP do Campinal em Presidente Epitácio (SP), até a pós-graduação na FEQ/Unicamp.
- Obrigado *Senhor*, sempre!

No tempo da vida que passa há sinais de eternidade que ficam.

Resumo

Leito móvel simulado (LMS) é um importante processo de separação cromatográfica contínua que utiliza uma série de colunas contendo uma fase sólida adsorvente e que estão conectadas de modo a se formar um circuito que é dividido em quatro zonas, possuindo duas correntes de entrada (alimentação e dessorvente) e duas correntes de saída (retirada do extrato e do refinado). A alimentação é uma solução homogênea que contém duas substâncias a serem separadas e cuja concentração é conhecida para cada uma delas, sendo que essas substâncias apresentam interações distintas com o sólido adsorvente. O dessorvente (ou eluente), em geral, é o próprio meio líquido solvente (para alimentação líquida) e tem por função dessorver a substância que teve uma interação mais forte com o sólido adsorvente e transportá-la para o ponto de retirada do extrato. No refinado é retirada a substância que teve interação mais fraca com a fase adsorvente. As entradas e saídas são periodicamente movidas na direção do fluxo de líquido, simulando um movimento contracorrente com a fase sólida adsorvente. O processo LMS foi criado no início dos anos 60 para aplicação na indústria petroquímica, porém, a sua aplicação na separação de biomoléculas como as proteínas vem ganhando importância dentro das indústrias de biotecnologia.

Os objetivos deste trabalho são obter experimentalmente isotermas de adsorção das proteínas α -lactalbumina (A-La) e β -lactoglobulina (B-Lg) em resinas trocadoras de ânions e desenvolver uma rotina computacional para um sistema LMS com oito colunas (duas colunas por zona) para estudar a separação dessas proteínas a partir da simulação dos perfis de concentração no extrato e no refinado. A A-La e a B-Lg estão presentes no soro do leite bovino com concentrações da ordem de 1,0 g/L e 3,0 g/L, respectivamente.

As isotermas de adsorção foram obtidas a 25 °C em resinas trocadoras de ânions Accell Plus QMA (Waters Co) utilizando como solvente o tampão Bis-Tris-

HCl pH 6,5 com concentrações de cloreto de sódio (sal) entre 0 e 250 mM. A rotina computacional do LMS foi desenvolvida no ambiente MS Fortran PowerStation 4.0 através da solução numérica dos modelos utilizando o algoritmo Runge-Kutta-Fehlberg.

As isotermas de adsorção obtidas com o uso de 200 e 250 mM de sal permitiram a obtenção dos parâmetros de equilíbrio mais propícios de serem aplicados no LMS. Essas isotermas, obtidas para cada proteína individualmente ou misturadas, mostraram uma relação linear numa faixa de concentrações além da comumente encontrada no soro do leite bovino e, ainda, a B-Lg adsorveu mais fortemente que a A-La.

A rotina computacional desenvolvida para o LMS foi capaz de simular os perfis de concentrações do extrato e do refinado e indicam que as proteínas A-La e B-Lg podem ser separadas, de forma contínua, a partir da solução-mistura alimentada. A pureza do extrato (B-Lg) e do refinado (A-La) ficaram próximas a 100% quando se usa apropriados tempos de troca das colunas e combinação de vazões nas diferentes zonas do LMS. Isso também permitiu uma baixa diluição das correntes do extrato e do refinado. As simulações podem ser feitas de forma rápida e os resultados obtidos nas simulações necessitam de uma confirmação experimental.

Abstract

Simulated moving bed (SMB) is an important process for the continuous chromatographic separation. It uses a series of columns containing an adsorbent solid phase and all columns are connected in such a way to form a circuit that is divided in four zones, possessing two inlets (feeding and desorbent) and two outlets (extract and raffinate withdraws). The feeding is a homogeneous solution that contains two substances to be separated and whose concentrations are known for each one of them. The substances to be separated must have different degrees of interactions with the solid adsorbent. The desorbent (eluent) may be the liquid solvent used in the feeding solution, and its main function is to remove and to transport the substance that presented the stronger interaction with the adsorbent phase to the extract drawoff. In the raffinate is removed the substance that had weaker interaction with the adsorbent. Both, the inlets and outlets ports are periodically shifted along the liquid flow direction. This creates the simulated countercurrent movement of the solid phase in SMB. Such SMB process was initially created for application in the petrochemical industry in the sixties. Nowadays, its application to separate biomolecules such as proteins is gaining special attention by biotechnological industries.

The goal of this work are experimentally to obtain equilibrium adsorption isotherms for the proteins α -lactalbumin (A-La) and β -lactoglobulin (B-Lg) using anion-exchange adsorbent resins and to develop a computational routine for a SMB system presenting eight columns (two columns in each zone) to study the separation of those proteins when simulating the concentration profiles in the extract and in the raffinate. The proteins A-La and B-Lg are present in the bovine milk whey with concentrations around 1,0 g/L and 3,0 g/L, respectively.

The equilibrium adsorption isotherms were obtained at 25 °C on Accell Plus QMA (Waters Co) anion-exchanger resins using Bis-Tris-HCl pH 6,5 buffer as

solvent with concentrations of sodium chloride (salt) ranging from 0 to 250 mM. The SMB computational routine was developed in MS Fortran PowerStation 4.0 obtaining the numeric solution of the models using Runge-Kutta-Fehlberg algorithm.

The adsorption isotherms using 200 and 250 mM of salt allowed us to get the most favourable equilibrium parameters to be applied for the SMB separation. Those isotherms obtained for each protein, individually or mixed, showed a linear relationship in a range of concentrations beyond of those commonly found in the bovine milk whey. Moreover, B-Lg was more strongly adsorbed than A-La

The developed SMB computational routine was capable to simulate the concentrations profiles for both the extract (B-Lg) and the raffinate (A-La) streams. The simulations indicate that the proteins A-La and B-Lg can be continuously separated with extract and raffinate purities reaching 100% when applying proper switching time and combination of flowrates for each zone. Also, It allowed a low dilution of those proteins in the extract and raffinate. The SMB simulations can be fastly executed, and the simulated results need an experimental confirmation.

Sumário

1 Introdução.....	1
2 Revisão da Literatura.....	5
2.1 As proteínas.....	5
2.1.1 Características iônicas das proteínas.....	8
2.2 As proteínas do soro do leite.....	8
2.2.1 A α -Lactalbumina.....	10
2.2.2 A β -Lactoglobulina.....	11
2.3 Separação das proteínas.....	11
2.4 Princípios básicos sobre resinas de troca iônica.....	13
2.4.1 Cromatografia de troca iônica.....	14
2.5 Separações de proteínas por adsorção em resinas de troca iônica.....	15
2.6 Separações cromatográficas em colunas de leito fixo.....	17
2.7 Os leitos móveis e as separações cromatográficas em leitos móveis.....	19
2.7.1 O leito móvel verdadeiro (LMV).....	20
2.7.2 O leito móvel simulado (LMS).....	23
3 Modelagem Matemática para o LMS.....	27
3.1 Modelagem da coluna.....	27
3.2 Modelagem dos nós entre as zonas do LMS.....	37
3.3 Estratégia de solução dos modelos.....	38

3.4 Condições de separação.....	41
4 Materiais e Métodos e Resultados Experimentais.....	45
4.1 As proteínas, o adsorvente e os tampões utilizados.....	45
4.2 Determinação das isotermas de adsorção.....	46
4.2.1 Metodologia para obtenção das isotermas das proteínas puras.....	46
4.2.2 Metodologia para obtenção das isotermas utilizando as proteínas em misturas binárias.....	49
4.3 Resultados experimentais.....	51
4.3.1 Isotermas obtidas para as proteínas puras (individuais).....	51
4.3.2 Isotermas obtidas para as proteínas em misturas binárias.....	54
4.3.3 Determinação das curvas de <i>breakthrough</i> para a mistura 1:1.....	56
5 Simulações e Resultados das Simulações.....	59
5.1 Simulações dos modelos para uma coluna.....	59
5.1.1 Modelo que considera isoterma linear.....	60
5.1.2 Modelo que considera isoterma do tipo Langmuir.....	61
5.1.3 Modelo que considera isotermas do tipo Langmuir competitivas....	62
5.1.4 Modelo que considera força motriz linear.....	63
5.1.5 Efeito da concentração de sal no tempo de <i>breakthrough</i>	64
5.1.6 Influência da dispersão axial nas curvas de <i>breakthrough</i>	65
5.2 Simulações para o Leito Móvel Simulado.....	66
5.2.1 Simulações utilizando parâmetros de equilíbrio da mistura binária 1:3 aplicados no modelo de equilíbrio dispersivo linear.....	68
5.2.2 Simulações utilizando parâmetros de equilíbrio das proteínas puras aplicados no modelo de equilíbrio dispersivo linear.....	89
5.2.3 Simulações utilizando o modelo de força motriz linear.....	93

5.2.4 Simulações utilizando parâmetros de equilíbrio da mistura binária 1:1 aplicados no modelo de equilíbrio dispersivo linear.....	98
5.2.5 Simulações do modelo de equilíbrio dispersivo que considera adsorção competitiva.....	101
6 Discussões.....	108
6.1 Parte experimental.....	108
6.2 Simulações dos modelos.....	110
6.2.1 Simulações dos modelos para uma coluna.....	110
6.2.2 Simulações dos modelos para o LMS.....	111
7 Conclusão e Sugestões para Próximos Trabalhos.....	119
7.1 Conclusões.....	119
7.2 Sugestões para próximos trabalhos.....	120
Referências Bibliográficas.....	122
Apêndice.....	126

Lista de Figuras

Capítulo Um

Figura 1.1: Esquema simplificado do LMV (à esquerda) e do LMS (à direita) com 8 colunas. O componente (A) adsorve menos fortemente que o componente (B).....2

Capítulo Dois

Figura 2.1: Estruturas das moléculas de proteínas.....7

Figura 2.2: Esquema mostrando os dois tipos básicos de troca de íons.....15

Figura 2.3- Representação esquemática, de acordo com a carga líquida da proteína, do comportamento da adsorção em trocadores de íons como função do pH. pI é o ponto isoelétrico.....16

Figura 2.4: Esquema de uma operação de separação cromatográfica.....17

Figura 2.5: Migração de dois componentes de uma amostra ao longo de uma coluna cromatográfica mostrando a separação paulatina dos dois componentes.....19

Figura 2.6- Princípio básico do LMV e um típico perfil de concentrações (à direita). O componente B adsorve mais fortemente que o componente A.....21

Figura 2.7: Esquema do LMS com 8 colunas e as 4 zonas.....24

Capítulo Três

- Figura 3.1: Elemento de volume diferencial numa coluna.....29
- Figura 3.2: Fluxograma da rotina desenvolvida para o LMS.....40
- Figura 3.3.a - Domínio dos possíveis valores de β_2 e β_3 . Todos os valores dentro do triângulo isósceles curvilíneo são matematicamente aceitáveis.....44
- Figura 3.3.b - Domínio dos possíveis valores de β_1 e β_4 . Todos os valores maiores que 1 são matematicamente aceitáveis.....44

Capítulo Quatro

- Figura 4.1: Esquema da seringa e do agitador rotativo utilizados para se obter as isotermas.....47
- Figura 4.2: Picos cromatográficos da α -lactalbumina (A-La) e da β -lactoglobulina (B-Lg) obtidos com um gradiente 15mM/min (NaCl) em uma coluna HP DEAE 5PW (troca de ânions) após a injeção de 20 μ L da mistura.....50
- Figura 4.3: Isotermas de adsorção a 25 °C da A-La e da B-Lg obtidas com a resina Accell-Plus QMA em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 sem a adição de NaCl. Os símbolos são pontos experimentais e as linhas contínuas representam o ajuste tipo Langmuir: A-La: $q^m=344,40$ mg/g e $K^d=3,3 \times 10^{-2}$ mg/mL e B-Lg: $q^m=280,43$ mg/g e $K^d=3,7 \times 10^{-3}$ mg/mL.....51
- Figura 4.4: Isotermas de adsorção a 25 °C da B-Lg obtidas com a resina Accell Plus QMA em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 com diferentes concentrações de NaCl. Os símbolos são pontos experimentais e as linhas contínuas representam os ajustes indicados.....52

- Figura 4.5: Isotermas de adsorção a 25 °C da A-La e da B-Lg obtidas com a resina Accell-Plus QMA em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 com 250 mM NaCl. Os símbolos são pontos experimentais. As linhas contínuas representam o ajuste linear mostrado.....53
- Figura 4.6: Isoterma de adsorção a 25 °C para A-La e B-Lg, mistura binária 1:1 em tampão 20mM Bis-Tris-HCl com 250 mM em NaCl pH 6,5 em resinas Accell-Plus QMA.....54
- Figura 4.7: Isoterma de adsorção a 25 °C para A-La e B-Lg, mistura binária 1:3 em tampão 20mM Bis-Tris-HCl com 200 mM em NaCl pH 6,5. A resina adsorvente foi Accell-Plus QMA.....55
- Figura 4.8: Esquema da coluna utilizada para a obtenção das curvas de *breakthrough*.....57
- Figura 4.9: Curvas de *breakthrough* experimentais para a A-La e B-Lg (símbolos) e o modelo da coluna (equilíbrio dispersivo linear) para ambas aplicando os parâmetros de equilíbrio 1:1 (linha contínua). Coluna: 9,4x1,6cm, concentração na alimentação para ambas foi 1,0 mg/mL em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 e 250 mM NaCl com vazão igual a 1,0 mL/min. a 25°C. Resina Accell-Plus QMA troca de ânions.....58

Capítulo Cinco

- Figura 5.1:(a) Curvas de *breakthrough* para a A-La e para a B-Lg aplicando os parâmetros de equilíbrio obtidos com a mistura binária 1:1; (b) Perfis internos na coluna em diferentes tempos para a B-Lg. Os símbolos são pontos simulados pelo modelo que considera isoterma linear. Dados: coluna 10,0 x 1,6 cm, concentração de

ambas proteínas na alimentação foi 1,0 mg/mL e vazão igual a 1,0 mL/min. $K_{A-La}=0,930$ e $K_{B-Lg}=1,255$60

Figura 5.2:(a) Curvas de *breakthrough* para a A-La e para a B-Lg ;
(b) Perfis internos na coluna em diferentes tempos para a B-Lg. Os símbolos são pontos simulados pelo modelo que considera isoterma do tipo Langmuir. Dados: coluna 10,0 x 1,6 cm, concentração de ambas proteínas na alimentação foi 1,0 mg/mL e vazão igual a 1,0 mL/min. Parâmetros fictícios utilizados no modelo:
A-La: $q^m=45,0$ mg/g e $K_d=21,0$ mg/mL;
B-Lg: $q^m=50,0$ mg/g e $K_d=16,0$ mg/mL.....61

Figura 5.3:(a) Curvas de *breakthrough* para a A-La e para a B-Lg ;
(b) Perfis internos na coluna em diferentes tempos para a A-La (●) e para a B-Lg (■). Os símbolos são pontos simulados pelo modelo que considera isoterma do tipo Langmuir competitiva. Dados: coluna 10,0 x 1,6 cm, concentração de ambas proteínas na alimentação foi 1,0 mg/mL e vazão igual a 1,0 mL/min. Parâmetros utilizados no modelo:
A-La: $q^m=45,0$ mg/g e $K_a=4,76 \times 10^{-2}$ mL/mg;
B-Lg: $q^m=50,0$ mg/g e $K_a=6,25 \times 10^{-2}$ mL/mg.....62

Figura 5.4:(a) Curvas de *breakthrough* para a A-La e para a B-Lg ;
(b) Perfis internos na coluna em diferentes tempos para a B-Lg. Os símbolos são pontos simulados pelo modelo que considera força motriz linear. Dados: coluna 10,0 x 1,6 cm, concentração de ambas proteínas na alimentação foi 1,0 mg/mL e vazão igual a 1,0 mL/min. Parâmetros utilizados no modelo:
A-La: $k_{fa_v}=3,5$ min⁻¹; B-Lg: $k_{fa_v}=4,3$ min⁻¹.....63

Figura 5.5: Efeito da concentração de NaCl nas curvas de *breakthrough* simuladas para a B-Lg. Dados: coluna 10,0 x 1,6 cm, concentração da proteína na alimentação foi 1,0 mg/mL e vazão igual a 1,0 mL/min. Dados de equilíbrio: 250 mM NaCl: $K=1,963$; 160 mM NaCl: $q^m=123,81$ mg/g e $K_d=4,36$ mg/mL; 125 mM NaCl: $q^m=159,67$ mg/g e $K_d=1,29$ mg/mL.....64

Figura 5.6: Efeito da dispersão axial nas curvas de *breakthrough* simuladas para a B-Lg. Dados: coluna 10,0 x 1,6 cm, concentração da proteína na alimentação foi 1,0 mg/mL e vazão igual a 1,0 mL/min. Dados de equilíbrio: $q^m=123,81$ mg/g e $K_d=4,36$ mg/mL. O número de Peclet (Pe) é dado por: $Pe=v_oL/\varepsilon D_{ax}$65

Figura 5.7: Domínio dos possíveis valores para β_2 e β_3 para a mistura binária 1:3.....68

Figura 5.8.a: Perfis dinâmicos do extrato e do refinado. Tempo de troca igual a 7,5 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura binária 1:3. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,41%. $\beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = \beta_4 = 1,05$70

Figura 5.8.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera equilíbrio dispersivo. Tempo de troca igual a 7,5 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura 1:3; $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,07$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,41%. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para a A-La e

3,0 mg/mL para a B-Lg. $\beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = \beta_4 = 1,05$71

Figura 5.8.c: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A} = 1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A} = 3,0$ mg/mL, $K_{A-La} = 1,205$ e $K_{B-Lg} = 4,070$. Os símbolos são pontos simulados. $\beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = \beta_4 = 1,05$ 72

Figura 5.8.d: Consumo do solvente no extrato e no refinado como função do tempo de troca para $\beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = \beta_4 = 1,05$. Os símbolos são pontos calculados.....73

Figura 5.9.a: Perfis dinâmicos do extrato e do refinado. Tempo de troca igual a 7,5 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura binária 1:3. $C_{A-La,A} = 1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A} = 3,0$ mg/mL, $K_{A-La} = 1,205$ e $K_{B-Lg} = 4,070$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,48%. $\beta_1 = \beta_4 = 1,05$ e $\beta_2 = \beta_3 = 1,15$75

Figura 5.9.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona) obtidos pelo modelo que considera equilíbrio dispersivo. Tempo de troca igual a 7,5 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura 1:3; $K_{A-La} = 1,205$ e $K_{B-Lg} = 4,07$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,48%. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para a A-La e 3,0 mg/mL para a B-Lg. $\beta_1 = \beta_4 = 1,05$ e $\beta_2 = \beta_3 = 1,15$76

Figura 5.9.c: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A} = 1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A} = 3,0$ mg/mL, $K_{A-La} = 1,205$ e $K_{B-Lg} = 4,070$. Os símbolos são pontos simulados. $\beta_1 = \beta_4 = 1,05$ e $\beta_2 = \beta_3 = 1,15$77

Figura 5.9.d: Consumo do solvente no extrato e no refinado como função do tempo de troca para $\beta_1=\beta_4=1,05$ e $\beta_2=\beta_3=1,15$. Os símbolos são pontos calculados.....	78
Figura 5.10.a: Perfis dinâmicos do extrato e do refinado. Tempo de troca igual a 7,5 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura binária 1:3. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 100%. $\beta_1=\beta_4=1,15$ e $\beta_2=\beta_3=1,05$	80
Figura 5.10.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera equilíbrio dispersivo. Tempo de troca igual a 7,5 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura 1:3; $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,07$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 100%. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para a A-La e 3,0 mg/mL para a B-Lg. $\beta_1=\beta_4=1,15$ e $\beta_2=\beta_3=1,05$	81
Figura 5.10.c: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Os símbolos são pontos simulados. $\beta_1=\beta_4=1,15$ e $\beta_2=\beta_3=1,05$	82
Figura 5.10.d: Consumo do solvente no extrato e no refinado como função do tempo de troca para $\beta_1=\beta_4=1,15$ e $\beta_2=\beta_3=1,05$. Os símbolos são pontos calculados.....	83

Figura 5.11: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Os símbolos são pontos simulados. $\beta_1=\beta_4=1,05$ e $\beta_2=1,10$; $\beta_3=1,25$85

Figura 5.12: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Os símbolos são pontos simulados. $\beta_1=\beta_4=1,05$ e $\beta_2=1,25$; $\beta_3=1,10$87

Figura 5.13.a: Perfis dinâmicos do extrato e do refinado. Tempo de troca igual a 7,50 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas puras. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL, $K_{A-La}=0,873$ e $K_{B-Lg}=1,963$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,41%. Consumo do solvente no extrato foi igual a 2,04 mL/mg e o consumo do solvente no refinado foi igual a 2,37 mL/mg.....90

Figura 5.13.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona). Tempo de troca igual a 7,50 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas puras. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,41%. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL, $K_{A-La}=0,873$ e $K_{B-Lg}=1,963$91

Figura 5.13.c: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL, $K_{A-La}=0,873$ e $K_{B-Lg}=1,963$. Os símbolos são pontos obtidos na simulação.....92

Figura 5.14: Curvas de *breakthrough* experimentais para a mistura 1:1 da proteínas A-La e B-Lg e o modelo (linhas) de força motriz linear aplicado para uma coluna 9,4 x 1,6 cm. A concentração na alimentação foi 1,0 mg/mL para ambas proteínas em tampão Bis-Tris-HCl pH 6,5 com 250 mM NaCl e a vazão foi 1,0 mL/min. Resina Accell-Plus QMA . Temperatura foi 25 °C.....93

Figura 5.15.a: Perfis dinâmicos do extrato e do refinado obtidos pelo modelo que considera a taxa de adsorção representada por força motriz linear. Tempo de troca igual a 9,0 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura 1:1; $K_{A-La}=0,93$ e $K_{B-Lg}=1,26$. Parâmetros de transferência de massa: $k_{fa,v}=3,5 \text{ min}^{-1}$ para a A-La e $k_{fb,v}=4,3 \text{ min}^{-1}$ para a B-Lg. Pureza do extrato: 97,9%; pureza do refinado: 100%. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para ambas proteínas. Consumo do solvente no extrato foi igual a 10,19 mL/mg e o consumo do solvente no refinado foi igual a 4,14 mL/mg.....95

Figura 5.15.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera a taxa de adsorção representada por força motriz linear. Tempo de troca igual a 9,0 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura 1:1; $K_{A-La}=0,93$ e $K_{B-Lg}=1,26$. Pureza do extrato: 97,9%; pureza do refinado: 100%. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para ambas proteínas.....96

Figura 5.15.c: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0 \text{ mg/mL}$ e $C_{B-Lg,A}=1,0 \text{ mg/mL}$.

Os símbolos são pontos obtidos na simulação do LMS que considera a taxa de adsorção representada por força motriz linear.....97

Figura 5.16.a: Perfis dinâmicos do extrato e do refinado. Tempo de troca igual a 9,00 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas na mistura binária 1:1. $C_{A-La,R}=0,70$ mg/mL e $C_{B-Lg,E}=0,03$ mg/mL, $K_{A-La}=0,93$ e $K_{B-Lg}=1,26$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 100%. Consumo do solvente no extrato foi igual a 52,02 mL/mg e o consumo do solvente no refinado foi igual a 2,49 mL/mg. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL.....98

Figura 5.16.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona). Tempo de troca igual a 9,00 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas na mistura binária 1:1. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 100%. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL, $K_{A-La}=0,93$ e $K_{B-Lg}=1,26$99

Figura 5.16.c: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL. $K_{A-La}=0,93$ e $K_{B-Lg}=1,26$. Os símbolos são pontos simulados.....100

Figura 5.17: Isotermas competitivas aplicadas na rotina do LMS competitivo.....101

Figura 5.18.a: Perfis de concentrações dinâmicos do extrato e refinado para o LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera adsorção competitiva. Tempo de troca igual

a 17,50 minutos. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 100%. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para ambas proteínas. Concentração da A-La no refinado= 0,994 mg/mL e concentração da B-Lg no extrato= 0,152 mg/mL.....103

Figura 5.18.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera adsorção competitiva. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para ambas proteínas. Tempo de troca igual a 17,50 minutos. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 100%. Concentração da A-La no refinado=0,994 mg/mL e concentração da B-Lg no extrato= 0,152 mg/mL. CSE=10,23 mL/mg; CSR=1,75 mL/mg.....104

Figura 5.18.c: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera adsorção competitiva. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para ambas proteínas. Tempo de troca igual a 16,50 minutos. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,31%. Concentração da A-La no refinado=0,924 mg/mL e concentração da B-Lg no extrato= 0,410 mg/mL. CSE=3,81 mL/mg; CSR=1,88 mL/mg.....105

Figura 5.18.d: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL. Os símbolos são pontos obtidos na simulação do LMS aplicando os parâmetros das isotermas competitivas.....106

Figura 5.19: Consumo do solvente no extrato e no refinado como função do tempo de troca para o LMS Langmuir competitivo.

Os símbolos são pontos calculados.....107

Capítulo Seis

Figura 6.1:Exemplo de pontos a serem verificados experimentalmente
para a A-La e para a B-Lg após atingido o estado estacionário
no extrato e no refinado.....112

Lista de Tabelas

Capítulo Dois

Tabela 2.1: Componentes do leite bovino e humano (James, 1994).....	9
Tabela 2.2- Composição protéica do soro do leite bovino (*Hambraeus, 1982).....	10
Tabela 2.3: Grupos funcionais mais comuns em trocadores de íons (James, 1994)..	14
Tabela 2.4: Trabalhos utilizando LMS na separação de bioprodutos.....	25
Tabela 2.5: Escolha entre processo de separação em batelada e em LMS.....	26

Capítulo Cinco

Tabela 5.1.a: Vazões de entrada (alimentação e dessorvente) e de saída (extrato e refinado) para cinco conjuntos do parâmetro de segurança β_j	88
Tabela 5.1.b: Concentrações, pureza e consumo de solvente no extrato e no refinado para cinco conjuntos do parâmetro de segurança β_j com o tempo de troca igual a 7,50 minutos.....	88

Capítulo Seis

Tabela 6.1.a: Influência de β_3 na vazão, concentração da B-Lg e consumo do solvente no extrato.....	114
---	-----

Tabela 6.1.b: Influência de β_2 na vazão, concentração da A-La e consumo do solvente no refinado.....114

Tabela 6.2: Mudanças nos fatores β_j causados por um aumento em cada uma das quatro vazões do LMS; (\downarrow = diminui, \uparrow = aumenta).....114

Nomenclatura

A = área da seção transversal da coluna, cm^2

a_v = área específica do adsorvente, $\text{cm}^2.\text{cm}^{-3}$

C^* = concentração no líquido em equilíbrio com a do adsorvente, mg.mL^{-1}

C = concentração na fase líquida, mg.mL^{-1}

D_{ax} = coeficiente de dispersão axial, $\text{cm}^2.\text{min}^{-1}$

K = coeficiente de distribuição do componente , adimensional

K = coeficiente de distribuição do componente , mL.g^{-1}

K^a = constante de associação na equação de Langmuir competitiva, mL.mg^{-1}

K^d = constante de dissociação na equação de Langmuir, mg.mL^{-1}

k_a = constante de adsorção, $\text{mL.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$

k_d = constante de dessorção, min^{-1}

k_f = coeficiente global de transferência de massa, cm.min^{-1}

L = comprimento da coluna, cm

q = concentração na fase sólida, mg.g^{-1}

Q = vazão volumétrica, mL.min^{-1}

q^m = capacidade máxima de adsorção para o adsorvente, mg.g^{-1}

T = tempo de troca, min

t = tempo, min

u = velocidade intersticial, cm.min^{-1}

v_o = velocidade superficial, cm.min^{-1}

x = distância normalizada, adimensional

z = direção axial no sentido do fluxo líquido, cm

Símbolos Gregos

α = fator de separação definido na Eq.(8), adimensional

β_j = fator de segurança ($j=1,2,3$ ou 4), adimensional

ε = porosidade do leito, adimensional

γ = razão entre as vazões do sólido e do líquido, adimensional

$$\eta = (1 - \varepsilon) / \varepsilon$$

Subscritos

A= alimentação

D= dessorvente

E= extrato

I, II, III ou IV = zona do leito móvel

i= componente (i=1, 2)

j= zona do LMS (j= I, II, III, IV)

R= refinado

s= sólido

Sobrescritos

ent= entrada da coluna

sai= saída da coluna

Capítulo Um

INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida tradicional em batelada tem sido amplamente utilizada pelas indústrias farmacêuticas, de química fina, de bioprodutos, entre outras, seja para fins analíticos ou também como uma técnica preparativa. Pode-se citar duas principais desvantagens das separações cromatográficas tradicionais: a descontinuidade do processo e a diluição do produto. No intuito de superar essas desvantagens, surgiram os métodos cromatográficos contínuos. Os sistemas cromatográficos contínuos têm sido utilizados em escala industrial desde 1964, principalmente nas indústrias petroquímicas e de processamento de açúcares (Barker e Abusabah, 1985), de química fina (Ganetsos e Barker, 1993) e atualmente, as indústrias de biotecnologia têm mostrado um interesse crescente pelos sistemas cromatográficos contínuos. Os processos contínuos apresentam produtividade mais alta e permitem uma utilização mais eficiente da fase adsorvente, pois a força motriz é mantida mais elevada, o que melhora a transferência de massa.

Dentre os sistemas de separação contínua, o processo mais conhecido é o SORBEX (Broughton, 1961), que foi desenvolvido pela Universal Oil Products (UOP) nos Estados Unidos e que originou o processo conhecido como leito móvel simulado. Há dois tipos principais de leitos móveis: o leito móvel verdadeiro (LMV) e o leito móvel simulado (LMS). O LMV é um sistema cromatográfico contínuo tradicional no qual há um escoamento real da fase sólida adsorvente que é efetuado numa direção oposta ao escoamento da fase líquida. Porém, devido às dificuldades associadas para promover o escoamento uniforme da fase sólida e a degeneração desta fase devido ao atrito, o escoamento contracorrente entre as fases sólida e líquida pode ser obtido simulando o movimento da fase sólida através de uma adequada e periódica troca nas posições das entradas e saídas do sistema ao

longo do leito que passa a ser composto por várias colunas conectadas na forma de um circuito. Essas trocas são efetuadas em intervalos regulares e, dessa forma, acabam por promover um movimento relativo contracorrente dando origem ao leito móvel simulado. O uso de válvulas rotativas especiais permite fazer as trocas das correntes de forma simultânea e eficiente, controladas por computador.

O LMS é dividido em 4 zonas (ou seções) e apresenta duas linhas de entrada, sendo uma a alimentação e a outra o dessorvente (ou eluente) e duas linhas de saída (ou de retirada), sendo um ponto de retirada do extrato e outro de retirada do refinado (alguns autores chamam de refinado). A Fig.1.1 abaixo mostra um esquema simplificado do LMV e do LMS com oito colunas, sendo duas colunas em cada zona; no entanto, outras configurações são possíveis.

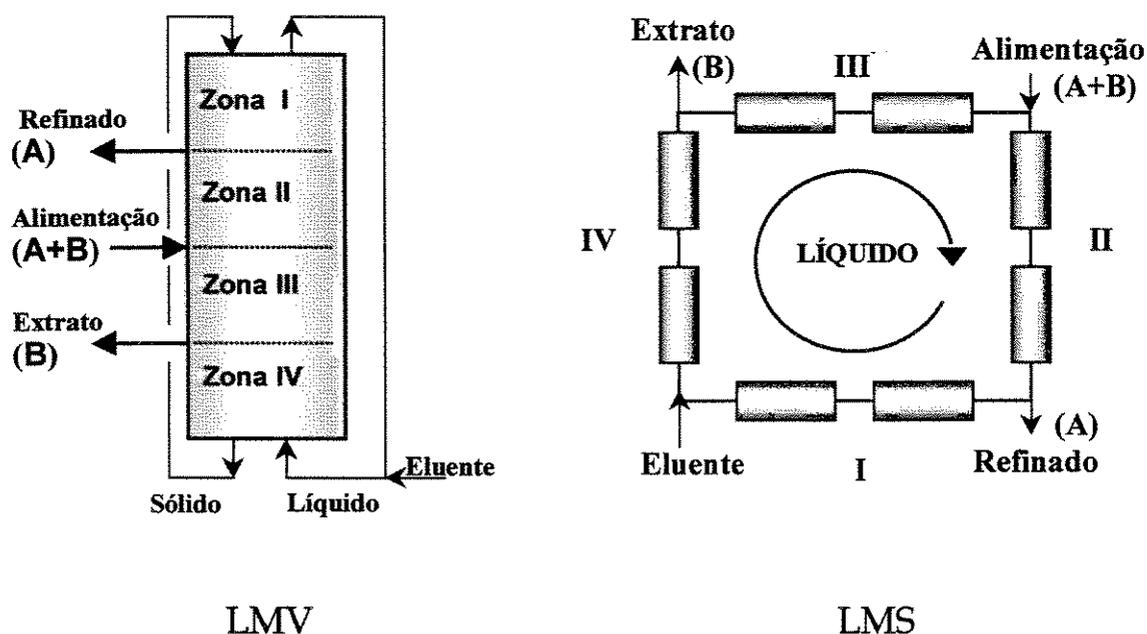


Figura 1.1: Esquema simplificado do LMV (à esquerda) e do LMS (à direita) com 8 colunas. O componente (A) adsorve menos fortemente que o componente (B).

A alimentação é uma mistura homogênea das duas substâncias a serem separadas e numa concentração conhecida, o dessorvente (eluente) em geral, é o próprio meio líquido solvente. No extrato é recuperada a substância que interage mais fortemente com a fase adsorvente e no refinado recupera-se a outra substância, tendo-se dessa forma a separação de ambas. A separação completa só acontece após um certo número de ciclos (um ciclo é o tempo que uma coluna leva para retornar à mesma posição, sendo dado pelo número de colunas do sistema multiplicado pelo tempo de troca). O projeto do LMS é relativamente complexo e envolve pelo menos uma dezena de parâmetros específicos como: diâmetro das colunas, os comprimentos das 4 zonas de separação e respectivas vazões e também o tempo de troca das posições das colunas (ou das entradas e retiradas). O LMS é especialmente indicado para separar moléculas que tenham similares seletividades pelo adsorvente, o que dificulta e encarece a separação num processo cromatográfico convencional em batelada. Como exemplo, temos a separação de isômeros na indústria petroquímica (Furlan, 1994) e a separação dos açúcares glicose e frutose (Hashimoto et al., 1983a).

A utilização do LMS para a separação de biomoléculas como as proteínas tem sido pouco estudada (Gottschlich e Kasche, 1997). As moléculas protéicas são bastante sensíveis às condições de pH, força iônica, temperatura e outras condições ambientais às quais estão submetidas, sendo importante estabelecer condições que promovam a separação contínua desses bioprodutos de interesse comercial. Deve-se fazer uma escolha apropriada da fase sólida adsorvente, da fase líquida e respectivas condições ambientais (pH, força iônica, temperatura, etc) e dos parâmetros de operação do sistema, como as vazões nas diferentes zonas que permitirão o LMS operar de forma eficiente, promovendo a completa separação. Este trabalho, que considera a separação de proteínas em LMS, é o pioneiro neste campo aqui no Brasil.

A modelagem matemática do LMS permite a obtenção de rotinas que conseguem prever, através da execução de programas computacionais, o

comportamento dinâmico do LMS. Através dos resultados obtidos, podemos selecionar as melhores condições de operação as quais servirão de base para uma operação real, o que diminui consideravelmente os custos de operação do sistema.

Os objetivos deste trabalho são obter experimentalmente isotermas de adsorção das proteínas α -lactalbumina (A-La) e β -lactoglobulina (B-Lg) em resinas trocadoras de ânions e desenvolver uma rotina computacional para um sistema LMS com oito colunas (duas colunas por zona) para estudar a separação dessas proteínas a partir da simulação dos perfis de concentração no extrato e no refinado aplicando os parâmetros de equilíbrio obtidos através das isotermas de adsorção utilizando resinas de troca aniônica Accell Plus QMA (Waters Co). Essas proteínas estão presentes no soro do leite bovino em concentrações em torno de 1,0 mg/mL para a A-La e de 3,0 mg/mL para a B-Lg e são importantes fontes nutricionais, sendo, geralmente, resíduos de indústrias de laticínios com aplicações pouco nobres. Infelizmente, por motivos burocráticos alheios à nossa vontade, não foi possível, no transcorrer deste trabalho, a montagem de um sistema LMS para que fosse possível obter resultados experimentais de modo a compará-los com os resultados simulados.

Capítulo Dois

REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo veremos o que são as proteínas e suas características iônicas. Será apresentada a composição do soro do leite, o qual contém as proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina, que são as proteínas de interesse neste trabalho. Também serão vistos os princípios da troca iônica e como ocorrem as separações cromatográficas em colunas contendo resinas trocadoras de íons, visto que um adsorvente de troca iônica foi utilizado para obter os parâmetros de equilíbrio utilizados para simular a separação e purificação da α -lactalbumina e β -lactoglobulina no LMS. Também será visto o que são leitos móveis e as separações em leitos móveis.

2.1- AS PROTEÍNAS

Proteínas são moléculas orgânicas compostas por uma sequência de aminoácidos ligados numa longa cadeia formando um heteropolímero. Representam a maior porção da massa seca de uma célula orgânica. A maioria das moléculas protéicas contém os 20 aminoácidos (aa) mais comuns e centenas deles se ligam formando uma molécula com peso molecular que varia numa faixa de 6×10^3 a 1×10^6 de daltons. As proteínas possuem diferentes funções, dentre as quais podemos destacar a catálise enzimática (ex. amilases, lipases), articulação estrutural (ex. colágeno, elastina), transporte (ex. hemoglobina), hormônios (ex. insulina), defesa (ex. imunoglobulinas) e toxinas (ex. veneno de cobra, ricina).

Farfán (1994) apresenta de forma breve e objetiva o que são as proteínas e os seus resíduos de aminoácidos e como elas são formadas, quais as principais interações e reações a que estão sujeitas e suas aplicações.

As propriedades das proteínas dependem, entre outros fatores, de como os aminoácidos estão dispostos ao longo da cadeia polipeptídica. Os aminoácidos se ligam covalentemente por ligações peptídicas formando uma cadeia polipeptídica não-ramificada. Cada aminoácido possui na sua estrutura química grupos laterais que podem ser não-polares/hidrofóbicos, polares/hidrofílicos com carga ou polares mas sem carga.

A sequência de aminoácidos numa molécula de proteína caracteriza a sua estrutura primária. A estrutura secundária é o primeiro arranjo espacial da molécula e pode ser em hélice, folha-sanfonada, fitas, etc, dependendo da estrutura primária. A estrutura terciária é criada por interações específicas entre os diferentes resíduos (aminoácidos na molécula protéica) provocadas por diferentes forças que incluem pontes de enxofre, hidrogênio, salina, hidrofóbicas entre outras, dando à molécula uma forma globular ou de fibras para a maior parte delas. Podemos ainda ter uma estrutura quaternária, quando os resíduos que ficaram expostos na superfície da estrutura terciária interagem com os resíduos de outra molécula por forças similares àquelas que mantêm a estrutura terciária e assim formam múltiplas unidades de tamanho variável (dímeros, trímeros, tetrâmeros, etc). A Fig.2.1 representa, de forma simplificada, os tipos de estruturas protéicas.

Indústrias em todo o mundo processam anualmente milhões de toneladas de produtos protéicos gerando uma grande quantidade de resíduos ricos em proteínas que, por apresentarem alto valor biológico, têm despertado uma crescente necessidade de aproveitá-los para fins de nutrição humana ou animal. Além disso, a produção de proteínas com funções terapêuticas, entre outras, revela a necessidade de se desenvolver, a custos cada vez menores, processos biotecnológicos eficientes para a recuperação, separação e purificação dessas proteínas a partir do meio onde foram produzidas (Atkinson e Sainter, 1982).

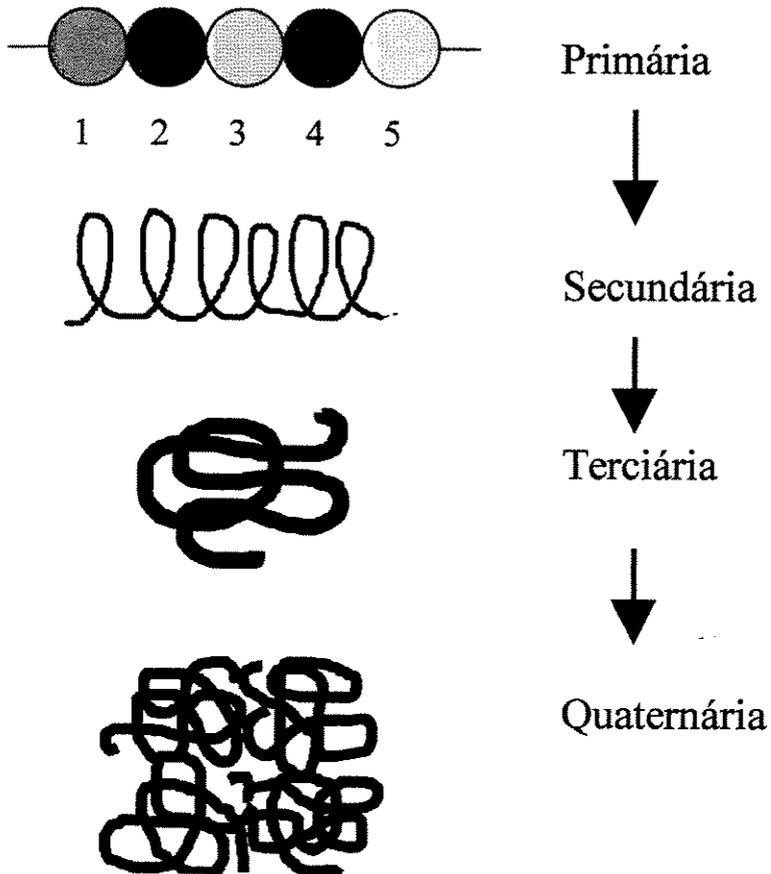


Figura 2.1: Estruturas das moléculas de proteínas.

2.1.1- CARACTERÍSTICAS IÔNICAS DAS PROTEÍNAS

Como vimos, as proteínas apresentam uma longa cadeia polipeptídica com resíduos de aminoácidos. Assim, além dos grupos carboxil e amino presentes nas extremidades da cadeia polipeptídica, os resíduos R dos diferentes aminoácidos que formam a estrutura primária da proteína podem ser positivamente ou negativamente carregados, dependendo do pH da solução, sendo, dessa forma, um polieletrólito. A carga líquida da proteína varia com o pH e depende do número e tipos de grupos R ionizáveis contidos na molécula. Em geral, as proteínas estão positivamente carregadas em baixos pH e negativamente carregadas em altos valores de pH. Para cada proteína há um valor de pH chamado ponto isoelétrico (pI), no qual a carga líquida é nula. A relação entre carga líquida e o pH pode ser determinada experimentalmente utilizando íons H^+ para fazer a titulação e assim é possível conhecer o pI da molécula. Pode se afirmar que para valores de pH abaixo do pI, a carga líquida é positiva e para valores de pH acima do pI a carga líquida é negativa e maior será o número de cargas à medida que o pH se distancia do pI.

2.2- AS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

O soro de leite é um produto biológico proveniente das indústrias de laticínios e possui em sua composição substâncias como peptídeos, aminoácidos, lactose, ácido láctico, proteínas, resíduos de caseínas e de gordura do leite e minerais. O soro do leite é um subproduto obtido após a coagulação da caseína do leite durante a produção de queijos.

Em 1990, a produção mundial do soro de queijo foi estimada em cerca de 102,6 milhões de toneladas, que contêm cerca de 6,1 milhões de toneladas de matéria seca com alto conteúdo protéico. A principal aplicação para o soro do leite têm sido na alimentação animal, no entanto, alguns trabalhos têm sido dedicados na recuperação de importantes componentes do soro, como as proteínas, que uma

vez separados e purificados adequadamente, podem ser utilizados nas indústrias de alimentos e também farmacêutica (Carrère, 1993).

A Tabela 2.1 mostra a composição do leite bovino comparada com o leite humano (James, 1994).

Tabela 2.1: Componentes do leite bovino e humano (James, 1994)

<i>Componente</i>	<i>Concentração (g/100g) (leite bovino)</i>	<i>Concentração (g/100g) (leite humano)</i>
Água	87,3	87,1
Lactose	4,6	7,1
Lipídeos	3,9	4,5
Proteínas: soro	0,6	0,5
caseína	2,6	0,4
Cinzas	0,7	0,2

As indústrias de alimentos exploram as propriedades funcionais das proteínas tais como absorção e ligação de água, gelatização, elasticidade, entre outras, na produção de alimentos processados como as carnes, linguiças e queijos.

As proteínas que estão presentes em maior quantidade no soro do leite bovino são a β -lactoglobulina, a α -lactalbumina, a albumina e as imunoglobulinas. A Tabela 2.2 apresenta as composições médias e propriedades de algumas proteínas do soro de leite. Como podemos observar, a β -lactoglobulina (B-Lg) e a α -lactalbumina (A-La) são as proteínas encontradas em maior abundância e são sintetizadas nas glândulas mamárias enquanto que a albumina (BSA) e as imunoglobulinas (Ig) são de origem sangüínea. O valor nutricional da B-Lg e da A-La é grande devido à riqueza de aminoácidos que possuem. As imunoglobulinas

têm a importante função de fornecer defesa imunológica. A seguir, teremos mais algumas informações sobre a A-La e a B-Lg que são as proteínas de interesse neste trabalho. A página <http://www.rcsb.org/pdb/searchlite.html> permite acesso a maiores informações sobre proteínas, como estrutura tridimensional animada, seqüência de aminoácidos, etc.

Tabela 2.2- Composição protéica do soro do leite bovino (*Hambraeus, 1982).

<i>Proteína</i>	<i>Concentração* (g/L)</i>	<i>Massa Molecular (KDa)</i>	<i>pI</i>
β -lactoglobulina	3,0	18,4	5,35 - 5,49
α -lactalbumina	0,9	14	4,8
soralbumina	0,3	69	4,9
IgG, IgA, IgM	0,7	150 a 900	6,2 - 7,0
Lactoferrina	0,012	76,8	8,7
Lactoperoxidase	0,030	78	9,6

O leite humano não possui a β -lactoglobulina, enquanto que a α -lactalbumina se encontra com concentrações em torno de 1,6 g/L (James, 1994).

2.2.1- A α -LACTALBUMINA

A α -lactalbumina (A-La) é uma proteína globular com massa molecular aproximada de 14 KDa e ponto isoelétrico igual a 4,8 (Fox, 1989). Apresenta 123 resíduos de aminoácidos, curiosamente, 43 dos quais são seqüências homólogas às encontradas na lisozima do ovo de galinha. Apresenta 4 pontes dissulfeto. Possui uma configuração estável entre os pHs 5,4 e 9,0 e uma molécula pode ligar-se a um íon Ca^{2+} . Em pH 4,0 a proteína se desnatura irreversivelmente e perde o íon Ca^{2+} . A A-La tem um importante papel na nutrição humana, principalmente para as

crianças, devido aos seus resíduos de aminoácidos que suprem os requerimentos ótimos, e também devido a grande quantidade de resíduos de triptofano.

2.2.2. A β -LACTOGLOBULINA

A β -lactoglobulina (B-Lg) é a proteína presente em maior concentração no soro do leite bovino. Apresenta-se como a combinação de duas proteínas: a β -lactoglobulina A e B, sendo que cada uma apresenta 165 resíduos de aminoácidos com duas pontes dissulfeto e uma cistina livre e ambas diferem apenas em dois resíduos de aminoácidos (Liao et al., 1987). Seus pontos isoelétricos se situam entre 5,35 e 5,49. A B-Lg existe como um dímero estável entre os pHs 5,5 e 7,0. Sua massa molecular, na forma monômero, é de aproximadamente 18,4 KDa. Sua forma de monômero é encontrada para pHs abaixo de 3,5 (Swaisgood, 1982). A função fisiológica da B-Lg ainda não está bem estabelecida, mas é suposta a sua participação na ligação e transporte do retinol (precursor da vitamina A), visto que o retinol se liga fortemente à B-Lg, o que impede sua oxidação (Fox, 1989). A B-Lg se desnatura irreversivelmente em temperaturas superiores a 70 °C.

2.3-SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A separação de proteínas geralmente envolve várias etapas e existem numerosas técnicas que muitas vezes devem ser utilizadas em combinação quando se quer obter um produto final com alto teor de pureza (Asenjo,1990). Dentre as técnicas de separação, podemos citar:

- **Precipitação:** uma das técnicas mais antigas de separação de proteínas e que se baseia nas propriedades de solubilidade das proteínas. As proteínas são separadas posteriormente por centrifugação (Tessier et al., 1992). A precipitação pode ser feita pelo uso de sais (*salting-out*),

precipitação no ponto isoelétrico (a solubilidade da proteína é mínima no seu pI), pelo uso de solventes orgânicos, pelo uso de polímeros não-iônicos como o polietilenoglicol, etc. Uma das desvantagens desta técnica está na possível contaminação das proteínas com o agente precipitante.

- *Termocoagulação:* a solução é submetida a temperaturas elevadas sendo então ajustado o pH a fim de provocar a precipitação isoelétrica. Como consequência temos a desnaturação irreversível das moléculas (Tessier et al., 1992).
- *Ultrafiltração e osmose reversa:* permite separar as espécies pela diferença de massa molecular através de uma membrana de porosidade conhecida. Há membranas que permitem a separação de proteínas cuja massa molecular difiram por um fator de 2 (Michaels, 1990).
- *Extração líquido-líquido:* implica na dissolução preferencial de uma proteína entre duas fases líquidas (Asenjo, 1990).
- *Técnicas cromatográficas:* permitem a separação de proteínas quando uma fase estacionária ou fixa é percorrida por uma fase móvel contendo as proteínas e a separação pode se processar devido às diferenças de interações das proteínas com a fase estacionária. Entre os tipos de interações temos as por afinidade, hidrofóbicas, gel filtração, troca iônica. Neste trabalho foi aplicada a interação por troca iônica.

Entre as técnicas citadas, os processos de precipitação, ultrafiltração e os processos cromatográficos apresentam viabilidade industrial, sendo os processos cromatográficos os que podem apresentar melhor resolução na separação (Kaczmarek, 1980).

2.4-PRINCÍPIOS BÁSICOS SOBRE RESINAS DE TROCA IÔNICA

Uma resina de troca iônica apresenta dois componentes principais: o suporte (matriz) e os grupos funcionais nele ligados.

O suporte é um material insolúvel e, apresenta-se geralmente, na forma de partículas esféricas onde os grupos funcionais são ligados covalentemente. Dentre esses suportes temos: a celulose, a agarose, as dextranas, o vidro poroso, a poliacrilamida e os copolímeros. Cada um destes suportes apresenta características distintas de resistência mecânica, resistência física e química e de distribuição de poros as quais devem ser levadas em conta para a aplicação desejada.

Os grupos funcionais ligados ao suporte fazem com que este apresente a capacidade de adsorver proteínas com uma determinada carga. A escolha do trocador de íons (troca de ânions ou cátions) com o grupo funcional apropriado dependerá da carga líquida que a proteína terá, que dependerá do pH do meio onde ela se encontra diluída. Em geral, as proteínas ácidas ($pI < 7,0$) são separadas com trocadores de ânions e as proteínas básicas ($pI > 7,0$), com trocadores de cátions. A capacidade iônica (ou o número de cargas por unidade de volume) de um trocador de íons depende da concentração dos grupos funcionais bem como do seu estado de ionização. Os trocadores de íons podem ser fortes e fracos. Os trocadores de íons fortes são aqueles que mantêm sua carga iônica que os caracterizam numa ampla faixa de pH, pois possuem grupos aniônicos ou catiônicos ditos fortes. O estado de ionização dos grupos fracos tende a variar com o pH e esses grupos possuem faixas mais limitadas de uso. A Tabela 2.3 mostra alguns grupos funcionais que podem ser ligados ao suporte para formar um trocador de íons.

Tabela 2.3: Grupos funcionais mais comuns em trocadores de íons (James, 1994).

Trocadores de ânions	Grupos funcionais	Tipo
Aminoetil (AE-)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	Fraco
Dietilaminoetil (DEAE-)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	Fraco
Quaternário Aminoetil (QAE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	Forte
Quaternário Metilamino (QMA)	$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$	Forte
Trocadores de cátions	Grupos funcionais	Tipo
Carboximetil (CM-)	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	Fraco
Fosfo	$-\text{H}_2\text{PO}_4^-$	Intermediário
Sulfopropil (S-)	$-\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{SO}_3^-$	Forte
Sulfopropil (SP-)	$-\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Forte

2.4.1- CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A cromatografia de troca iônica separa moléculas de acordo com a diferença de suas cargas e utiliza as resinas de troca iônica. Os íons em solução, sejam cátions ou ânions, associam-se com os grupos funcionais da resina de acordo com sua carga e os contra-íons podem ser trocados por um número equivalente de íons de mesma carga. Os trocadores de íons que possuem grupos funcionais carregados positivamente trocam contra-íons carregados negativamente (ânions) e são chamados *trocadores de ânions*. Do mesmo modo, trocadores com grupos funcionais carregados negativamente trocam contra-íons carregados positivamente (cátions) e são chamados *trocadores de cátions*. A Fig.2.2 mostra um esquema dos dois tipos de trocadores de íons.

Como vimos, as proteínas apresentam cargas distribuídas ao longo da sua estrutura, logo, podemos utilizar resinas trocadoras de íons para adsorvê-las. Por exemplo, as resinas trocadoras de ânions possuem grupos funcionais carregados positivamente e assim, interagirão com as cargas negativas de proteínas dissolvidas em soluções com pH acima de seu pI.

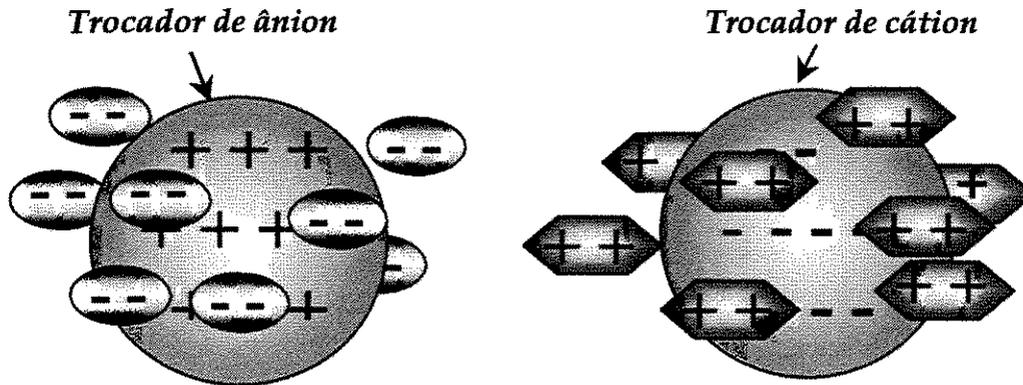


Figura 2.2: Esquema mostrando os dois tipos básicos de troca de íons

2.5 - SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ADSORÇÃO EM RESINAS DE TROCA IÔNICA

Como vimos, as proteínas podem apresentar carga líquida positiva ou negativa dependendo do seu pI e do pH do meio em que se encontra dissolvida. Os princípios básicos da troca iônica podem ser aplicados à esses polieletrólitos (Yamamoto et al., 1988). Uma das vantagens em se usar a cromatografia de troca iônica para separar proteínas, é que as etapas de adsorção e dessorção (ou eluição) podem ser efetuadas sob condições amenas, importante para se manter a atividade biológica dos compostos. A separação é efetuada simplesmente pela diferença de cargas dos diferentes compostos presentes na mistura. Como exemplo simplificado, considere a mistura de duas proteínas A e B com pIs 4,9 e 8,5, respectivamente, que estão dissolvidas em uma solução com pH 7,0. A utilização uma resina trocadora de ânions promoveria uma separação completa entre A e B visto que B não seria adsorvida pois apresenta carga líquida positiva e não trocaria ânions com o adsorvente. A Fig.2.3 mostra esquematicamente este princípio.

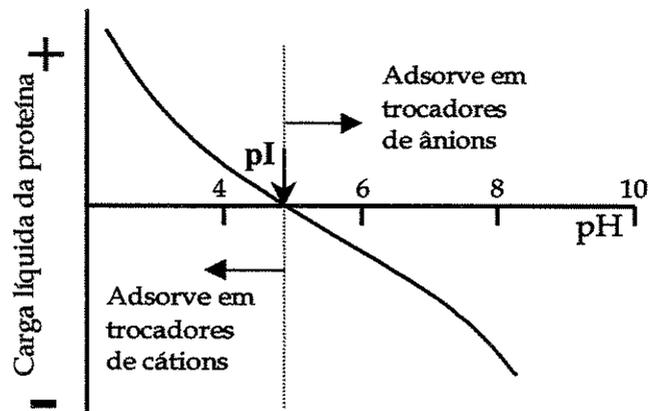


Figura 2.3- Representação esquemática, de acordo com a carga líquida da proteína, do comportamento da adsorção em trocadores de íons como função do pH. pI é o ponto isoelétrico.

As separações por troca iônica podem ser efetuadas em tanques agitados ou em colunas cromatográficas. Em cada caso, o processo é efetuado numa sequência específica de etapas, incluindo a adsorção, a dessorção e a regeneração do adsorvente. A dessorção pode ser feita aumentando a concentração de íons salinos (ex. NaCl) ou mudando-se o pH do meio. O aumento na concentração de íons salinos provoca um aumento na competição pelos grupos funcionais carregados do trocador de íons e como consequência, diminui o número de grupos carregados que possam interagir com a proteína até que esta se dissocie completamente. As mudanças de pH que promovem uma redução na carga total da proteína também promovem uma diminuição das interações da proteína pelo adsorvente até que essa se dissocie. Após a completa dessorção, o adsorvente é regenerado de tal forma que os contra-íons originais do adsorvente sejam recuperados e o mesmo se encontra pronto para repetir o processo (Yamamoto et al., 1988).

2.6- SEPARAÇÕES CROMATOGRÁFICAS EM COLUNAS DE LEITO FIXO

As separações cromatográficas com o uso de colunas contendo a resina adsorvente, comumente são efetuadas em batelada e envolvem etapas alternadas de injeção de uma mistura e de uma solução eluente que pode ser feita em gradiente (a força iônica ou o pH mudam gradativamente com o tempo, podendo ser linear, não-linear, ou em degraus) ou isocriticamente (Yamamoto et al., 1988). A Fig.2.4 mostra um esquema desse tipo de operação. Os diferentes graus de interações (ou afinidade adsortiva) dos componentes presentes na mistura pelo adsorvente contido na coluna resulta em diferentes velocidades de migração desses componentes dentro do leito, o que resulta em diferentes tempos para que cada um deles atinja o outro extremo da coluna. As separações cromatográficas estão baseadas neste fenômeno. Este conceito tem sido desenvolvido e aplicado para análises e purificações em laboratórios, sendo conhecido como técnicas de separações cromatográficas.

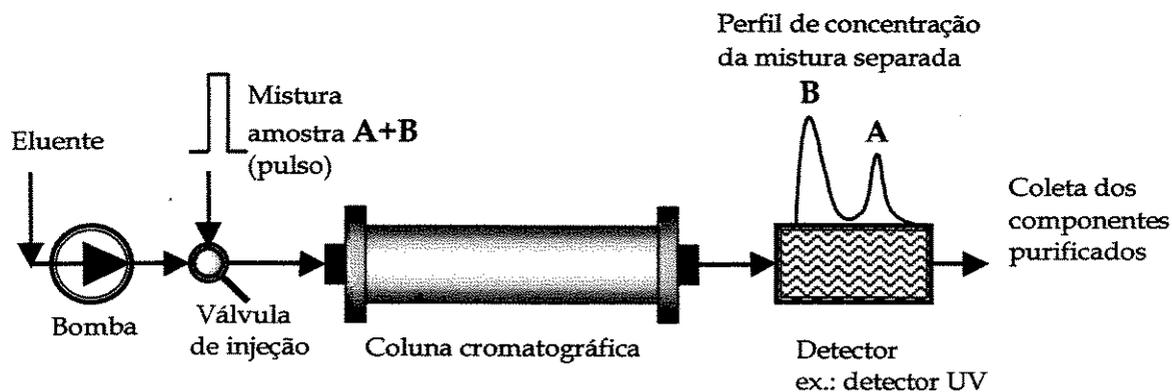


Figura 2.4: Esquema de uma operação de separação cromatográfica.

Os métodos de separações cromatográficas envolvem baixo consumo energético. Além disso, podemos utilizar adsorventes apropriados para promover a separação de componentes que seriam difíceis de separar por outros métodos.

Em geral, a cromatografia líquida é feita em temperatura ambiente, o que previne a perda de atividade ou degradação de componentes sensíveis ao calor, como por exemplo as proteínas.

Embora as técnicas de separações cromatográficas em batelada tenham muitos méritos, os seguintes inconvenientes estão presentes e que devem ser superados para uma aplicação industrial (Hashimoto et al., 1993a):

1. adsorvente presente na coluna nem sempre é utilizado de forma eficiente;
2. Um grande volume de eluente é necessário para eluir os componentes separados, resultando em produtos muito diluídos;
3. Produtos com alto grau de pureza não são obtidos se os componentes da mistura apresentam semelhantes graus de interação com o adsorvente;
4. Descontinuidade do processo.

Nos anos 60 foi desenvolvida a cromatografia líquida com leito móvel simulado (LMS) para uso industrial. O surgimento do LMS superou as inconveniências da cromatografia líquida convencional em batelada e proporcionou a aplicação industrial das técnicas cromatográficas (Broughton, 1961).

A Fig.2.5 mostra como se processa a separação em batelada de dois componentes ao longo da coluna cromatográfica.

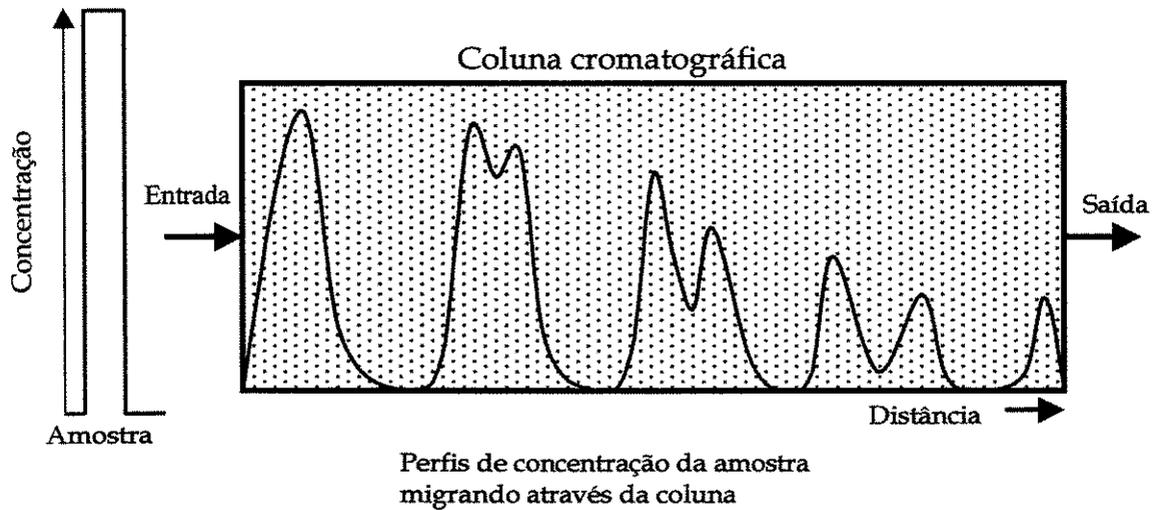


Figura 2.5: Migração de dois componentes de uma amostra ao longo de uma coluna cromatográfica mostrando a separação paulatina dos dois componentes.

Se separarmos a coluna em pequenas seções, poderemos observar que haverá partes com os dois componentes, outras com apenas um componente e outras sem nenhum componente, o que indica uma utilização pouco eficiente do adsorvente num processo cromatográfico em batelada.

2.7- OS LEITOS MÓVEIS E AS SEPARAÇÕES CROMATOGRÁFICAS EM LEITOS MÓVEIS

Um leito móvel é aquele que permite a separação cromatográfica de componentes quando a fase sólida adsorvente escoar numa direção oposta (contracorrente) ao escoamento da fase líquida dentro de uma ou várias colunas. Um leito móvel é dito *verdadeiro* quando há um escoamento real do adsorvente dentro da coluna e é dito *simulado* quando há um escoamento aparente da fase adsorvente.

2.7.1- O LEITO MÓVEL VERDADEIRO (LMV)

Um dos processos de escoamento contracorrente entre a fase sólida adsorvente e a fase líquida é denominado Leito Móvel Verdadeiro (LMV). O LMV foi primeiramente comercializado no início da década de 50 pela UOP nos Estados Unidos. O princípio básico do LMV é mostrado esquematicamente na Fig. 2.6.

No LMV, o sólido adsorvente que deixa a coluna na parte inferior retorna para a coluna pela parte superior, enquanto que o líquido que deixa a coluna pela parte superior retorna pela parte inferior juntamente com o eluente. Uma mistura líquida binária ou pseudo-binária alimenta a coluna no meio. Pode-se considerar uma mistura pseudo-binária quando dentre os vários componentes presentes na mistura, apenas um deles apresenta interações significativas com o adsorvente, ex.: cromatografia de afinidade. Para separar os componentes da mistura, eles têm que ter diferentes graus de interação com o sólido que os adsorve. Os dois componentes da mistura serão chamados de (A) e (B), sendo que o componente (A) adsorve mais fracamente e (B) adsorve mais fortemente ao sólido. A escolha de vazões apropriadas, tanto para a fase sólida como para a fase líquida, permite que o componente (B) adsorvido seja transportado para baixo enquanto que o componente (A) seja transportado para cima juntamente com o líquido. Assim, o componente (B) puro pode ser retirado num ponto da parte inferior da coluna (extrato) enquanto o componente (A) puro é retirado num ponto na parte superior da coluna (refinado). Assim, o LMV separa a mistura em duas partes, sendo que uma parte contém o componente menos adsorvido e a outra o mais fortemente adsorvido.

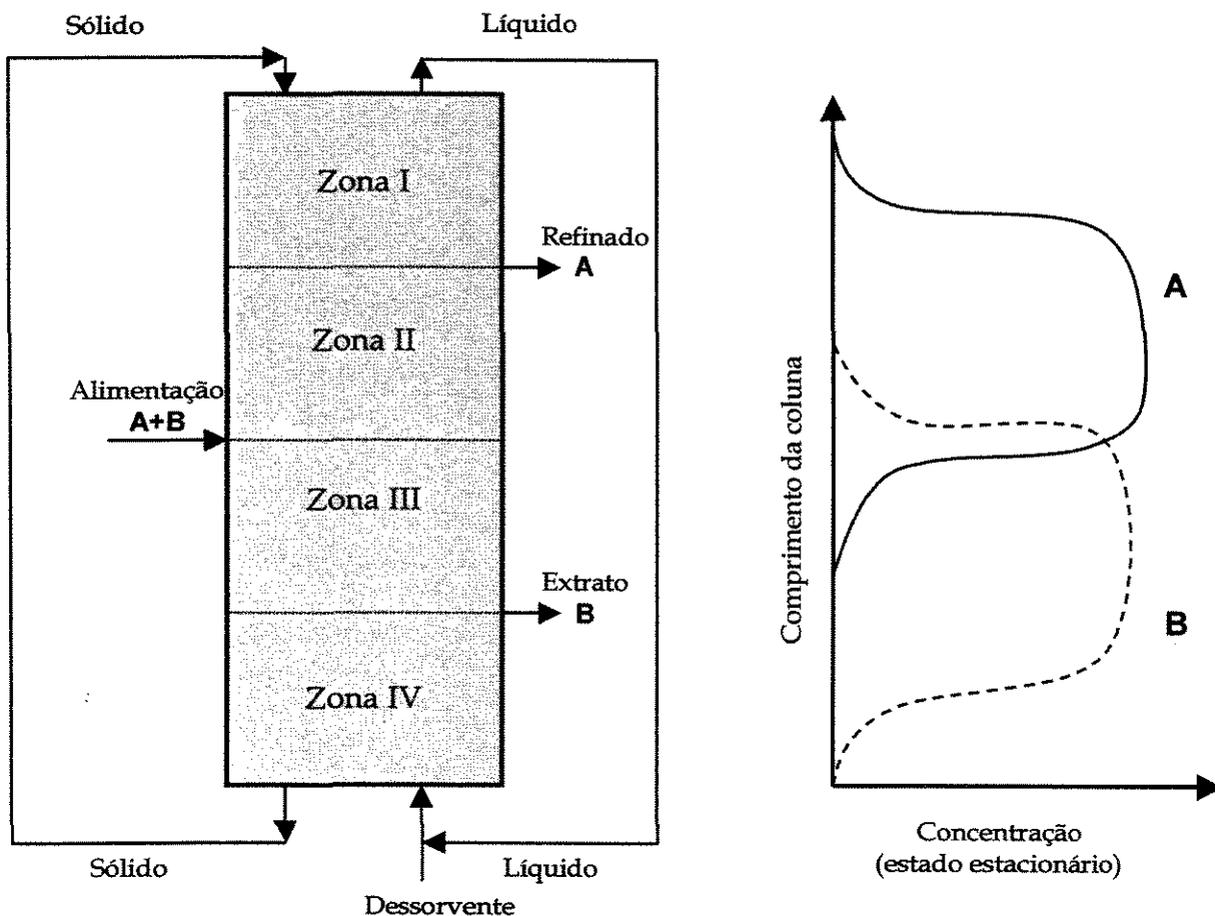


Figura 2.6- Princípio básico do LMV e um típico perfil de concentrações (à direita).

O componente B adsorve mais fortemente que o componente A.

A coluna é dividida em 4 zonas (ou seções) conforme mostrado na Fig.2.6. Cada uma dessas zonas tem diferentes funções no processo de separação.

A alimentação, com concentração e vazão volumétrica bem definidas, é continuamente alimentada na coluna a partir do tempo t_0 . Os componentes da mistura serão distribuídos entre a fase líquida e sólida e seguirão as leis da adsorção e o componente mais fortemente adsorvível enriquecerá a fase sólida. Como todos os componentes estão inicialmente dissolvidos no líquido da

alimentação e devido aos fenômenos de transferência de massa, todas as espécies serão transportadas pelo líquido para a zona II. Como é desejável um alto grau de pureza de (A) no refinado, todo o componente (B) deve ser adsorvido na zona II a partir de sua alimentação até o ponto de retirada do refinado. Assim, a função da zona II é adsorver o componente (B) para separá-lo de (A).

Uma situação oposta ocorre na zona III. Nesta seção, todo o componente (A) tem que ser dessorvido do sólido de tal forma que a corrente líquida o empurre de volta para a zona II. Assim, a zona III também tem uma função de separação.

A zona IV é onde ocorre a limpeza do sólido. Todos os componentes que atingem essa seção devem ser dessorvidos para que apenas o adsorvente regenerado saia na parte inferior da coluna e seja reciclado pela parte superior. Assim, a zona IV tem por função a limpeza do sólido.

Na zona I, o líquido é que deve ser limpo de modo que saia da coluna sem os componentes em solução e possa ser reciclado pela parte inferior. Desta forma, diminui a demanda de dessorvente.

Se vazões apropriadas forem utilizadas em cada zona do LMV, um perfil de concentrações ao longo do leito tal como mostrado na Fig. 2.6 (à direita) será obtido. O refinado praticamente não terá o componente (B) e o extrato não terá o componente (A). Assim, as vazões volumétricas do líquido e do sólido são os parâmetros mais importantes na operação de leitos móveis, pois afetam diretamente a performance da separação (Hashimoto et al., 1993a).

A análise do processo de separação utilizando LMV tem mostrado que suas zonas possuem importância diferenciada (Storti et al., 1988). A mais importante seção é a zona II de separação, pois a mistura da alimentação é transportada primeiramente para essa zona e o componente (B) tem que ser aí adsorvido para não atingir a zona I. Portanto, a maior parte da capacidade de

separação do sistema deverá ser concentrada nesta zona, que poderá ser a mais longa do LMV.

Uma das maiores inconveniências do LMV é que o transporte do sólido é difícil de ser feito e não ocorre de forma uniforme e, além disso, problemas de atrito provocam uma rápida degradação do adsorvente. Uma das formas de evitar tais inconveniências é utilizar o Leito Móvel Simulado, que será explicado a seguir.

2.7.2- O LEITO MÓVEL SIMULADO (LMS)

O LMS foi desenvolvido no início dos anos 60 pela Universal Oil Products Company (UOP) (Broughton, 1961) para superar as principais dificuldades de operação do LMV citadas anteriormente. No LMS, há apenas um escoamento aparente da fase sólida. O LMS foi aplicado na separação industrial de xilenos e também na separação de glicose e frutose (Hashimoto et al., 1983). Um esquema do LMS com oito colunas (duas por zona) é mostrado na Fig. 2.7, no entanto, o LMS pode apresentar diferentes configurações.

Pode-se dizer que uma coluna cromatográfica longa contendo o adsorvente foi dividida em várias colunas menores que estão conectadas em série por meio de tubos. Os pontos de entrada (alimentação e dessorvente) e saída (extrato e refinado) são movidos periodicamente para a próxima coluna na direção do escoamento do líquido, resultando num movimento contracorrente entre o líquido e o sólido adsorvente. O processo LMS apresenta praticamente o mesmo desempenho do LMV, que possui um movimento real das partículas adsorventes (Hashimoto et al., 1993a) e ainda, o LMS seria equivalente ao LMV quando aquele possui um número infinito de colunas (Hidajat et. al, 1986). Uma válvula rotativa foi especialmente projetada para fazer a troca dos pontos de entrada e saída de líquido no LMS e substitui dezenas de válvulas elétricas que também podem ser utilizadas para a mesma finalidade (Ching e Ruthven, 1984).

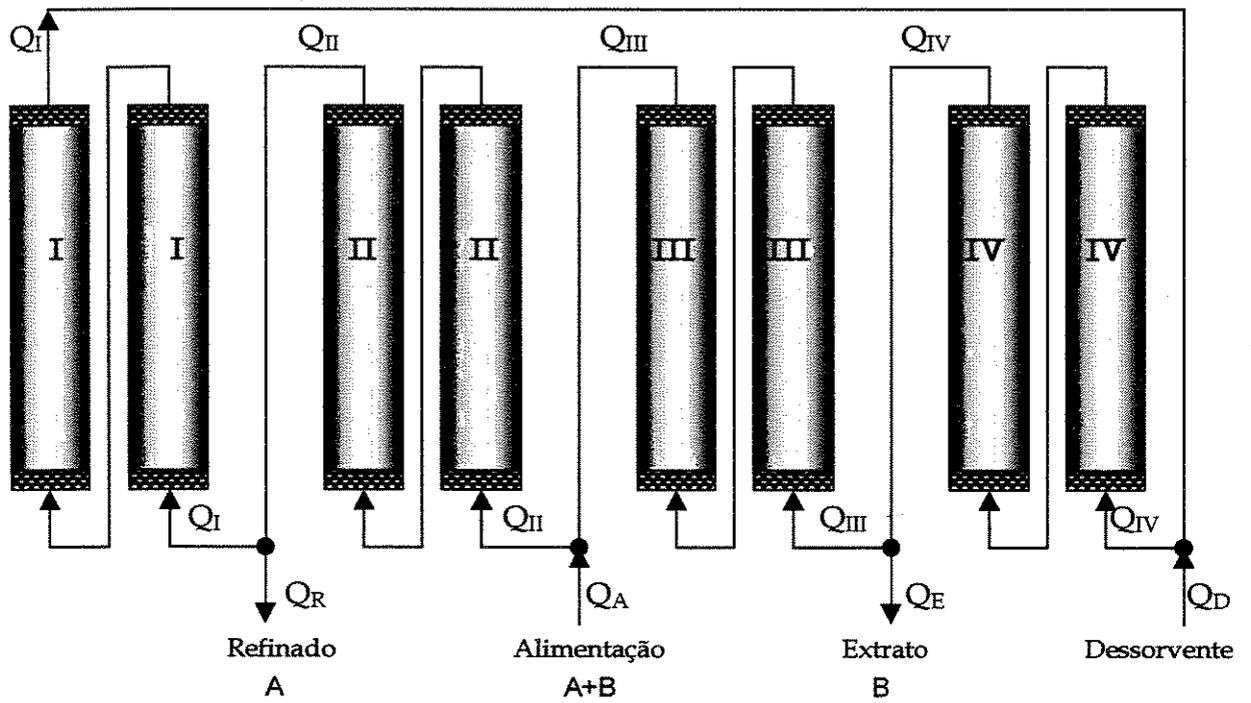


Figura 2.7: Esquema do LMS com oito colunas e as quatro zonas.

A tabela 2.4 mostra alguns trabalhos realizados com o uso do LMS para separar produtos de origem biológica.

Tabela 2.4: Trabalhos utilizando LMS na separação de bioprodutos.

<i>Substâncias</i>	<i>Tipo de Separação</i>	<i>Referência</i>
Anticorpos monoclonais	Bioafinidade	Gottschlich e Kasche, 1997
Enzimas	Bioafinidade	Gottschlich et al, 1996
Proteína/NH ₄ SO ₄	Filtração em gel	Hashimoto et al, 1993a
Fenilalanina/NaCl	Hidrofóbica	Hashimoto et al., 1993a
Ac.glutâmico/Glutationa	Troca iônica	Maki et al., 1987
Enzimas	Bioafinidade	Huang et al., 1986

A operação do LMS utilizando adsorventes de bioafinidade é bastante complexa devido ao uso de diferentes composições das soluções nas zonas de adsorção e de dessorção conforme observado nos trabalhos de Huang e colaboradores (1986) e de Gottschlich e colaboradores (1997 e 1996). Adsorventes de afinidade são utilizados principalmente na separação de misturas pseudo-binárias.

O uso do LMS é indicado para separar de forma contínua misturas binárias (ou pseudo-binárias) e sua aplicação para separar mixturas complexas contendo vários componentes com similares seletividades pelo adsorvente não está bem esclarecida. Neste caso, apenas uma das correntes poderá ser obtida pura (Hashimoto,1993b).

A tabela 2.5 mostra os critérios que podem auxiliar na escolha entre um processo de separação cromatográfico em batelada ou a separação contínua em leito móvel simulado (LMS).

Tabela 2.5: Escolha entre processo de separação em batelada ou em LMS.

<i>Critério</i>	<i>Baixo</i>	<i>Alto</i>
Fator de separação	LMS	batelada
Escala de produção	batelada	LMS
Custo do adsorvente	batelada	LMS
Custo do Eluente	batelada	LMS
Custo de mão-de-obra	batelada	LMS
Valor do produto	LMS	batelada
Margem de lucro	LMS	batelada
Esforço no projeto	batelada	LMS
Investimento	batelada	LMS

Capítulo Três

MODELAGEM MATEMÁTICA PARA O LMS

A modelagem do LMS consiste de duas partes:

1. A modelagem da coluna;
2. A modelagem dos nós de ligação entre as zonas do LMS;

Ainda, é necessário estabelecer as condições de separação para que o LMS possa operar de forma eficiente, com a correta combinação de vazões nas diferentes zonas (Yun et al., 1997).

3.1-MODELAGEM DA COLUNA

Cada coluna do LMS coincide com a operação do leito fixo com uma coluna até o momento da troca de posição dos pontos de entrada e de saída do sistema na direção do escoamento do líquido, o que é equivalente a rotação das colunas, simulando um movimento contracorrente entre as fases sólida e líquida.

O número de parâmetros exigidos num determinado modelo aumentam juntamente com a complexidade do modelo. Ruthven (1984) apresenta diferentes classificações para os modelos da coluna de acordo com a complexidade do modelo cinético:

- (a) A resistência à transferência de massa é desprezível e é assumido equilíbrio instantâneo em todos os pontos da coluna.

- (b) A resistência à transferência de massa é combinada numa única constante global de transferência de massa num modelo chamado de força motriz linear.
- (c) A resistência à transferência de massa é considerada no filme externo à partícula adsorvente e também se considera a difusão interna nos poros do adsorvente, é o modelo de duas resistências.
- (d) A resistência à transferência de massa é considerada no filme externo à partícula adsorvente, resistência a difusão interna nos poros do adsorvente considerando duas resistências difusionais intrapartícula (macroporos-microporos). É o modelo de três resistências, sendo o mais complexo e generalizado.

Para o LMS serão desenvolvidos os casos (a) e (b). Tais modelos têm sido aplicados com êxito na cromatografia líquida para o caso do LMS (Gottschlich et al., 1996, Hashimoto et al, 1993a; Maki et al., 1987).

Suponha que uma coluna de comprimento L e área da seção transversal A contenha um adsorvente para uma substância i presente numa solução que é alimentada continuamente nesta coluna com uma vazão volumétrica Q. O balanço de massa para o componente i pode ser escrito na forma genérica como:

$$\left[\begin{array}{c} \text{acúmulo} \\ \text{no líquido} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{escoamento} \\ \text{convectivo} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{acúmulo} \\ \text{no sólido} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{efeitos da} \\ \text{dispersão axial} \end{array} \right] \quad (3.1)$$

A Fig.3.1 mostra um elemento diferencial de volume em uma coluna contendo partículas de adsorvente.

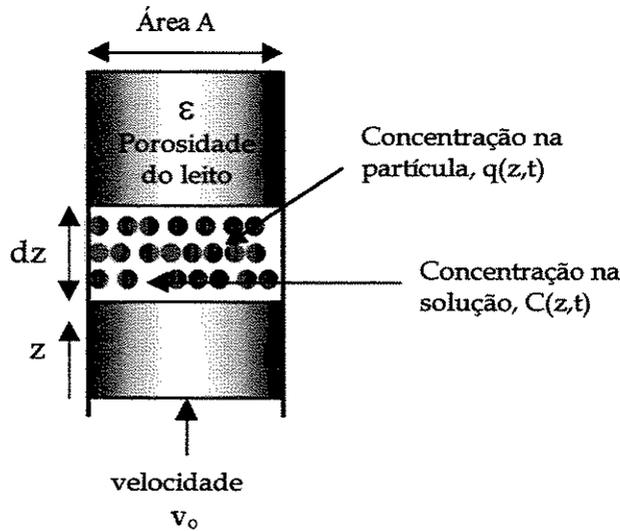


Figura 3.1: Elemento de volume diferencial numa coluna.

Matematicamente, a Eq.(3.1) pode ser escrita na seguinte forma:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \left(\frac{v_o}{\varepsilon} \right) \frac{\partial C_i}{\partial z} + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial q_i}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (3.2)$$

onde C_i é a concentração do componente na fase líquida, v_o é a velocidade superficial que é razão entre a vazão Q de líquido e a área A da seção transversal da coluna por onde o líquido escoar, ε é a porosidade do leito, q_i é a concentração média do componente i na fase sólida adsorvente, D_{ax} é o coeficiente de dispersão axial, z é a coordenada axial, positiva na direção do fluxo e t é a coordenada de tempo.

Para o LMS, a Eq.(3.2) é aplicada para misturas binárias ($i=1, 2$) em cada coluna do LMS nas diferentes zonas j ($j=I, II, III, IV$):

$$\frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} + u_j \frac{\partial C_{i,j}}{\partial z} + \eta \frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 C_{i,j}}{\partial z^2} \quad (3.3)$$

onde u_j é a velocidade intersticial na zona j e $\eta = \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}$

A Eq.(3.3) é chamada de modelo *equilíbrio-dispersivo* e quando $D_{ax}=0$, é chamada de *modelo ideal* (Zhong e Guiochon, 1996).

Para o caso do LMS devemos ter as seguintes condições iniciais e de contorno:

- As condições iniciais são:

$$C_{i,j}(z,0) = 0, \quad q_{i,j}(z,0) = 0 \quad (3.4a)$$

Ou seja, antes da operação do LMS, todas as colunas com o adsorvente foram equilibradas com a fase móvel desprovida dos componentes que serão separados.

- As condições de contorno são:

$$u_j C_{i,j}(0,t) - D_{ax} \frac{\partial C_{i,j}}{\partial z}(0,t) = u_j C_{i,j}^{ent} \quad (3.4b)$$

$$\frac{\partial C_{i,j}}{\partial z}(L,t) = 0 \quad (3.4c)$$

onde $C_{i,j}^{ent}$ é a concentração na entrada de cada coluna do LMS que será dada pelo balanço de massa em cada um dos nós do sistema. A Eq.(3.4b) é chamada de condição de Danckwerts, sendo uma condição geral do modelo e pode ser aplicada para o modelo ideal ($D_{ax}=0$). A Eq.(3.4c) é para o topo de cada coluna.

Na operação do LMS, os pontos de entrada (dessorvente e alimentação) e de saída (extrato e refinado) são trocados periodicamente após o tempo de troca T para a próxima posição na direção do escoamento do líquido. Imediatamente após T , as condições iniciais e de contorno são atualizadas para cada coluna de acordo com os perfis de concentração nas diferentes zonas do LMS presentes no momento da troca.

A concentração do componente i na fase adsorvida é função de sua concentração na fase líquida, ou seja, $q_i = q_i(C_i)$. Considerando equilíbrio local instantâneo ao longo da coluna, a concentração do componente i na fase líquida móvel pode ser obtida pelas relações de equilíbrio ou isotermas de adsorção dos componentes e podemos utilizar a regra da cadeia para que apenas a concentração de equilíbrio no líquido apareça na Eq.(3.3). Assim temos:

$$\frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} = \frac{\partial q_{i,j}}{\partial C_{i,j}} \left(\frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} \right) = f' \left(\frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} \right) \quad (3.5a)$$

$$\text{Sendo } f' = \frac{\partial q_{i,j}}{\partial C_{i,j}} \quad (3.5b)$$

Então, a Eq.(3.3) pode ser escrita como:

$$(1 + \eta f') \frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} + u_j \frac{\partial C_{i,j}}{\partial z} = D_{ax} \frac{\partial^2 C_{i,j}}{\partial z^2} \quad (3.6)$$

Como vimos, através das relações de equilíbrio (isotermas) nós podemos obter relações entre a concentração do componente i na fase sólida adsorvente (resina) e a concentração do componente i na fase líquida móvel. Podemos considerar os seguintes tipos de isotermas:

1. *Isoterma linear:*

As isotermas de adsorção linear podem ser representadas matematicamente como:

$$q_{i,j} = K_i C_{i,j} \quad (3.7)$$

onde K_i pode ser chamado de coeficiente de distribuição, sendo adimensional e $q_{i,j}$ é expresso como massa adsorvida por unidade de volume de adsorvente.

Aqui, assumiremos que o componente 1 adsorve mais fracamente que o componente 2, logo $K_1 < K_2$ e o fator de separação α é definido como:

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} > 1 \quad \text{é o fator de separação} \quad (3.8)$$

Neste caso, de isoterma linear, temos da Eq.(3.5b):

$$f' = K_i \quad (3.9)$$

Considerando equilíbrio local e substituindo a Eq.(3.9) na Eq.(3.6) temos:

$$(1 + \eta K_i) \frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} + u_j \frac{\partial C_{i,j}}{\partial z} = D_{ax} \frac{\partial^2 C_{i,j}}{\partial z^2} \quad (3.10)$$

A Eq.(3.10) pode ser escrita numa forma semidimensional fazendo uma normalização da distância axial z pelo comprimento da coluna L , ou seja, $x=z/L$ e assim obtemos a Eq.(3.11) para cada zona j do LMS:

$$(1 + \eta K_i) \frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} + \left(\frac{u_j}{L} \right) \frac{\partial C_{i,j}}{\partial x} = \left(\frac{D_{ax}}{L^2} \right) \frac{\partial^2 C_{i,j}}{\partial x^2} \quad (3.11)$$

2. Isoterma do tipo Langmuir:

Neste caso, considera-se que a taxa de adsorção do componente i , numa interação monovalente e reversível com os sítios adsorventes, seja dada por:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_a C_i (q_i^m - q_i) - k_d q_i \quad (3.12a)$$

onde k_a e k_d são as constantes de adsorção e dessorção, respectivamente, e são parâmetros que combinam efeitos cinéticos e de transferência de massa, q_i^m é a máxima capacidade de adsorção que o adsorvente possui pelo componente i . Quando o equilíbrio da adsorção é atingido, ou seja, quando a taxa líquida de mudança de concentração no adsorvente é nula ($\frac{\partial q_i}{\partial t} = 0$), a Eq.(3.12a) é reduzida para a familiar equação de Langmuir (1916) e nós temos as isotermas de adsorção do tipo Langmuir que podem ser representadas matematicamente como:

$$q_i = \frac{q_i^m C_i}{K_i^d + C_i} \quad (3.12b)$$

onde K_i^d é a constante de dissociação que é dada por k_d/k_a .

Neste caso de isoterma tipo Langmuir temos da Eq.(3.5b):

$$f' = \frac{\partial q_i}{\partial C_i} = \frac{K_i^d q_i^m}{(K_i^d + C_i)^2} \quad (3.13)$$

Após a substituição da Eq.(3.13) na Eq.(3.6) para o LMS e escrevendo na forma semidimensional, obtemos:

$$\left[1 + \frac{\eta K_i^d q_i^m}{(K_i^d + C_{i,j})^2} \right] \frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} + \left(\frac{u_j}{L} \right) \frac{\partial C_{i,j}}{\partial x} = \left(\frac{D_{ax}}{L^2} \right) \frac{\partial^2 C_{i,j}}{\partial x^2} \quad (3.14)$$

3. *Isotermas do tipo Langmuir competitiva*

Neste caso, a concentração de um composto no adsorvente depende da concentração de todos os compostos presentes na fase líquida. A expressão matemática a seguir dá a relação geral para a adsorção de nc compostos (Butler e Ockrent, 1930):

$$q_i = \frac{q_i^m K_i^a C_i}{1 + \sum_{n=1}^{nc} K_n^a C_n} \quad (3.15)$$

onde K^a é a constante de associação (igual a $1/K^d$) para o componente i .

Para o caso de adsorção binária ($nc=2$) podemos escrever para cada zona j do LMS:

$$q_{1,j} = \frac{q_1^m K_1^a C_{1,j}}{1 + K_1^a C_{1,j} + K_2^a C_{2,j}} \quad (3.16a)$$

$$q_{2,j} = \frac{q_2^m K_2^a C_{2,j}}{1 + K_1^a C_{1,j} + K_2^a C_{2,j}} \quad (3.16b)$$

Logo, temos da Eq.(3.5b) a forma simplificada para f'_i :

$$f'_1 = \frac{q_1^m K_1^a (1 + K_2^a C_{2,j})}{(1 + K_1^a C_{1,j} + K_2^a C_{2,j})^2} \quad (3.17a)$$

$$f'_2 = \frac{q_2^m K_2^a (1 + K_1^a C_{1,j})}{(1 + K_1^a C_{1,j} + K_2^a C_{2,j})^2} \quad (3.17b)$$

Considerando equilíbrio local, podemos substituir as Eqs.(3.17a) e (3.17b) na Eq.(3.6). Escrevendo na forma semidimensional, obtemos o seguinte sistema de equações para cada zona do LMS:

$$\left\{ \begin{aligned} & \left[1 + \eta \frac{q_1^m K_1^a (1 + K_2^a C_{2,j})}{(1 + K_1^a C_{1,j} + K_2^a C_{2,j})^2} \right] \frac{\partial C_{1,j}}{\partial t} + \left(\frac{u_j}{L} \right) \frac{\partial C_{1,j}}{\partial x} = \left(\frac{D_{ax}}{L^2} \right) \frac{\partial^2 C_{1,j}}{\partial x^2} \quad (3.18a) \\ & \left[1 + \eta \frac{q_2^m K_2^a (1 + K_1^a C_{1,j})}{(1 + K_1^a C_{1,j} + K_2^a C_{2,j})^2} \right] \frac{\partial C_{2,j}}{\partial t} + \left(\frac{u_j}{L} \right) \frac{\partial C_{2,j}}{\partial x} = \left(\frac{D_{ax}}{L^2} \right) \frac{\partial^2 C_{2,j}}{\partial x^2} \quad (3.18b) \end{aligned} \right.$$

4. Modelo ideal considerando força motriz linear (FML)

Neste caso, a taxa de adsorção na fase sólida é representada por uma relação linear entre a concentração na fase móvel com a concentração de equilíbrio da fase líquida. Matematicamente temos

$$(1 - \varepsilon) \frac{\partial q_i}{\partial t} = k_f a_v (C_i - C_i^*) \quad (3.19)$$

Sabemos, que cada coluna no LMS coincide com o leito fixo com uma coluna até o momento da rotação das colunas. Partindo do balanço de massa relacionando o componente i presente na fase móvel e na fase estacionária adsorvente e considerando o caso ideal ($D_{ax}=0$) temos para o LMS-FML para o caso de isotermas lineares (Hashimoto et al.,1987):

$$\left\{ \begin{aligned} & \varepsilon \frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} = -v_j \frac{\partial C_{i,j}}{\partial z} - k_{f,i} a_v (C_{i,j} - C_{i,j}^*) \quad (3.20) \\ & (1 - \varepsilon) K_i \frac{\partial C_{i,j}^*}{dt} = k_{f,i} a_v (C_{i,j} - C_{i,j}^*) \quad (3.21) \end{aligned} \right.$$

onde: $C_{i,j}^*$ é a concentração de equilíbrio para o componente i na fase líquida na zona j , ε é a porosidade do leito, v_j é a velocidade superficial do fluxo líquido na zona j , $k_{f,i} a_v$ é uma constante combinando o coeficiente global de transferência de massa do componente i ($k_{f,i}$) e a área específica da resina (a_v), respectivamente, K_i é o coeficiente de distribuição do componente i e z é a distância axial na direção do fluxo líquido.

3.2-MODELAGEM DOS NÓS ENTRE AS ZONAS DO LMS

O LMS possui diferentes correntes líquidas que estão interligadas. É de fundamental importância o conhecimento do balanço de massa para cada componente em cada um dos nós de ligação do LMS. As equações do balanço de massa e fluxo em cada nó (ver Fig.2.7) são dadas pelas seguintes equações, nas quais Q_I , Q_{II} , Q_{III} e Q_{IV} são as vazões volumétricas nas correspondentes zonas do LMS, Q_A é a vazão de alimentação, Q_D é a vazão de dessorvente, Q_E é a vazão do extrato e Q_R é a vazão de refinado. Assume-se que não há dispersão nesses nós.

- *Nó de entrada da alimentação:*

$$Q_{III} + Q_A = Q_{II} \quad (3.22a)$$

$$C_{i,III}^{sai} Q_{III} + C_{i,A} Q_A = C_{i,II}^{ent} Q_{II} \quad (3.22b)$$

- *Nó de entrada do dessorvente:*

$$Q_I + Q_D = Q_{IV} \quad (3.23a)$$

$$C_{i,I}^{sai} Q_I + C_{i,D} Q_D = C_{i,IV}^{ent} Q_{IV} \quad (3.23b)$$

sendo que $C_{i,D}$ é igual a zero (solvente desprovido dos solutos adsorvíveis).

- *Nó de saída do extrato:*

$$Q_{IV} - Q_E = Q_{III} \quad (3.24a)$$

$$C_{i,IV}^{sai} = C_{i,III}^{ent} = C_{i,E} \quad (3.24b)$$

- *Nó de saída do refinado:*

$$Q_{II} - Q_R = Q_I \quad (3.25a)$$

$$C_{i,II}^{sai} = C_{i,I}^{ent} = C_{i,R} \quad (3.25b)$$

onde $C_{i,j}^{sai}$ e $C_{i,j}^{ent}$ são as concentrações do componente i na saída e entrada da coluna j , respectivamente, Q_j é a vazão volumétrica através da coluna j e cuja relação com a velocidade da fase líquida é dada por $Q_j = \varepsilon A u_j$, onde A é a área da seção transversal da coluna.

3.3- ESTRATÉGIA DE SOLUÇÃO DOS MODELOS

Os modelos para o LMS com oito colunas (duas colunas por zona) foram resolvidos numericamente, sendo que o sistema foi representado por uma matriz com oito colunas, sendo que cada coluna da matriz corresponde a uma coluna do LMS, e ainda, cada linha da matriz representa uma posição ao longo das colunas do LMS e são os pontos onde se calcula as concentrações durante a integração. As derivadas parciais espaciais foram substituídas pela expressão das diferenças finitas para trás, sendo então integradas no tempo utilizando o algoritmo de Runge-Kutta-Fehlbergh (Gerald e Wheatley, 1994). A partir da coluna de alimentação, acompanhou-se o deslocamento do frente de concentrações nas colunas até atingir o tempo de troca. Neste momento, o tempo virtual transcorrido e as concentrações no extrato e no refinado são armazenadas numa matriz-arquivo.

Quando o tempo de troca é atingido, as colunas da matriz representando o LMS eram trocadas de posição e todas as concentrações eram atualizadas de acordo com a zona do LMS e a integração procedia até que o tempo de troca fosse atingido novamente. Isto foi feito sucessivamente até que o estado estacionário fosse atingido e então os perfis de concentrações internos no LMS (perfis axiais) eram então armazenados em uma outra matriz-arquivo. Este procedimento numérico também foi utilizado na solução do sistema de equações no caso da adsorção competitiva e força motriz linear. Previamente, o algoritmo foi aplicado para uma coluna, resultando nas curvas de *breakthrough* e nos perfis de concentração internos na coluna. Ambos resultados não mostraram instabilidade numérica.

A Fig.3.2 mostra o fluxograma geral da rotina básica desenvolvida para o LMS (o programa computacional era executado além do estado estacionário).

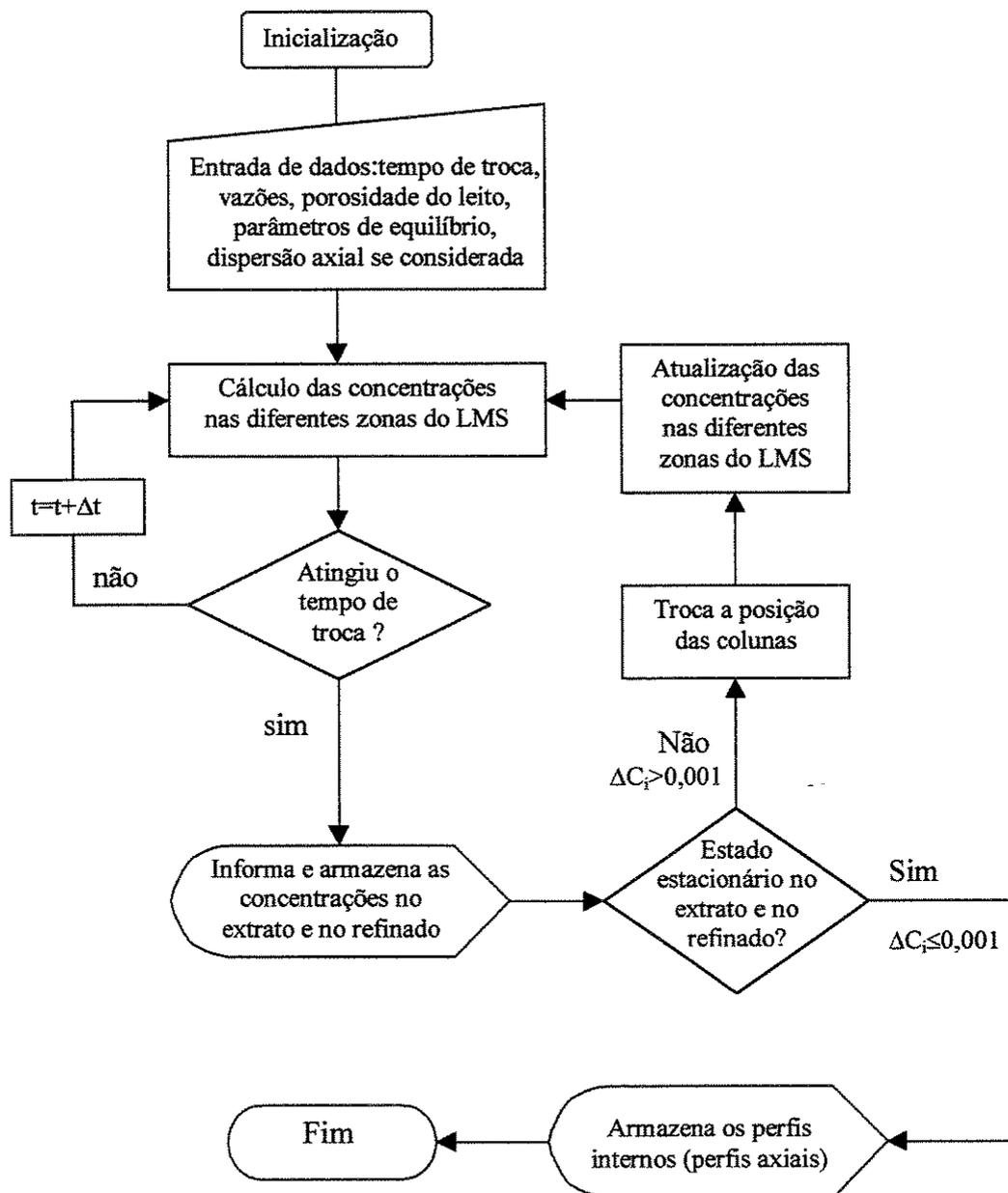


Figura 3.2: Fluxograma da rotina desenvolvida para o LMS.

3.4- CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO

Para o desenvolvimento das condições de separação no LMS, primeiramente foi definido $\gamma_{i,j}$ como a razão entre a vazão mássica do componente i nas fases sólida e líquida na seção j . Ruthven e Ching (1989) mostraram que $\gamma_{i,j}$ é o parâmetro chave de operação do LMS.

$$\gamma_{i,j} = \frac{Q_s q_{i,j}}{Q_j C_{i,j}} = \frac{(1-\varepsilon)u_s q_{i,j}}{\varepsilon(u_j - u_s)C_{i,j}} \xrightarrow{\text{isoterma linear}} = \frac{\eta u_s K_i}{u_j - u_s} \quad (3.26)$$

onde $Q_s=(1-\varepsilon)Au_s$ é a vazão da fase sólida. A vazão mássica na fase líquida na Eq.(26) leva em conta o movimento da fase sólida. A partir da análise de Ruthven e Ching (1989) para o LMV, as seguintes condições devem ser satisfeitas para que a operação seja estável com a completa separação dos componentes (1 é o componente que adsorve menos fortemente):

$$\text{zona I:} \quad \gamma_{1,I} > 1, \quad \gamma_{2,I} > 1 \quad (3.27a)$$

$$\text{zona II:} \quad \gamma_{1,II} < 1, \quad \gamma_{2,II} > 1 \quad (3.27b)$$

$$\text{zona III:} \quad \gamma_{1,III} < 1, \quad \gamma_{2,III} > 1 \quad (3.27c)$$

$$\text{zona IV:} \quad \gamma_{1,IV} < 1, \quad \gamma_{2,IV} < 1 \quad (3.27d)$$

A observação da Fig. 2.6 auxilia na análise das condições acima. Essas oito relações podem ser reduzidas para somente quatro (Ruthven e Ching, 1989) pois nas zonas IV e II o componente que adsorve mais fortemente é o componente crítico e nas zonas III e I o componente crítico é o que adsorve menos. Zhong e Guiochon (1996) utilizaram um único fator de segurança β para todas as zonas, sendo definido como a razão entre as vazões mássicas do componente crítico nas fases sólida e líquida (β =quantidade do componente crítico transportada na fase

sólida/quantidade do componente crítico transportada na fase líquida). A razão é escrita numa forma que β seja maior que 1. Estes autores observaram que a operação do LMS é estável e eficaz somente se as vazões nas diferentes zonas forem selecionadas de modo que $1 \leq \beta \leq \sqrt{\alpha}$ ($\alpha=K_2/K_1$ é o fator de separação)

Yun e colaboradores (1997) consideraram que há quatro diferentes fatores de segurança β_j ($j=1,2,3,4$), um para cada zona do LMS, e sugerem sem demonstração o seguinte conjunto de equações que permite a determinação das vazões de operação do LMS:

$$\frac{Q_{IV}}{Q_s} = K_2\beta_4 + \frac{1}{\eta} \quad (3.28a)$$

$$\frac{(Q_{IV} - Q_E)}{Q_s} = K_1\beta_3 + \frac{1}{\eta} \quad (3.28b)$$

$$\frac{(Q_{IV} - Q_E + Q_A)}{Q_s} = \frac{K_2}{\beta_2} + \frac{1}{\eta} \quad (3.28c)$$

$$\frac{(Q_{IV} - Q_E + Q_A - Q_R)}{Q_s} = \frac{K_1}{\beta_1} + \frac{1}{\eta} \quad (3.28d)$$

A vazão aparente do adsorvente, Q_s , está relacionada com o tempo de troca T da seguinte forma:

$$Q_s = \frac{(1 - \varepsilon)LA}{T} \quad (3.29)$$

onde L é o comprimento da coluna e A é a área da sua seção transversal.

Podemos eliminar Q_{IV} no sistema das equações (3.28) e assim obtemos:

- Vazão na alimentação:

$$Q_A = Q_s \left(\frac{K_2}{\beta_2} - K_1 \beta_3 \right) \quad (3.30a)$$

- Vazão de extrato:

$$Q_E = Q_s (K_2 \beta_4 - K_1 \beta_3) \quad (3.30b)$$

- Vazão de refinado:

$$Q_R = Q_s \left(\frac{K_2}{\beta_2} - \frac{K_1}{\beta_1} \right) \quad (3.30c)$$

- Vazão de dessorvente:

$$Q_D = Q_s \left(K_2 \beta_4 - \frac{K_1}{\beta_1} \right) \quad (3.30d)$$

As Eqs.(3.31a) e (3.31b) a seguir mostram as possíveis condições dos fatores de segurança β_j para que o LMS opere de forma estável.

$$\beta_j > 1, \quad \forall j \quad (3.31a)$$

$$\beta_2 \beta_3 < \alpha \quad (3.31b)$$

No apêndice é mostrado o desenvolvimento matemático para se chegar às condições mostradas nas Eqs.(3.31a) e (3.31b).

As Fig.3.3.a e 3.3.b mostram essas condições na forma gráfica, podendo se observar o domínio no espaço de β_j que contém os valores para os quais é possível operar o LMS e atingir a separação dos dois componentes da mistura que alimenta o sistema.

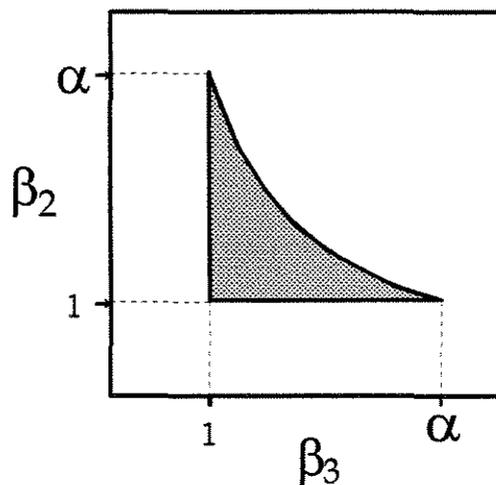


Figura 3.3.a - Domínio dos possíveis valores de β_2 e β_3 . Todos os valores dentro do triângulo isósceles curvilíneo são matematicamente aceitáveis.

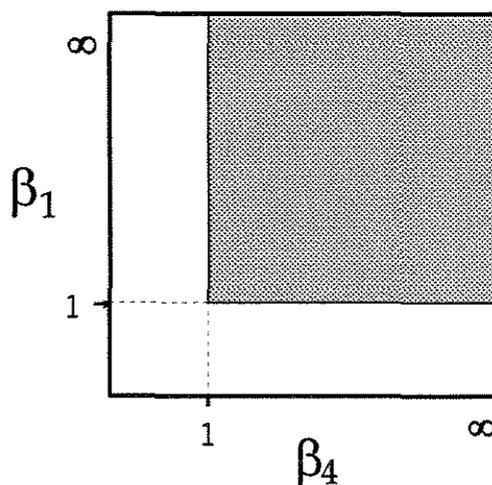


Figura 3.3.b - Domínio dos possíveis valores de β_1 e β_4 . Todos os valores maiores que 1 são matematicamente aceitáveis.

Capítulo Quatro

MATERIAIS E MÉTODOS E

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

4.1- AS PROTEÍNAS, O ADSORVENTE E OS TAMPÕES UTILIZADOS:

•**Proteínas:** As proteínas utilizadas foram a α -lactalbumina (lote 76H7130) e a β -lactoglobulina (lote 104H7200) do leite bovino adquiridas na forma de um pó liofilizado da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), sendo que a pureza da α -lactalbumina era de aproximadamente 85% e a pureza da β -lactoglobulina era de aproximadamente 80% e que foram consideradas durante a pesagem em balança analítica (Mettler AJ150). Os contaminantes eram principalmente não-protéicos.

•**Adsorvente:** O adsorvente utilizado foi a resina de troca de ânions Accell Plus QMA (quaternário metil amino) produzida pela Waters Co. Esta resina se apresenta na forma de um pó branco com diâmetro de partículas entre 37 a 55 μm e com poros tendo um diâmetro aproximado de 300 Å. Sua densidade no leite é igual a 0,50 g de resina/mL de leite. É um trocador de ânions forte.

•**Tampões utilizados:** O tampão utilizado nos experimentos foi 20 mM Bis-Tris-HCl com pH 6,5 com diferentes concentrações de NaCl e foi preparado utilizando-se água ultra pura filtrada no processo Milli-Q Plus da Millipore. O pH foi aferido no pHmetro Mettler Delta 340. Para análises no HPLC, foi utilizado o tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0 como fase móvel sendo previamente filtrado em membranas Millipore com 0,45 μm de poro e degaseificado a vácuo em banho ultrasônico. Tais tampões são recomendados pela Pharmacia Biotech para cromatografia de troca de ânions nesses pHs.

4.2-DETERMINAÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO:

Como foi visto nos capítulos anteriores, as relações de equilíbrio, ou isotermas de adsorção, são de importância fundamental nos processos cromatográficos, pois a partir delas é possível prever o comportamento da separação. Em adição, as isotermas nos mostram o grau de interação da substância com o adsorvente. Assim, foram realizados experimentos com o objetivo de obter os parâmetros de adsorção das proteínas α -lactalbumina (A-La) e β -lactoglobulina (B-Lg) em resinas de troca de ânions Accell Plus QMA. As isotermas foram obtidas com as proteínas puras (individualmente) ou em mistura binária 1:1 e 1:3 (relação mássica $C_{A-La}:C_{B-Lg}$). Utilizou-se tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 com diferentes concentrações de NaCl. A temperatura foi 25 °C.

4.2.1-METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DAS ISOTERMAS UTILIZANDO AS PROTEÍNAS PURAS:

Uma certa quantidade conhecida da resina Accell Plus QMA foi colocada em seringas plásticas de 3 mL provida internamente de um filtro. Pesava-se a resina em uma balança analítica após a taragem da seringa. Cada seringa era identificada com um número e a quantidade exata de resina adicionada em cada seringa era devidamente anotada. Após a pesagem, as seringas contendo a resina eram preenchidas com tampão, e a resina era então estabilizada durante uma noite num agitador rotativo. Deixava-se uma pequena bolha de ar para melhorar a agitação. A Fig.4.1 mostra um esquema da seringa utilizada para a obtenção das isotermas. Para as isotermas obtidas sem a presença de NaCl, a quantidade de resina colocada em cada seringa foi aproximadamente 20 mg, chegando a aproximadamente 80 mg quando NaCl foi adicionado.

Após a estabilização da resina com o tampão, este era expelido da seringa.

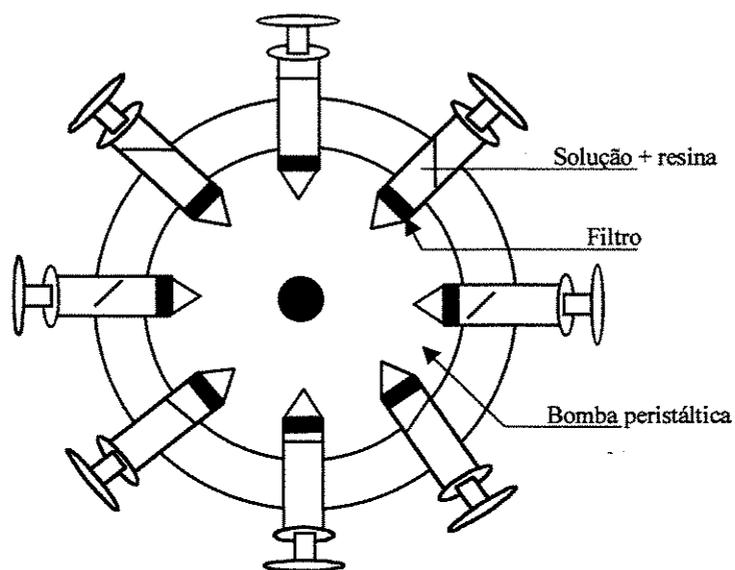
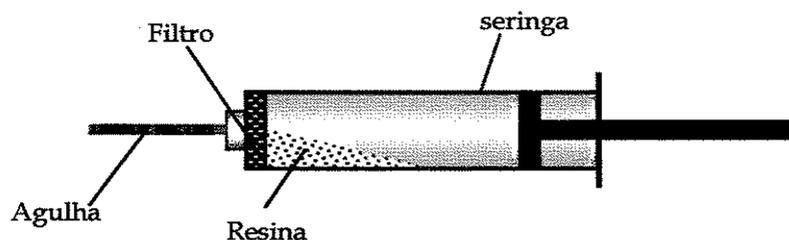


Figura 4.1: Esquema da seringa e do agitador rotativo utilizados para se obter as isotermas de adsorção.

Preparou-se uma solução-mãe com cada uma das proteínas, com concentração conhecida, a partir da qual foram feitas diluições para várias concentrações, sendo que os volumes utilizados na diluição foram determinados ou com pipetas automáticas (Eppendorf) previamente calibradas ou com o auxílio de uma balança analítica. Um volume conhecido (cerca de 2,0 mL) de cada solução após diluição foi incubado com a resina num agitador rotativo por no mínimo 45

minutos, tempo suficiente para que o equilíbrio fosse atingido e que foi previamente determinado. Para se determinar o tempo de equilíbrio, acompanhou-se a variação da absorbância a 280 nm da solução sobrenadante sendo incubada com a resina numa seringa até que não mais houvesse variação no valor dessa absorbância.

O volume exato de cada solução utilizado na incubação foi calculado considerando a densidade da solução como sendo 1,0 mg/mL, sendo que a massa exata da solução a ser incubada foi determinada numa balança analítica e devidamente anotada juntamente com a quantidade exata de resina adicionada na respectiva seringa. As concentrações das soluções foram determinadas antes e após a adsorção. Para isso, foi utilizado um espectrofotômetro UV-Visível (Hitachi U2000) através da absorção nos comprimentos de onda 280 nm e 320 nm. Media-se o valor da absorbância em 280 nm e subtraía-se o valor da absorbância em 320 nm e comparava-se com uma curva de concentrações padrão, na faixa linear, relacionando absorbância x concentração. Quando necessário, eram feitas diluições para posterior leitura da absorção. As leituras em 320 nm foram consideradas como linha base para eliminar possíveis efeitos de turbidez. Com os valores das concentrações antes e após a adsorção, calculava-se a concentração da proteína no adsorvente através da seguinte equação:

$$q^* = \frac{(C_{\text{antes}} - C_{\text{após}}^*) V_{\text{inc}}}{m_{\text{resina}}} \quad (4.1)$$

onde: q é a concentração da proteína na resina (mg/g de resina), C_{antes} é a concentração da solução antes da adsorção (mg/mL), $C_{\text{após}}$ é a concentração da solução após a adsorção (mg/mL), V_{inc} é o volume da solução que foi incubado

com a resina (mL) e m_{resina} é a quantidade da resina contida na seringa (g). Os asteriscos (*) denotam valores no equilíbrio.

O conjunto de pontos q^* e C^* foram então colocados na forma gráfica procedendo-se o melhor ajuste desses pontos experimentais, sendo ou do tipo Langmuir ou linear.

4.2.2-METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DAS ISOTERMAS UTILIZANDO AS PROTEÍNAS EM MISTURAS BINÁRIAS:

O procedimento para a obtenção das isotermas utilizando as proteínas em misturas binárias é análogo ao procedimento descrito para a obtenção das isotermas utilizando as proteínas puras (individuais), diferindo apenas no método para se determinar as concentrações das soluções, pois agora temos duas proteínas em solução. As concentrações de cada proteína na mistura foram determinadas em um sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) com o uso de uma coluna cromatográfica analítica de troca aniônica TSK-DEAE 5PW (7,5x0,75 cm) da Hewlett Packard com a injeção de 20 μL da solução-mistura a ser analisada. Foi efetuado um gradiente 15 mM NaCl/min numa vazão de 1,0 mL/min. A fase móvel utilizada foi o tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0. As áreas dos picos individuais estão relacionadas com a concentração de cada proteína e foram determinadas previamente numa calibração. O sistema HPLC era da Shimadzu e possuía duas bombas (modelo LC-10AS), um detector UV-Visível (modelo SP-10AV) e um integrador (modelo C-R6A). A B-Lg fornece dois picos (B-Lg A e B-Lg-B) e a soma da área desses picos foi considerada no cálculo da concentração da B-Lg. Quando necessário, as amostras foram diluídas para se situarem dentro da faixa linear da curva de calibração (neste caso, concentrações menores que 2,0 mg/mL). As concentrações de cada proteína foram determinadas antes e após a adsorção. Um balanço de massa permitiu a determinação da quantidade de cada proteína adsorvida pela resina para cada concentração. O conjunto de pontos

relacionando a concentração no sobrenadante (C^*) em equilíbrio com a concentração no adsorvente (q^*) foi colocado na forma gráfica e através de ajustes dos pontos experimentais obteve-se a relação matemática $q_i=q_i(C_i)$ e assim, os parâmetros da adsorção foram determinados. A Fig.4.2 mostra um cromatograma típico obtido para a mistura binária 1:1, sendo o primeiro pico o da A-La e os dois picos seguintes são o da B-Lg A e B obtidos com gradiente de NaCl 15 mM/min .

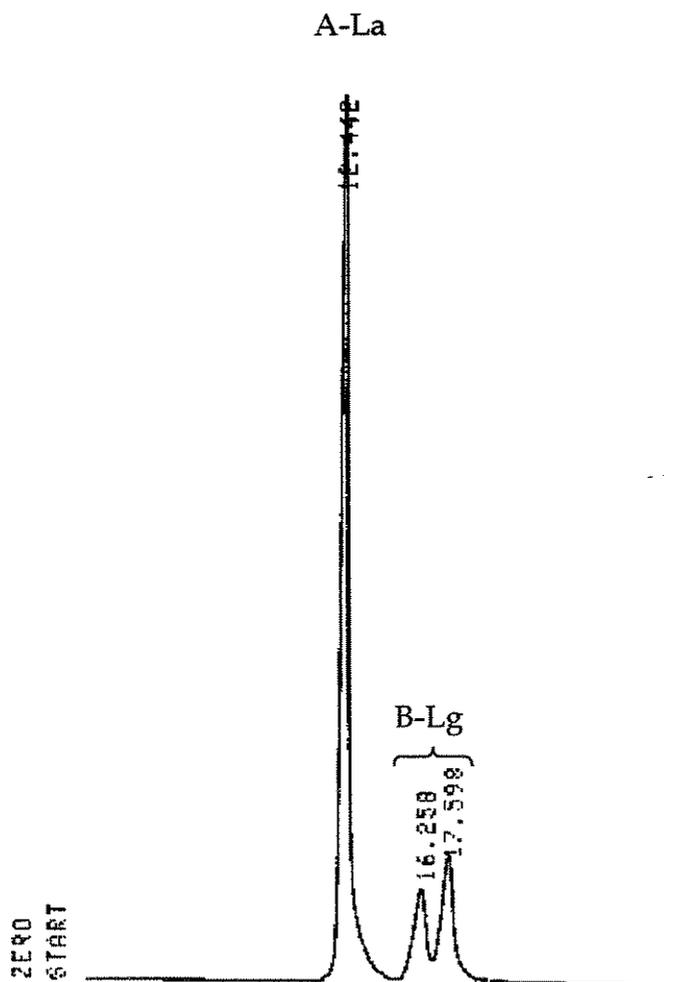


Figura 4.2: Picos cromatográficos da α -lactalbumina (A-La) e da β -lactoglobulina (B-Lg) obtidos com um gradiente 15mM/min (NaCl) em uma coluna HP DEAE 5PW (troca de ânions) após a injeção de 20 μ L da mistura.

4.3-RESULTADOS EXPERIMENTAIS:

Serão apresentados alguns resultados experimentais e cuja discussão será feita no capítulo seis.

4.3.1-ISOTERMAS OBTIDAS PARA AS PROTEÍNAS PURAS (INDIVIDUAIS)

A Fig.4.3 mostra as isotermas de adsorção obtidas para a A-La e B-Lg utilizando soluções *sem* a presença de NaCl. A temperatura foi 25 °C.

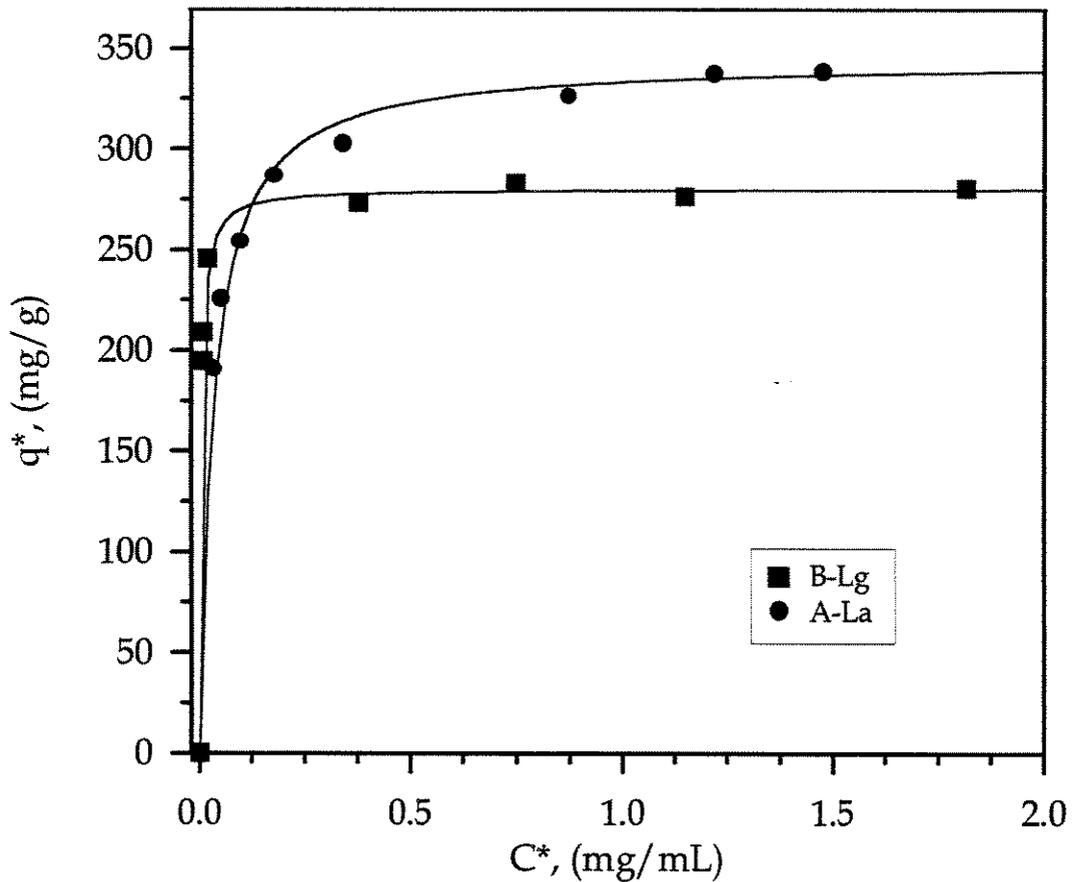


Figura 4.3: Isotermas de adsorção a 25 °C da A-La e da B-Lg obtidas com a resina Accell-Plus QMA em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 sem a adição de NaCl. Os símbolos são pontos experimentais e as linhas contínuas representam o ajuste tipo Langmuir: A-La: $q^m=344,40$ mg/g e $K^d=3,3 \times 10^{-2}$ mg/mL e B-Lg: $q^m=280,43$ mg/g e $K^d=3,7 \times 10^{-3}$ mg/mL.

Na Fig.4.4 são mostradas as isotermas de adsorção a 25 °C para a B-Lg utilizando soluções com diferentes concentrações de NaCl.

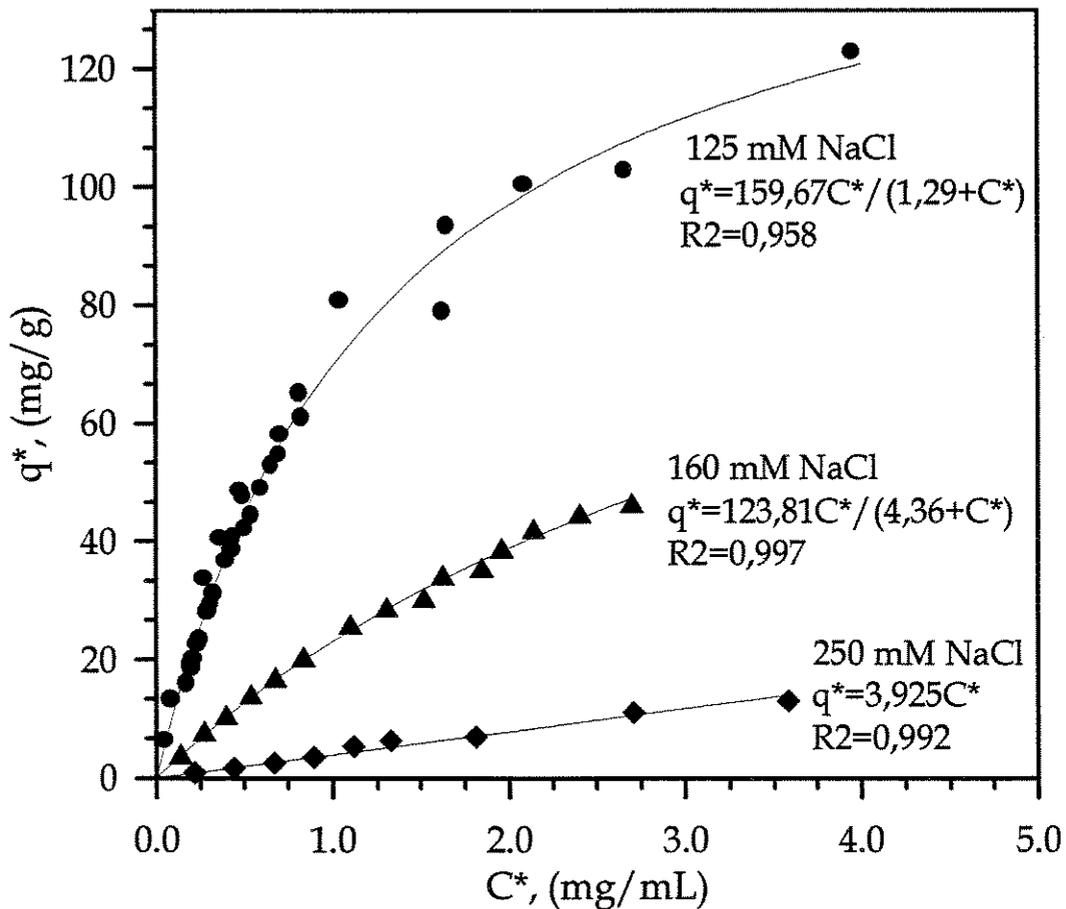


Figura 4.4: Isotermas de adsorção a 25 °C da B-Lg obtidas com a resina Accell Plus QMA em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 com diferentes concentrações de NaCl. Os símbolos são pontos experimentais e as linhas contínuas representam os ajustes indicados.

A Fig.4.5 mostra as isotermas de adsorção a 25 °C da A-La e da B-Lg obtidas com a resina Accell Plus QMA em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 com 250 mM NaCl.

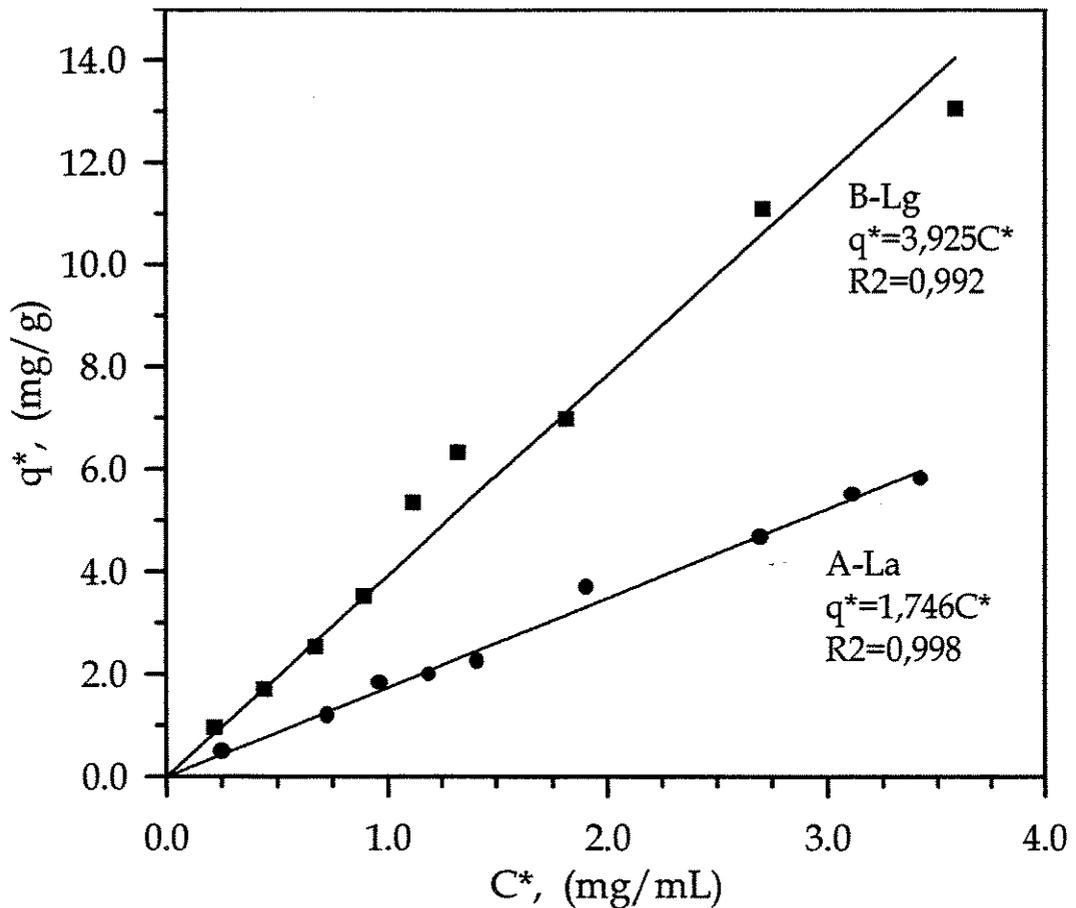


Figura 4.5: Isotermas de adsorção a 25 °C da A-La e da B-Lg obtidas com a resina Accell-Plus QMA em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 com 250 mM NaCl. Os símbolos são pontos experimentais. As linhas contínuas representam o ajuste linear mostrado.

4.3.2-ISOTERMAS OBTIDAS PARA AS PROTEÍNAS EM MISTURAS BINÁRIAS

A Fig.4.6 mostra as isotermas de adsorção, a 25 °C, para uma mistura binária, da A-La e da B-Lg obtidas com a resina Accell-Plus QMA em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 com 250 mM NaCl. A relação mássica foi 1:1.

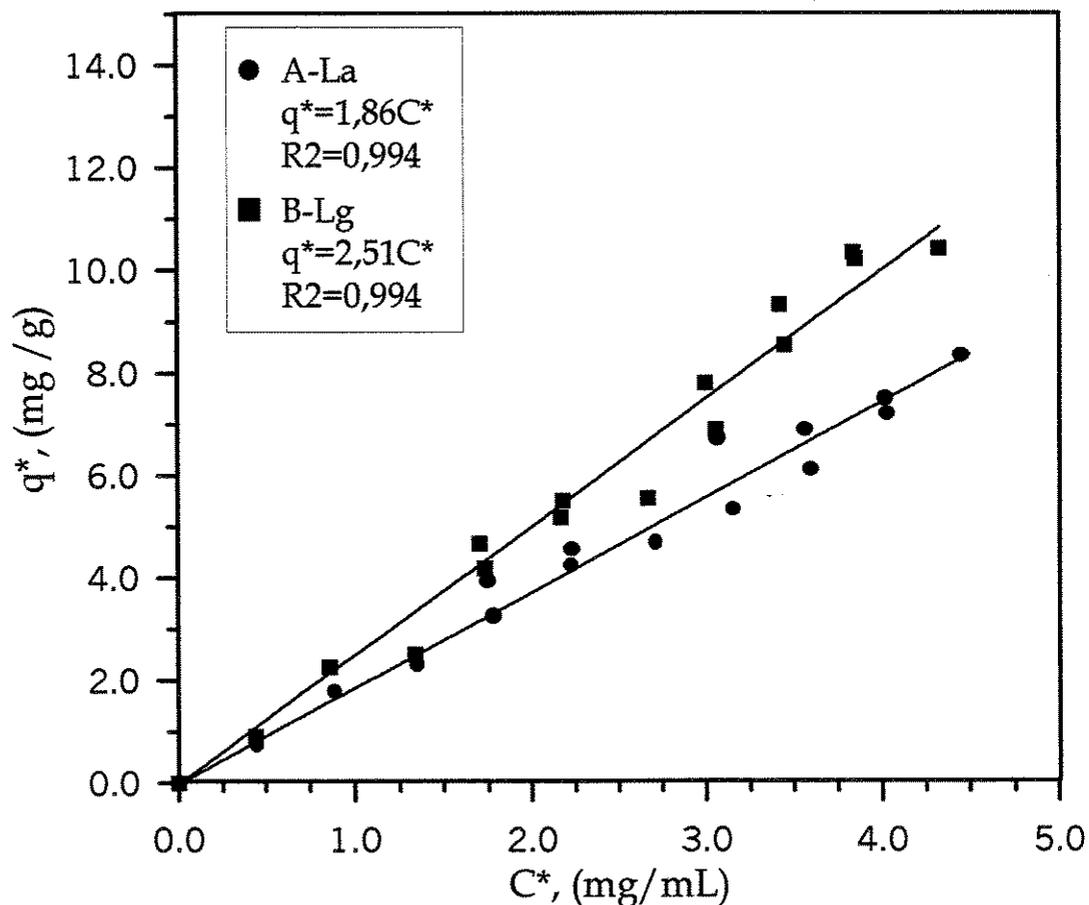


Figura 4.6: Isoterma de adsorção a 25 °C para A-La e B-Lg, mistura binária 1:1 em tampão 20mM Bis-Tris-HCl com 250 mM em NaCl pH 6,5 em resinas Accell-Plus QMA.

A Fig.4.7 mostra as isotermas de adsorção a 25 °C, para uma mistura binária, da A-La e da B-Lg obtidas com a resina Accell-Plus QMA em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 com 200 mM NaCl. A relação mássica foi 1:3.

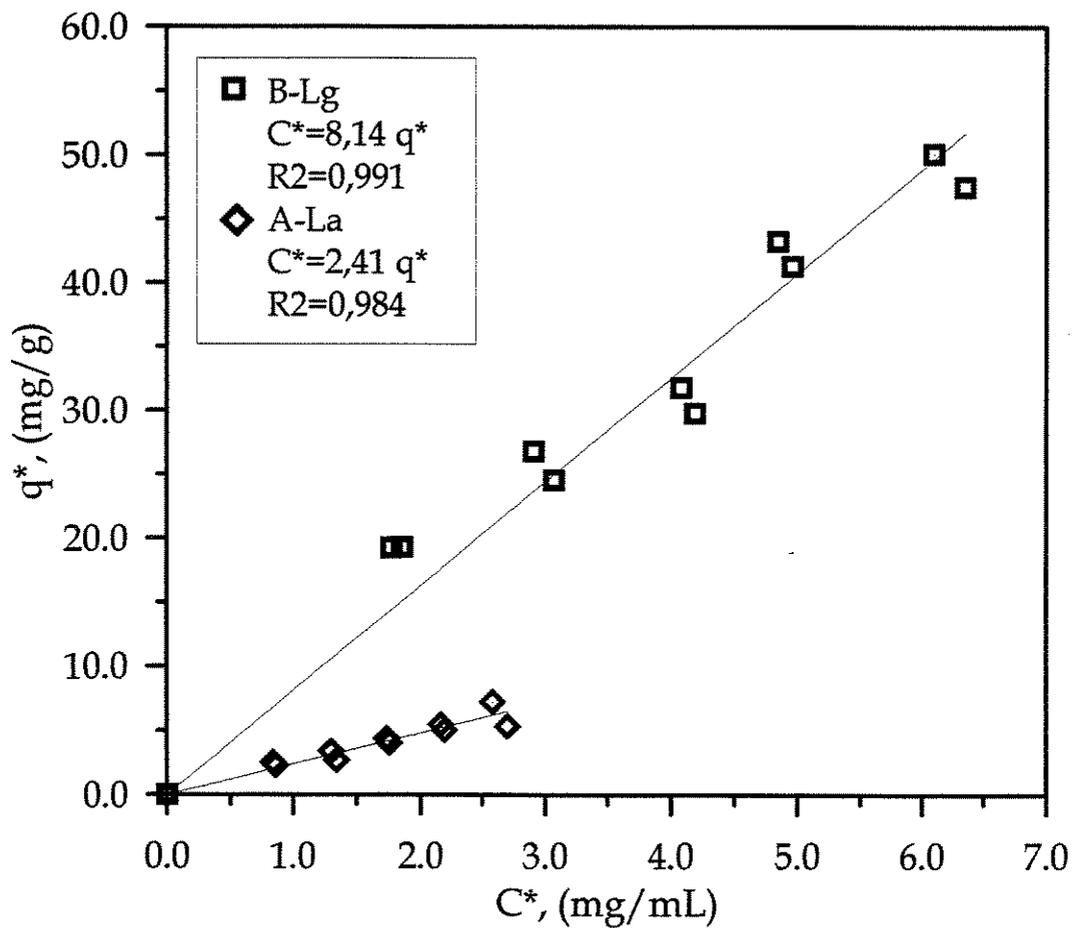


Figura 4.7: Isoterma de adsorção a 25 °C para A-La e B-Lg, mistura binária 1:3 em tampão 20mM Bis-Tris-HCl com 200 mM em NaCl pH 6,5. A resina adsorvente foi Accell-Plus QMA.

4.2.3- DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE *BREAKTHROUGH* PARA A MISTURA 1:1

As curvas de *breakthrough* representam, de forma dinâmica, o fenômeno da adsorção. Obteve-se curvas de *breakthrough* para a A-La e B-Lg na mistura 1:1 em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 com 250 mM de NaCl e assim foi possível comparar o modelo descrito para uma coluna com a curva experimental. A coluna utilizada faz parte de um conjunto de oito colunas que serão utilizadas para montar o LMS futuramente. Adotou-se o seguinte procedimento:

Uma coluna de vidro (Merck) com 1,6 cm de diâmetro interno foi empacotada lentamente com 9,4 g da resina Accell-Plus QMA utilizando o tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 para transformá-la numa lama, o que permite a obtenção de um leito uniforme. Essa quantidade de resina proporcionou uma altura de leito igual a 9,4 cm (densidade do leito igual a 0,50 g/mL). A porosidade (ϵ) do leito da resina Accell-Plus QMA foi determinada pela técnica dos momentos, sendo igual a 0,42 conforme determinada por Coimbra e Santana (1996) utilizando uma coluna semelhante. A Fig.4.8 mostra um esquema da coluna. A coluna de resina foi então estabilizada com o tampão de corrida durante uma noite, após ser conectada à uma bomba de HPLC, numa vazão igual a 0,50 mL/min. Preparou-se então uma solução contendo a mistura com 1,0 mg/mL para ambas proteínas, A-La e B-Lg, no tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 com 250 mM de NaCl que foi então alimentada na coluna a 25 °C e 1,00 mL/min (a coluna possuía uma jaqueta térmica por onde circulava água na temperatura de 25 °C). Coletou-se continuamente frações durante 50 minutos, sendo o tempo de coleta igual a 1,0 minuto. A determinação das concentrações normalizadas (C/C_{ent}) para cada uma das proteínas na mistura foi efetuada seguindo a mesma metodologia utilizada para se determinar as concentrações individuais da A-La e B-Lg quando presentes numa mistura, como efetuado no caso das isotermas em mistura binária (em HPLC com uma coluna HP TSK-DEAE 5PW), sendo dada pela razão entre as áreas dos picos individuais obtidas nas amostras coletadas e a área dos picos na solução alimentada na coluna.

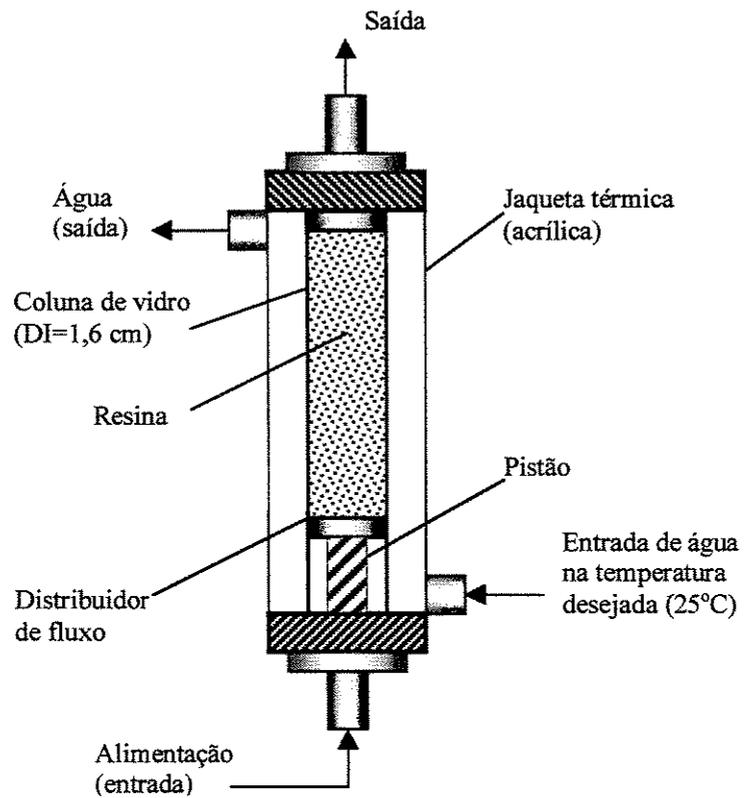


Figura 4.8: Esquema da coluna utilizada para a obtenção das curvas de *breakthrough*.

A Fig.4.9 mostra as curvas de *breakthrough* obtidas para a mistura binária 1:1. A coluna utilizada tinha as seguintes características físicas: altura do leito igual a 9,4 cm e diâmetro interno igual a 1,6 cm. A concentração na alimentação para ambas proteínas foi 1,0 mg/mL em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 e 250 mM NaCl com vazão igual a 1,0 mL/min a 25°C. Resina Accell-Plus QMA troca de ânions.

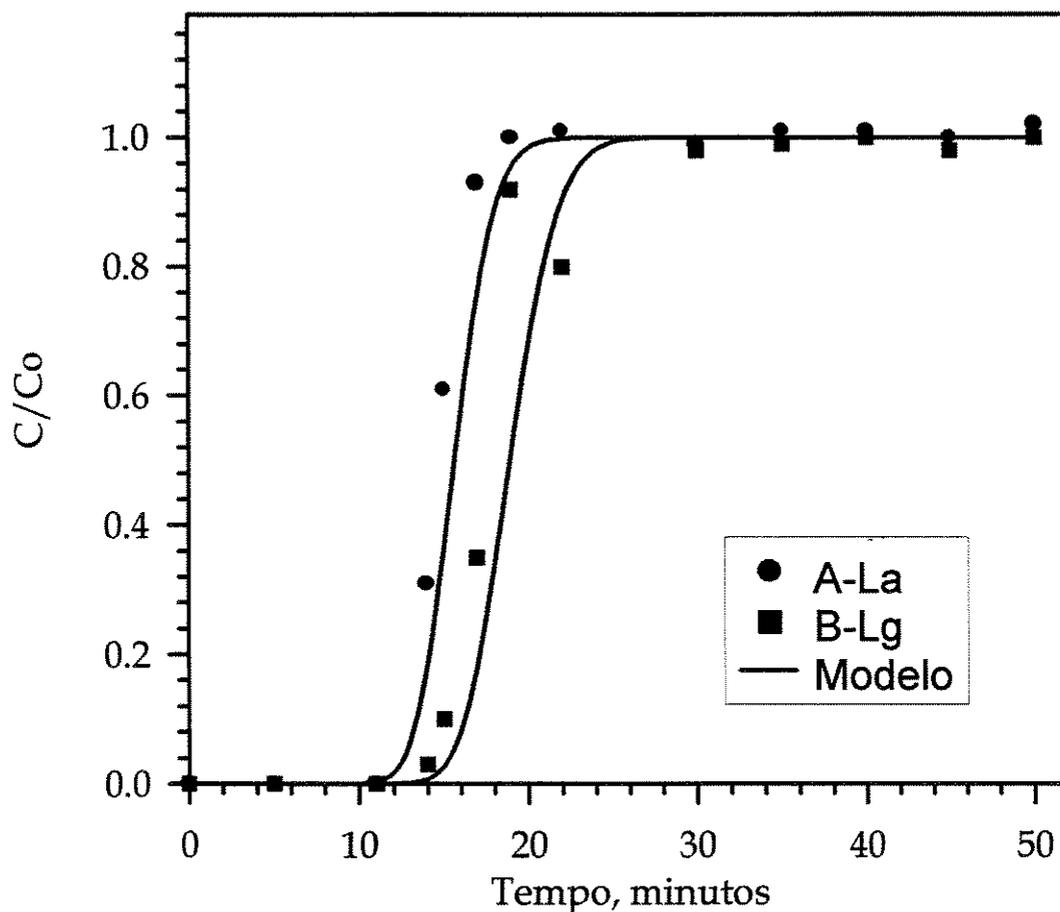


Figura 4.9: Curvas de *breakthrough* experimentais para a A-La e B-Lg (símbolos) e o modelo da coluna (equilíbrio dispersivo para isoterma linear) para ambas aplicando os parâmetros de equilíbrio 1:1 (linha contínua). Coluna: 9,4x1,6cm, concentração na alimentação para ambas foi 1,0 mg/mL em tampão 20 mM Bis-Tris-HCl pH 6,5 e 250 mM NaCl com vazão igual a 1,0 mL/min. a 25°C. Resina Accell-Plus QMA troca de ânions. $D_{ax}=0,005 \text{ cm}^2/\text{min}$. (valor arbitrário).

Capítulo Cinco

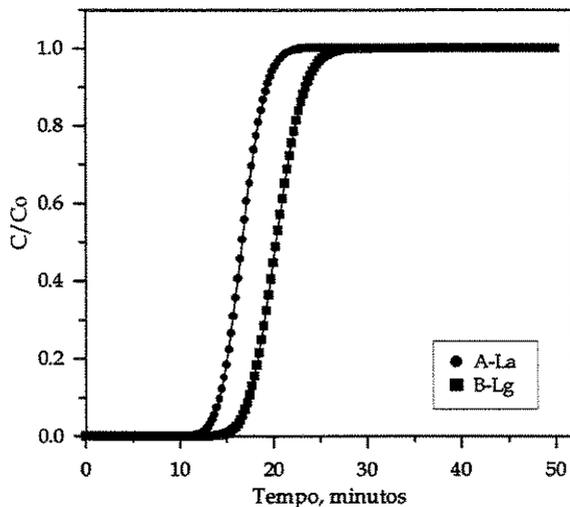
SIMULAÇÕES E RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES

Primeiramente veremos as simulações dos modelos para uma coluna (seção 5.1) e depois, os modelos foram aplicados na rotina do LMS (seção 5.2). As discussões serão feitas no capítulo seis.

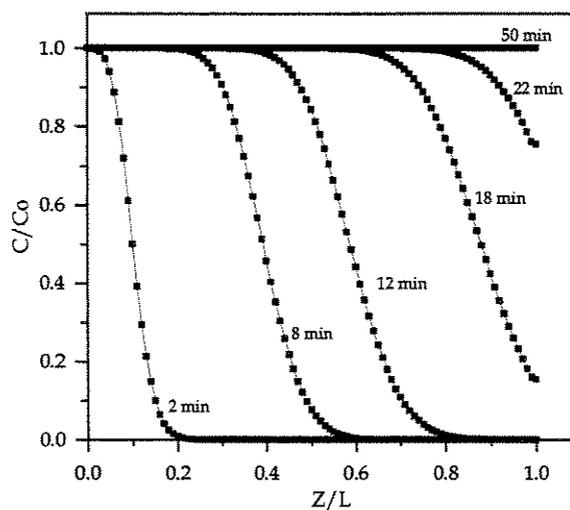
5.1- SIMULAÇÕES DOS MODELOS PARA UMA COLUNA

A seguir serão apresentadas as simulações dos modelos para uma coluna apresentados no capítulo três. Os resultados dos modelos para uma coluna são as curvas de *breakthrough*. Considera-se que a coluna é alimentada, numa vazão constante, com uma solução de concentração C_0 e que está preenchida com o mesmo adsorvente utilizado para obter os parâmetros da adsorção e que a fase móvel apresenta as mesmas condições de pH e força iônica que foram utilizadas na obtenção daqueles parâmetros. Também serão mostrados os perfis de concentrações internos na coluna para diferentes tempos. Cada coluna simulada tinha um comprimento (L) igual a 10,0 cm e diâmetro interno igual a 1,6 cm. Em todas as simulações, quando aplicado, o coeficiente de dispersão axial, D_{ax} , foi considerada igual 5×10^{-3} cm²/min. As Fig.5.1(a) e Fig.5.1(b) são os resultados para o modelo de equilíbrio dispersivo para isotermas lineares. As Fig.5.2(a) e Fig.5.2(b) são os resultados para o modelo de equilíbrio dispersivo para isotermas do tipo Langmuir. As Fig.5.3(a) e Fig.5.3(b) são os resultados para o modelo de equilíbrio dispersivo para isotermas Langmuir competitivas. As Fig.5.4(a) e Fig.5.4(b) são os resultados para o modelo ideal que considera força motriz linear. A Fig.5.5 mostra as curvas de *breakthrough* aplicando os parâmetros de equilíbrio obtidos para a B-Lg em diferentes concentrações de NaCl. Na Fig.5.6 são mostrados os efeitos típicos da dispersão axial nas curvas de *breakthrough* quando apenas o valor de D_{ax} é alterado.

5.1.1-MODELO QUE CONSIDERA ISOTERMA LINEAR:



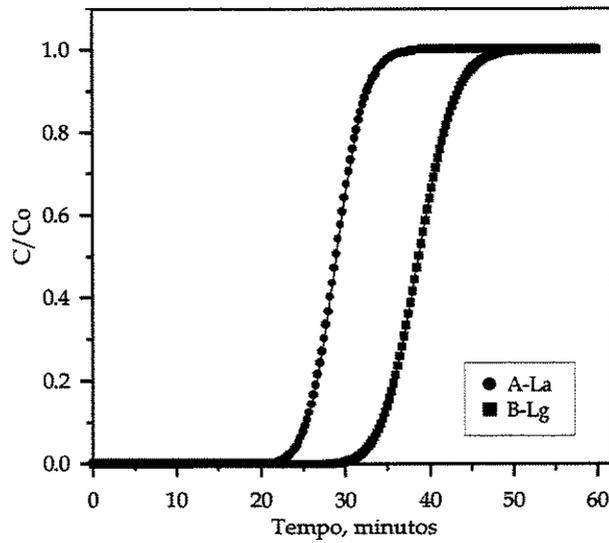
(a)



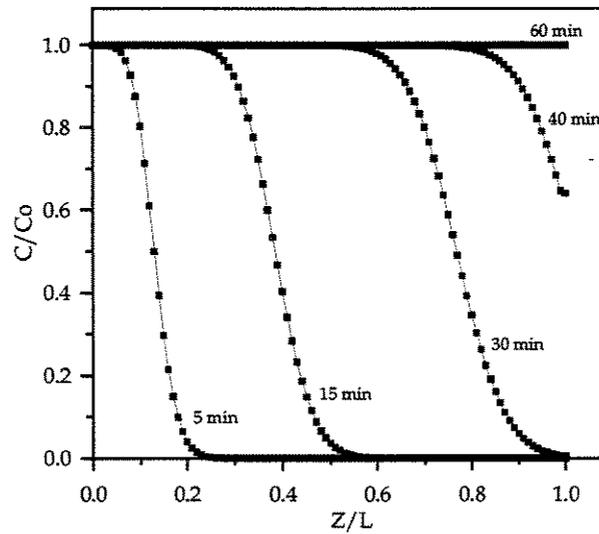
(b)

Figura 5.1:(a) Curvas de *breakthrough* para a A-La e para a B-Lg aplicando os parâmetros de equilíbrio obtidos com a mistura binária 1:1; (b) Perfis internos na coluna em diferentes tempos para a B-Lg. Os símbolos são pontos simulados pelo modelo que considera isoterma linear. Dados: coluna 10,0 x 1,6 cm, concentração de ambas proteínas na alimentação foi 1,0 mg/mL e vazão igual a 1,0 mL/min. $K_{A-La}=0,930$ e $K_{B-Lg}=1,255$.

5.1.2-MODELO QUE CONSIDERA ISOTERMA DO TIPO LANGMUIR:



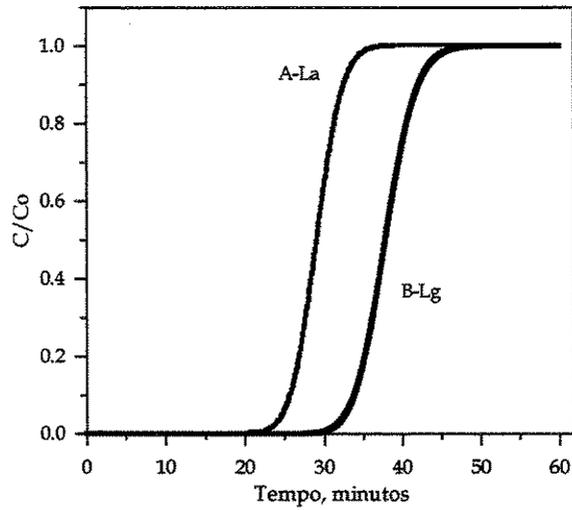
(a)



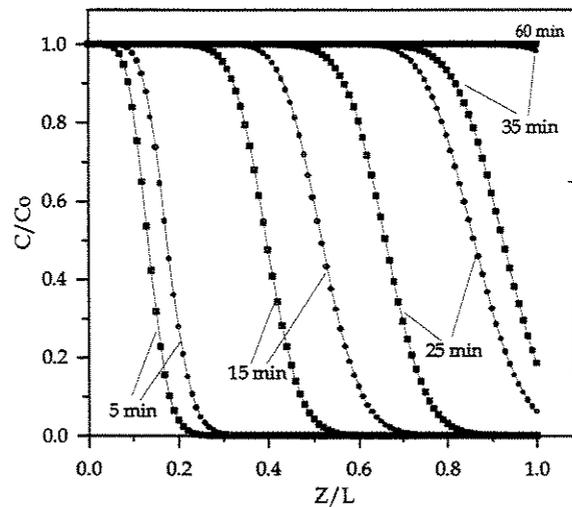
(b)

Figura 5.2:(a) Curvas de *breakthrough* para a A-La e para a B-Lg ; (b) Perfis internos na coluna em diferentes tempos para a B-Lg. Os símbolos são pontos simulados pelo modelo que considera isoterma do tipo Langmuir. Dados: coluna 10,0 x 1,6 cm, concentração de ambas proteínas na alimentação foi 1,0 mg/mL e vazão igual a 1,0 mL/min. Parâmetros fictícios utilizados no modelo: A-La: $q^m=45,0$ mg/g e $K_d=21,0$ mg/mL; B-Lg: $q^m=50,0$ mg/g e $K_d=16,0$ mg/mL.

5.1.3-MODELO QUE CONSIDERA ISOTERMAS DO TIPO LANGMUIR COMPETITIVAS:



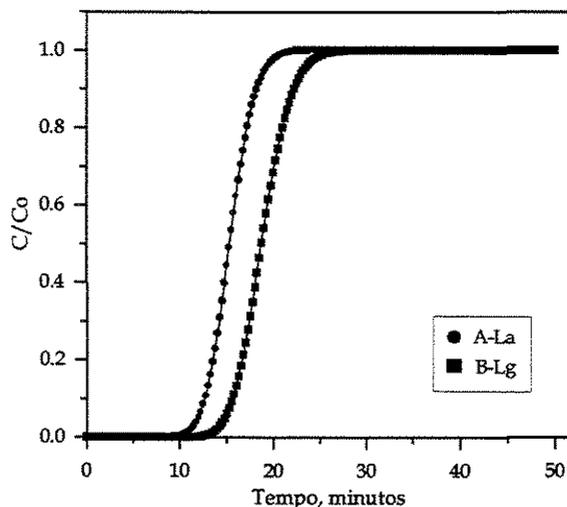
(a)



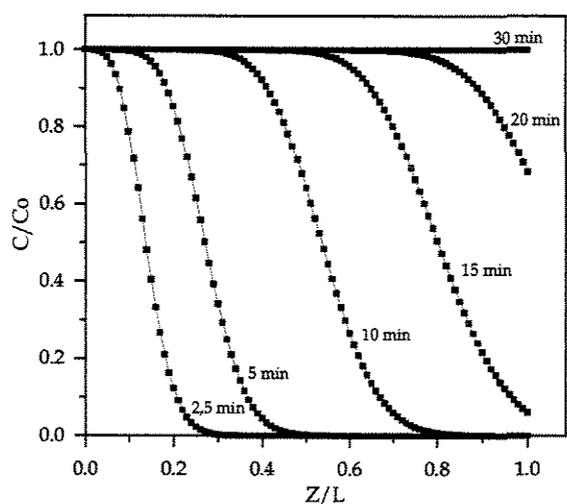
(b)

Figura 5.3:(a) Curvas de *breakthrough* para a A-La e para a B-Lg ; (b) Perfis internos na coluna em diferentes tempos para a A-La (●) e para a B-Lg (■). Os símbolos são pontos simulados pelo modelo que considera isoterma do tipo Langmuir competitiva. Dados: coluna 10,0 x 1,6 cm, concentração de ambas proteínas na alimentação foi 1,0 mg/mL e vazão igual a 1,0 mL/min. Parâmetros utilizados no modelo: A-La: $q^m=45,0$ mg/g e $K_a=4,76 \times 10^{-2}$ mL/mg; B-Lg: $q^m=50,0$ mg/g e $K_a=6,25 \times 10^{-2}$ mL/mg.

5.1.4-MODELO IDEAL QUE CONSIDERA FORÇA MOTRIZ LINEAR:



(a)



(b)

Figura 5.4:(a) Curvas de *breakthrough* para a A-La e para a B-Lg ; (b) Perfis internos na coluna em diferentes tempos para a B-Lg. Os símbolos são pontos simulados pelo modelo que considera força motriz linear. Dados: coluna 10,0 x 1,6 cm, concentração de ambas proteínas na alimentação foi 1,0 mg/mL e vazão igual a 1,0 mL/min. Parâmetros utilizados no modelo: A-La: $k_{fa_v}=3,5 \text{ min}^{-1}$; B-Lg: $k_{fa_v}=4,3 \text{ min}^{-1}$ (obtidos pelas curvas de *breakthrough* mistura 1:1, ver pag.93).

5.1.5-EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NO TEMPO DE *BREAKTHROUGH*:

As simulações dessas curvas foram baseadas nos parâmetros de equilíbrio obtidos experimentalmente através da isotermas para a B-Lg (Fig.4.4) utilizando as correspondentes concentrações de NaCl.

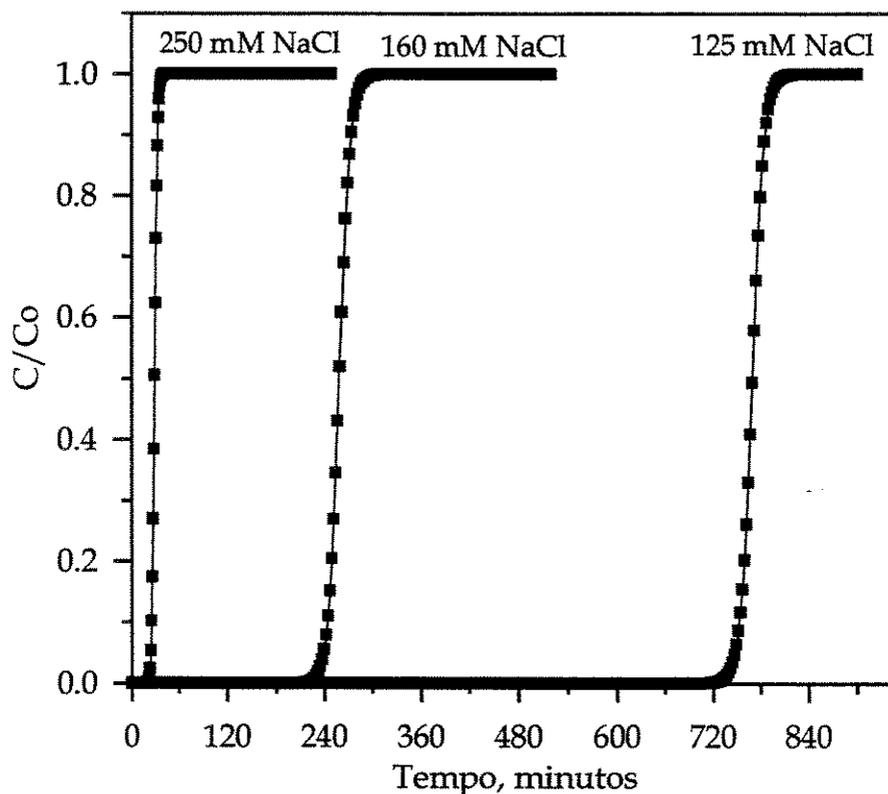


Figura 5.5: Efeito da concentração de NaCl nas curvas de *breakthrough* simuladas para a B-Lg. Dados: coluna 10,0 x 1,6 cm, concentração da proteína na alimentação foi 1,0 mg/mL e vazão igual a 1,0 mL/min. Dados de equilíbrio: 250 mM NaCl: $K=1,963$; 160 mM NaCl: $q^m=123,81$ mg/g e $K_d=4,36$ mg/mL; 125 mM NaCl: $q^m=159,67$ mg/g e $K_d=1,29$ mg/mL.

5.1.6- INFLUÊNCIA DA DISPERSÃO AXIAL NAS CURVAS DE *BREAKTHROUGH*

A Fig.5.6 mostra o que ocorre com as curvas de *breakthrough* quando diferentes valores do coeficiente de dispersão axial são aplicados no modelo da coluna que considera equilíbrio dispersivo para isothermas tipo Langmuir.

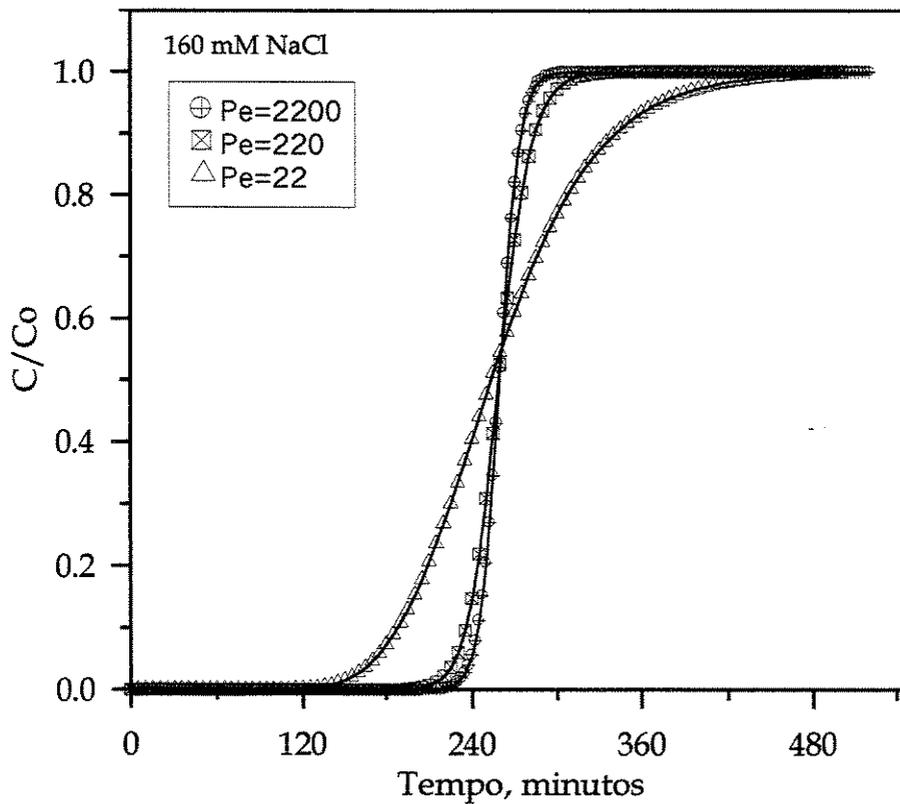


Figura 5.6: Efeito da dispersão axial nas curvas de *breakthrough* simuladas para a B-Lg. Dados: coluna 10,0 x 1,6 cm, concentração da proteína na alimentação foi 1,0 mg/mL e vazão igual a 1,0 mL/min. Dados de equilíbrio: $q^m=123,81$ mg/g e $K_d=4,36$ mg/mL. O número de Peclet (Pe) é dado por: $Pe=v_0L/\epsilon D_{ax}$.

5.2- SIMULAÇÕES PARA O LEITO MÓVEL SIMULADO

A seguir serão apresentadas as simulações de um LMS com 8 colunas, sendo duas colunas por zona, sendo que cada coluna possui 10,0 cm de comprimento e 1,6 cm de diâmetro interno. Em todas as simulações, quando aplicado, D_{ax} foi considerado igual a 5×10^{-3} cm²/min. Considera-se cada coluna recheada com a resina Accell Plus QMA cuja densidade no leito é aproximadamente 0,50 g de resina/mL de leito. As isotermas forneceram os parâmetros de equilíbrio e, ainda, para o caso do modelo considerando força motriz linear, obteve-se o coeficiente global de transferência de massa para a α -lactalbumina e para a β -lactoglobulina ajustando-os às curvas de *breakthrough* experimentais (Maki et al, 1987) sendo então aplicados na correspondente rotina do LMS. As vazões utilizadas foram calculadas utilizando as condições de separação vistas no capítulo quatro. Das simulações foram obtidos os seguintes resultados:

1. *Perfis dinâmicos do LMS*: mostra como as concentrações da α -lactalbumina e da β -lactoglobulina no extrato e no refinado evoluem com o tempo. Permite visualizar o tempo necessário para se atingir o estado estacionário e as concentrações no tempo de troca.
2. *Pureza e concentrações do extrato e do refinado, no estado estacionário, como função do tempo de troca*: mostra como a pureza e a concentração do principal componente do extrato e do refinado são afetadas pelo tempo de troca das colunas. Através desta figura é possível escolher o melhor tempo de troca tendo em vista o compromisso entre a pureza e as concentrações do extrato e do refinado para a combinação de vazões que foi utilizada. A pureza do extrato em porcentagem (PE%) é definida como a razão entre a concentração do principal componente do extrato (no caso, a B-Lg) e a concentração total das proteínas presentes no extrato, ou seja:

$$PE\% = \frac{C_{B-Lg,E}}{C_{B-Lg,E} + C_{A-La,E}} 100\% \quad (5.1a)$$

Analogamente para a pureza do refinado (PR%) temos:

$$PR\% = \frac{C_{A-La,R}}{C_{B-Lg,R} + C_{A-La,R}} 100\% \quad (5.1b)$$

3. *Perfis de concentrações internos do LMS*: mostra, no estado estacionário, como os perfis de concentrações das substâncias sendo separadas se distribuem ao longo das colunas e zonas do LMS (perfil axial).
4. *Consumo do solvente (mL/mg de proteína)*: mostra como o consumo do solvente no extrato e no refinado varia com o tempo de troca, sendo definido como:

- *Consumo de solvente no extrato*:
$$CSE = \frac{Q_E + Q_A}{C_{B-Lg,E} Q_E} \quad (5.2a)$$

- *Consumo de solvente no refinado*:
$$CSR = \frac{Q_R + Q_A}{C_{A-La,R} Q_R} \quad (5.2b)$$

onde Q_A é a vazão da alimentação, Q_E é a vazão de extrato, Q_R é a vazão de refinado, $C_{B-Lg,E}$ é a concentração da B-Lg no extrato e $C_{A-La,R}$ é a concentração da A-La no refinado.

5.2.1-SIMULAÇÕES UTILIZANDO PARÂMETROS DE EQUILÍBRIO DA MISTURA BINÁRIA 1:3 APLICADOS NO MODELO EQUILÍBRIO DISPERSIVO LINEAR

A mistura binária 1:3 ($C_{A-La}:C_{B-Lg}$) é a mais realista para uma aplicação prática, visto que o soro do leite contém aproximadamente esta proporção mássica para a A-La e B-Lg (ver tabela 2.2).

Neste caso, os resultados de equilíbrio obtidos experimentalmente (isotermas) forneceram os seguintes coeficientes de distribuição para ambas proteínas: $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$ ($K_{A-La}=2,41$ mL/g de resina e $K_{B-Lg}=8,14$ mL/g de resina) assim, o fator de separação ($\alpha=K_{B-Lg}/K_{A-La}$) é igual a 3,38. Foram utilizados cinco diferentes conjuntos dos parâmetros de segurança (β_j) no cálculo das vazões de operação em cada zona do LMS, de modo que os efeitos destes parâmetros pudessem ser avaliados com relação às purezas e às concentrações do extrato e do refinado e também o consumo do solvente. Em todos os casos, Q_s foi considerado igual a 1,106 mL/min. A concentração da A-La na alimentação igual a 1,0 mg/mL e a concentração da B-Lg na alimentação igual a 3,0 mg/mL, mantendo assim, a mesma proporção mássica utilizada para obter os parâmetros de equilíbrio. A Fig.5.7 ilustra os possíveis valores de β_2 e β_3 que poderiam ser utilizados (área hachurada) e quaisquer valores maiores que 1 para β_1 e β_4 podem ser utilizados.

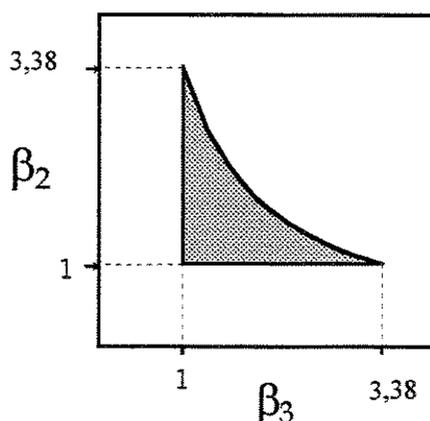


Figura 5.7: Domínio dos possíveis valores para β_2 e β_3 para a mistura binária 1:3.

- **Conjunto 1:** $\beta_1=\beta_2=\beta_3=\beta_4=1,05$

Este conjunto forneceu a seguinte combinação de vazões em cada zona do LMS:

- Vazão na zona I = 2,174 mL/min;
- Vazão na zona II = 5,191 mL/min;
- Vazão na zona III= 2,304 mL/min;
- Vazão na zona IV= 5,631 mL/min.

As vazões de entrada e saída do sistema são:

- Vazão da alimentação= 2,887 mL/min;
- Vazão do refinado= 3,017 mL/min;
- Vazão do extrato= 3,327 mL/min;
- Vazão do dessorvente= 3,457 mL/min.

Os resultados para este conjunto são mostrados nas Figs.5.8.a, b, c e d.

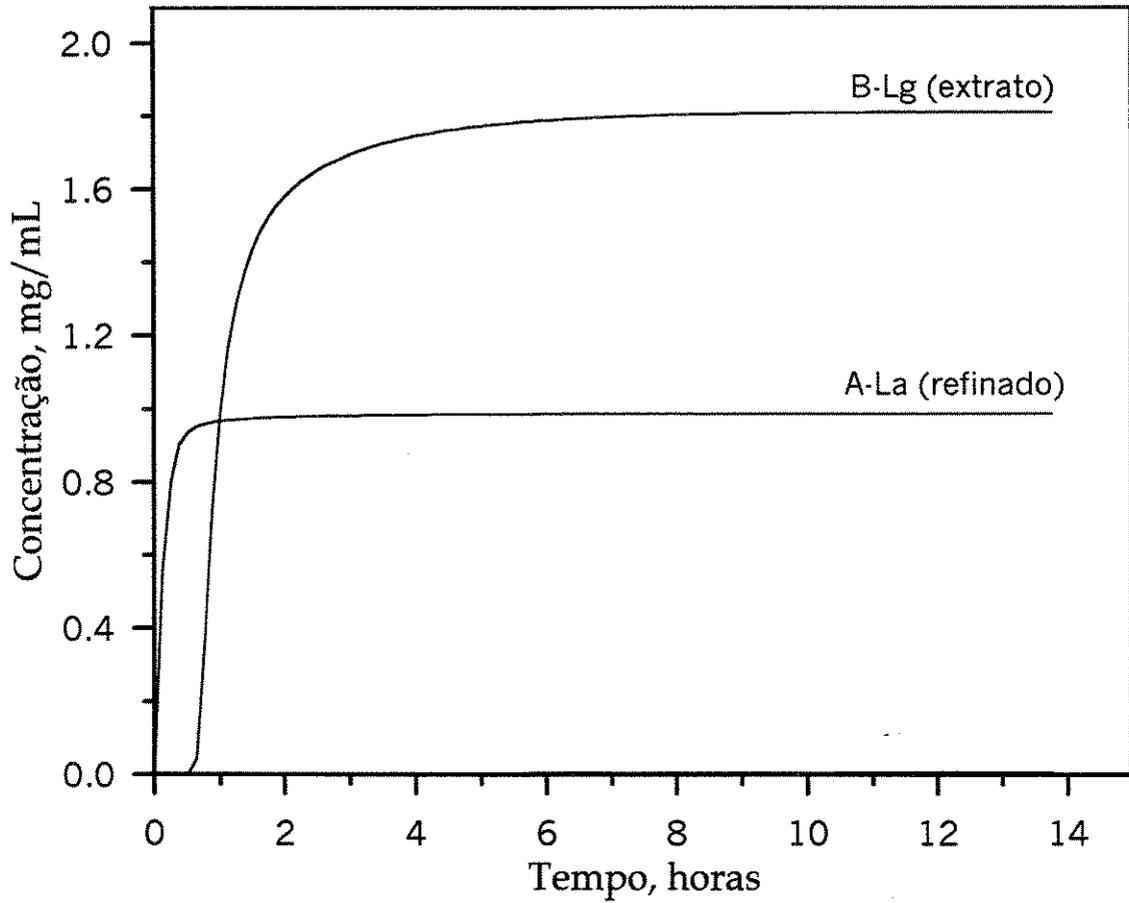


Figura 5.8.a: Perfis dinâmicos do extrato e do refinado. Tempo de troca igual a 7,5 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura binária 1:3. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,41%. $\beta_1=\beta_2=\beta_3=\beta_4=1,05$.

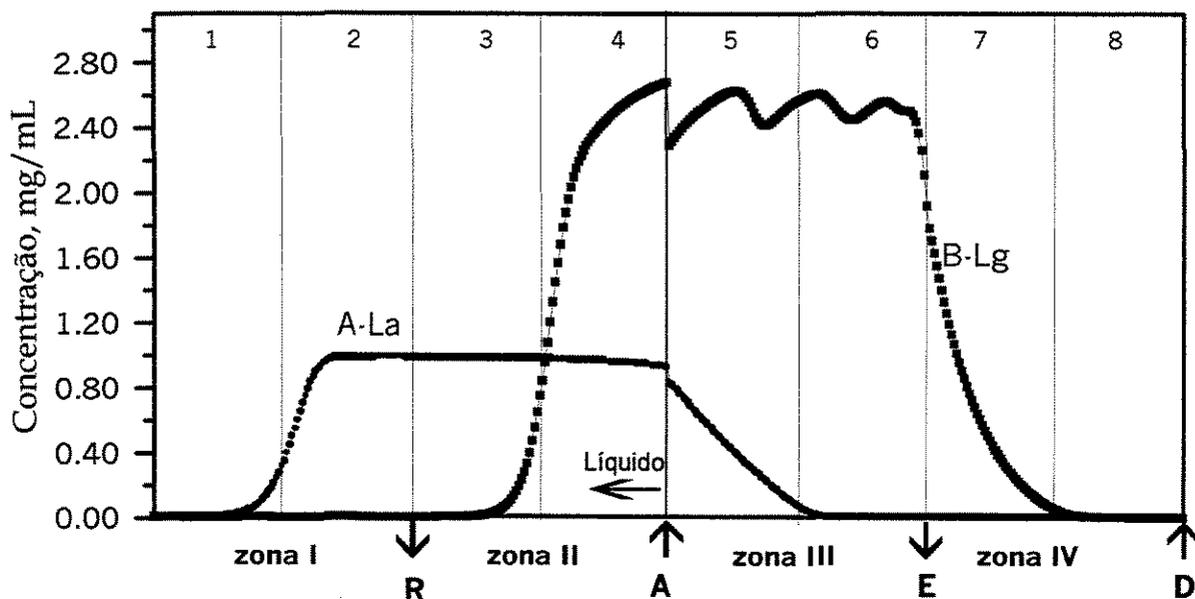


Figura 5.8.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera equilíbrio dispersivo. Tempo de troca igual a 7,5 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura 1:3; $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,07$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,41%. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para a A-La e 3,0 mg/mL para a B-Lg. $\beta_1=\beta_2=\beta_3=\beta_4=1,05$.

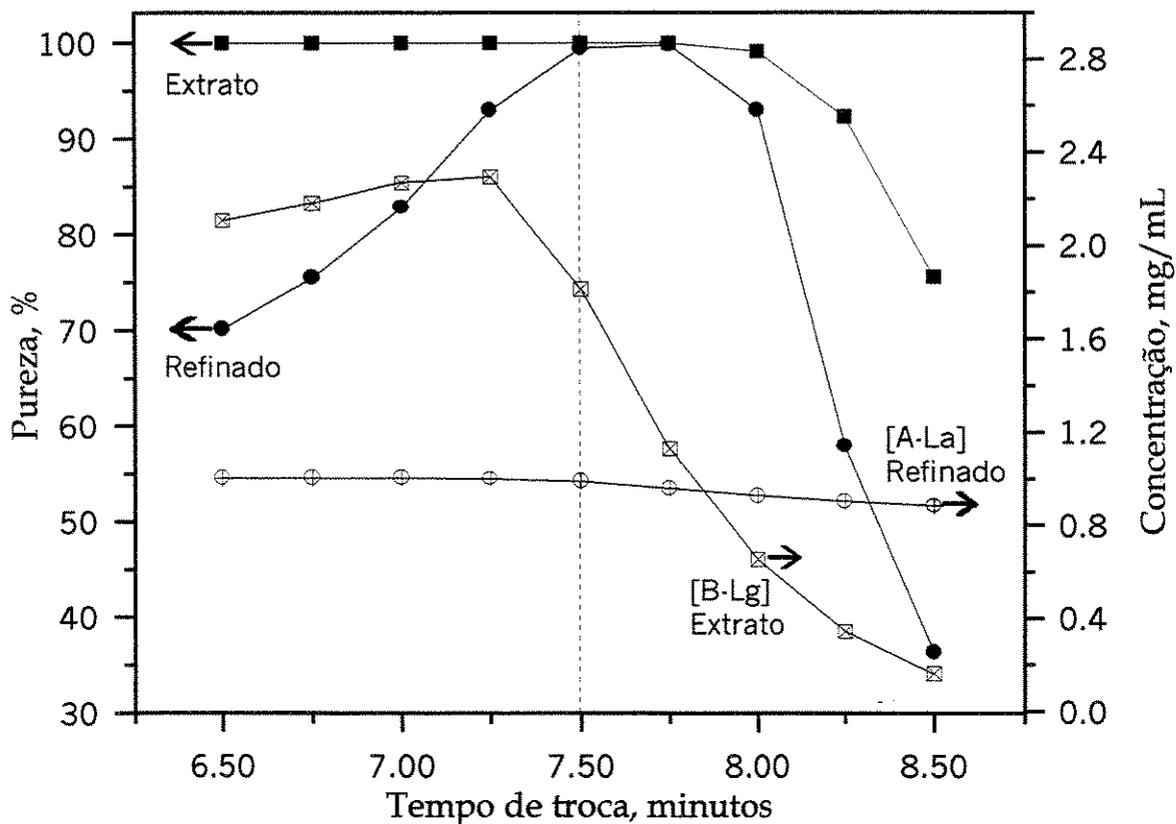


Figura 5.8.c: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Os símbolos são pontos simulados. $\beta_1=\beta_2=\beta_3=\beta_4=1,05$.

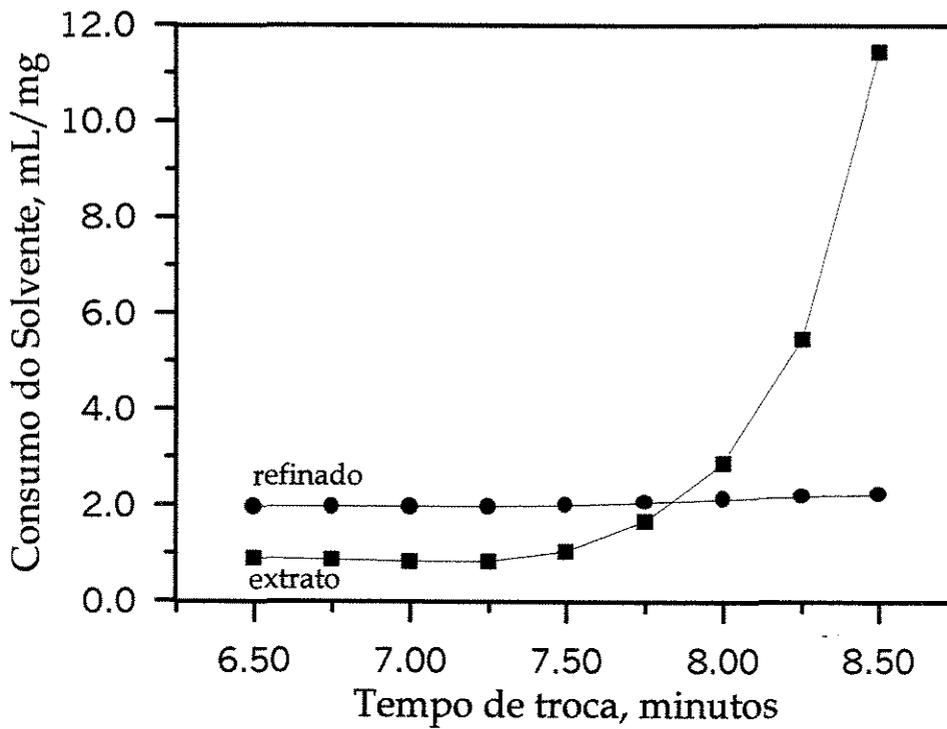


Figura 5.8.d: Consumo do solvente no extrato e no refinado como função do tempo de troca para $\beta_1=\beta_2=\beta_3=\beta_4=1,05$. Os símbolos são pontos calculados.

- **Conjunto 2:** $\beta_1=\beta_4=1,05$ e $\beta_2=\beta_3=1,15$

Este conjunto fornece a seguinte combinação de vazões em cada zona do LMS:

- Vazão na zona I = 2,174 mL/min;
- Vazão na zona II = 4,818 mL/min;
- Vazão na zona III= 2,437 mL/min;
- Vazão na zona IV= 5,631 mL/min.

As vazões de entrada e saída do sistema são:

- Vazão da alimentação= 2,381 mL/min;
- Vazão do refinado= 2,645 mL/min;
- Vazão do extrato= 3,193 mL/min;
- Vazão do dessorvente= 3,457 mL/min.

Os resultados para este conjunto são mostrados nas Figs.5.9.a, b, c e d.

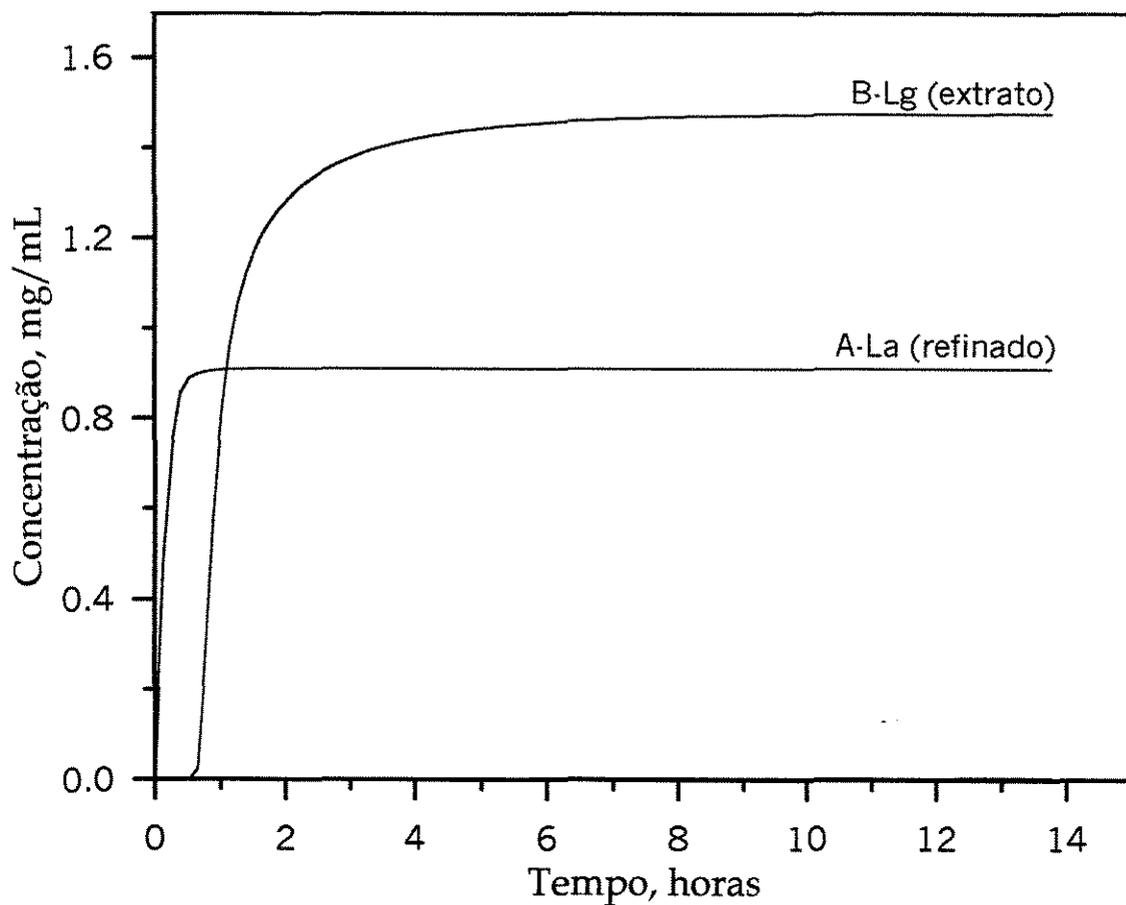


Figura 5.9.a: Perfis dinâmicos do extrato e do refinado. Tempo de troca igual a 7,5 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura binária 1:3. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,48%. $\beta_1=\beta_4=1,05$ e $\beta_2=\beta_3=1,15$.

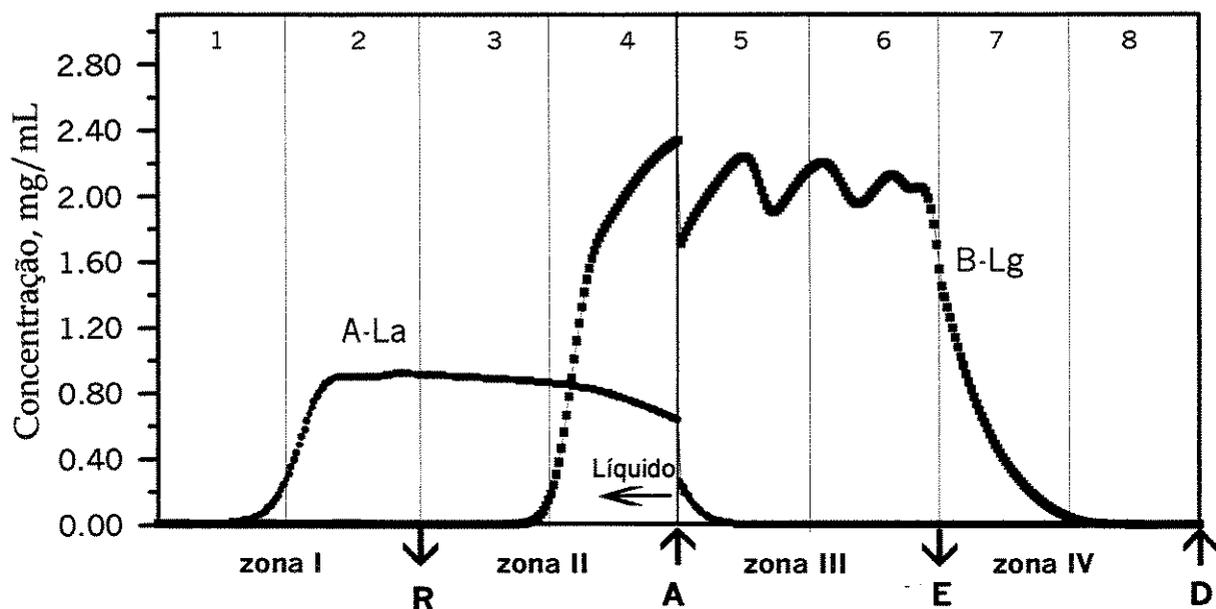


Figura 5.9.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera equilíbrio dispersivo. Tempo de troca igual a 7,5 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura 1:3; $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,07$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,48%. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para a A-La e 3,0 mg/mL para a B-Lg. $\beta_1=\beta_4=1,05$ e $\beta_2=\beta_3=1,15$.

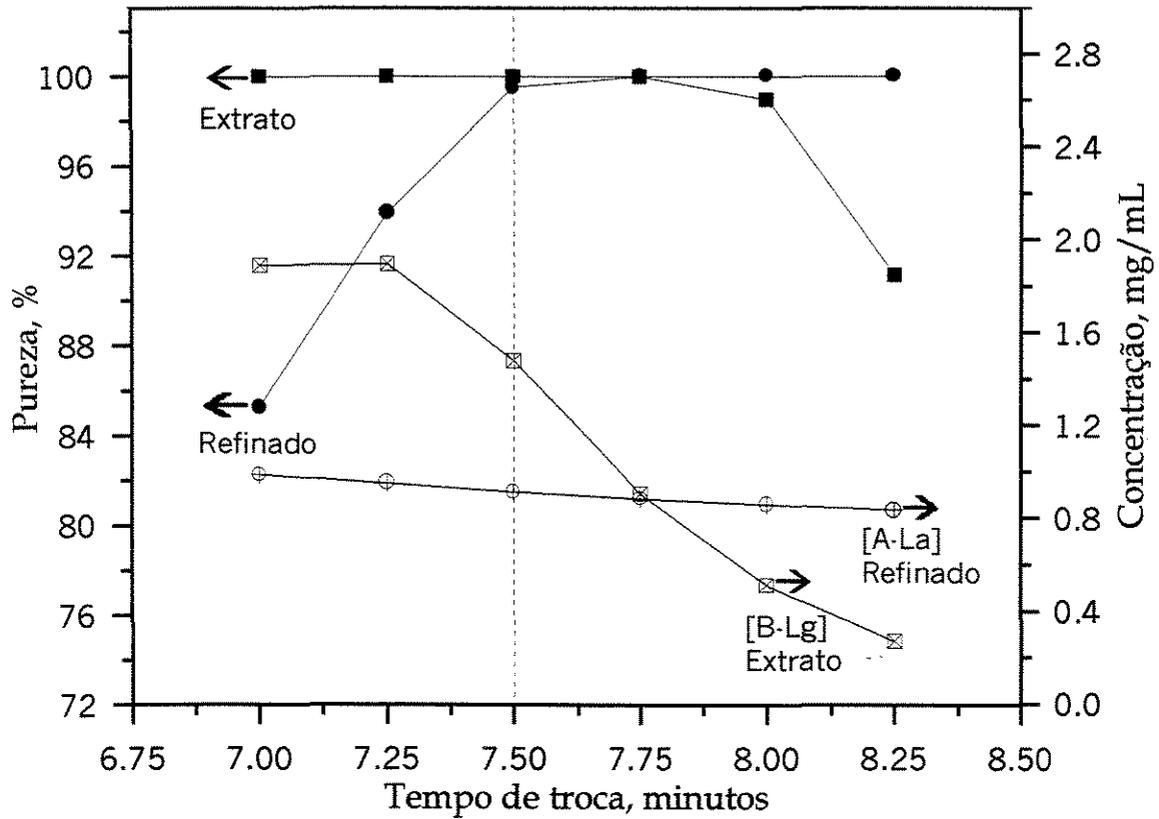


Figura 5.9.c: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Os símbolos são pontos simulados. $\beta_1=\beta_4=1,05$ e $\beta_2=\beta_3=1,15$.

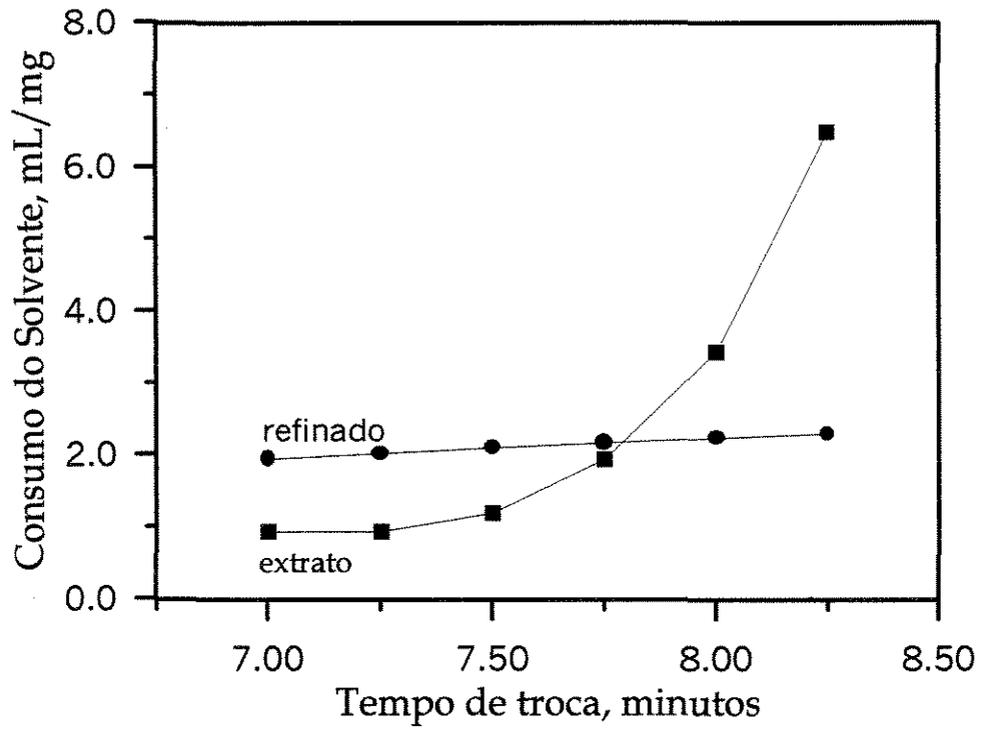


Figura 5.9.d: Consumo do solvente no extrato e no refinado como função do tempo de troca para $\beta_1=\beta_4=1,05$ e $\beta_2=\beta_3=1,15$. Os símbolos são pontos calculados.

- **Conjunto 3:** $\beta_1=\beta_4=1,15$ e $\beta_2=\beta_3=1,05$

Este conjunto fornece a seguinte combinação de vazões em cada zona do LMS:

- Vazão na zona I = 2,064 mL/min;
- Vazão na zona II = 5,191 mL/min;
- Vazão na zona III= 2,304 mL/min;
- Vazão na zona IV= 6,081 mL/min.

As vazões de entrada e saída do sistema são:

- Vazão da alimentação= 2,887 mL/min;
- Vazão do refinado= 3,128 mL/min;
- Vazão do extrato= 3,777 mL/min;
- Vazão do dessorvente= 4,017 mL/min.

Os resultados para este conjunto são mostrados nas Figs.5.10.a, b, c e d.

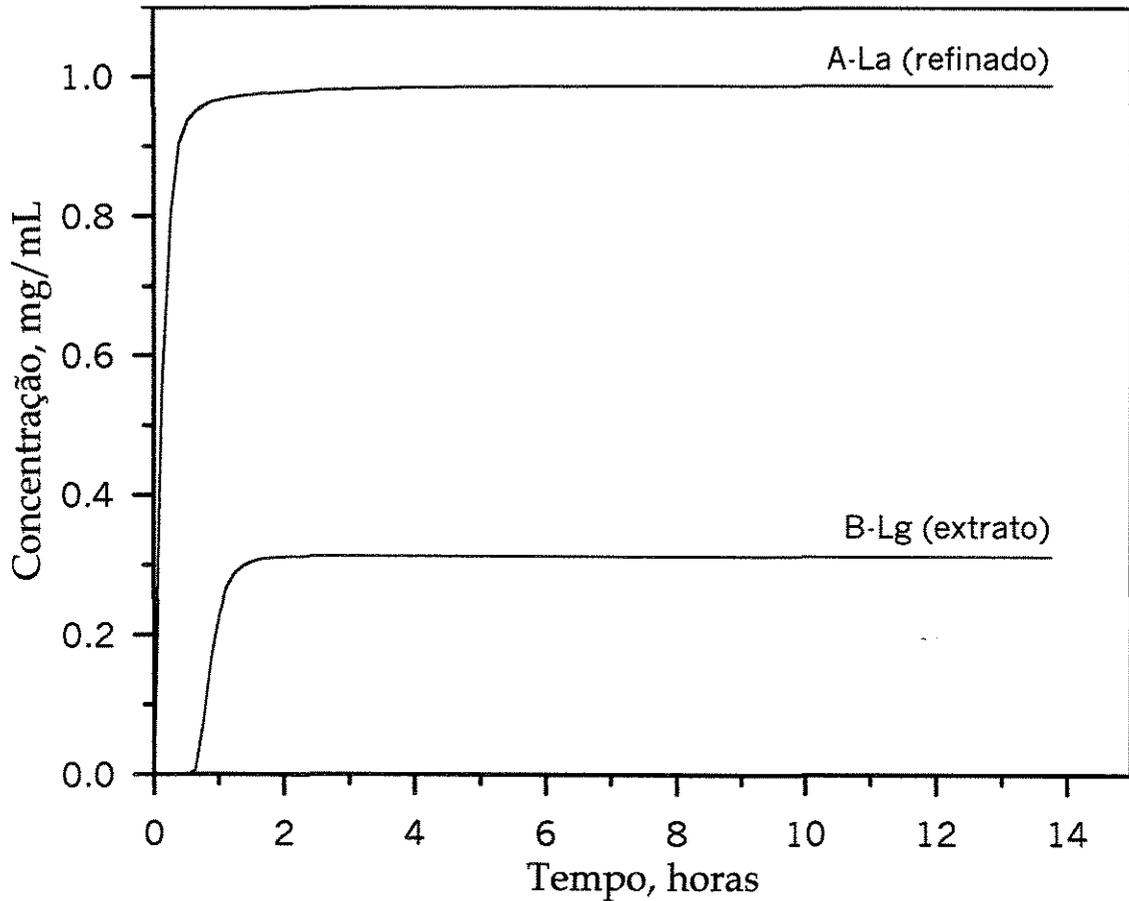


Figura 5.10.a: Perfis dinâmicos do extrato e do refinado. Tempo de troca igual a 7,5 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura binária 1:3. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 100%. $\beta_1=\beta_4=1,15$ e $\beta_2=\beta_3=1,05$.

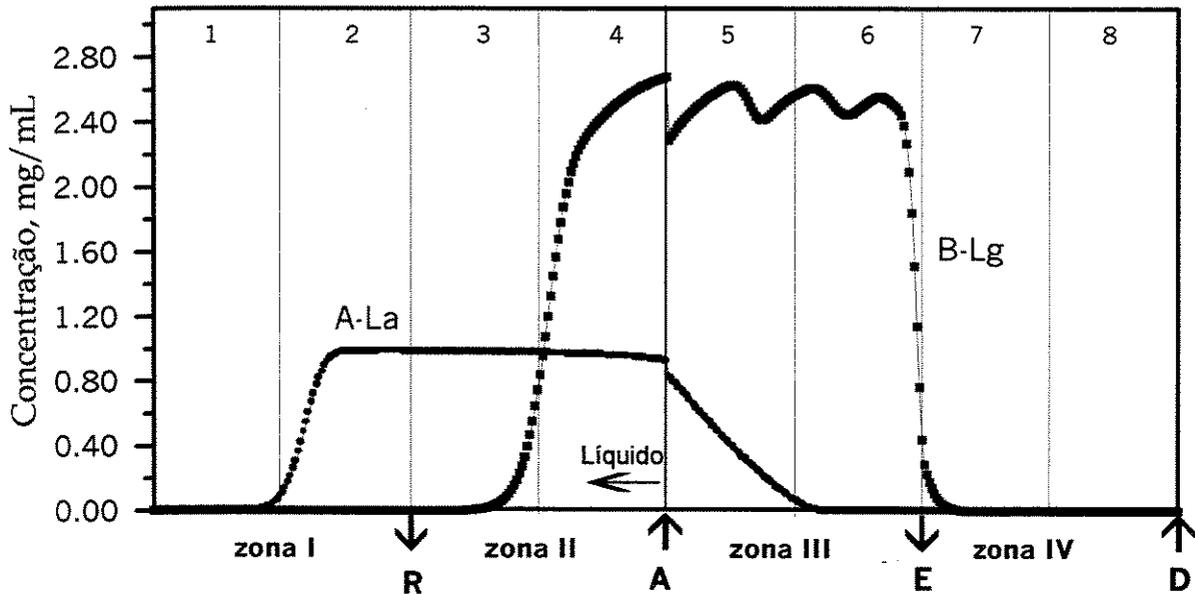


Figura 5.10.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera equilíbrio dispersivo. Tempo de troca igual a 7,5 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura 1:3; $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,07$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 100%. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para a A-La e 3,0 mg/mL para a B-Lg. $\beta_1=\beta_4=1,15$ e $\beta_2=\beta_3=1,05$.

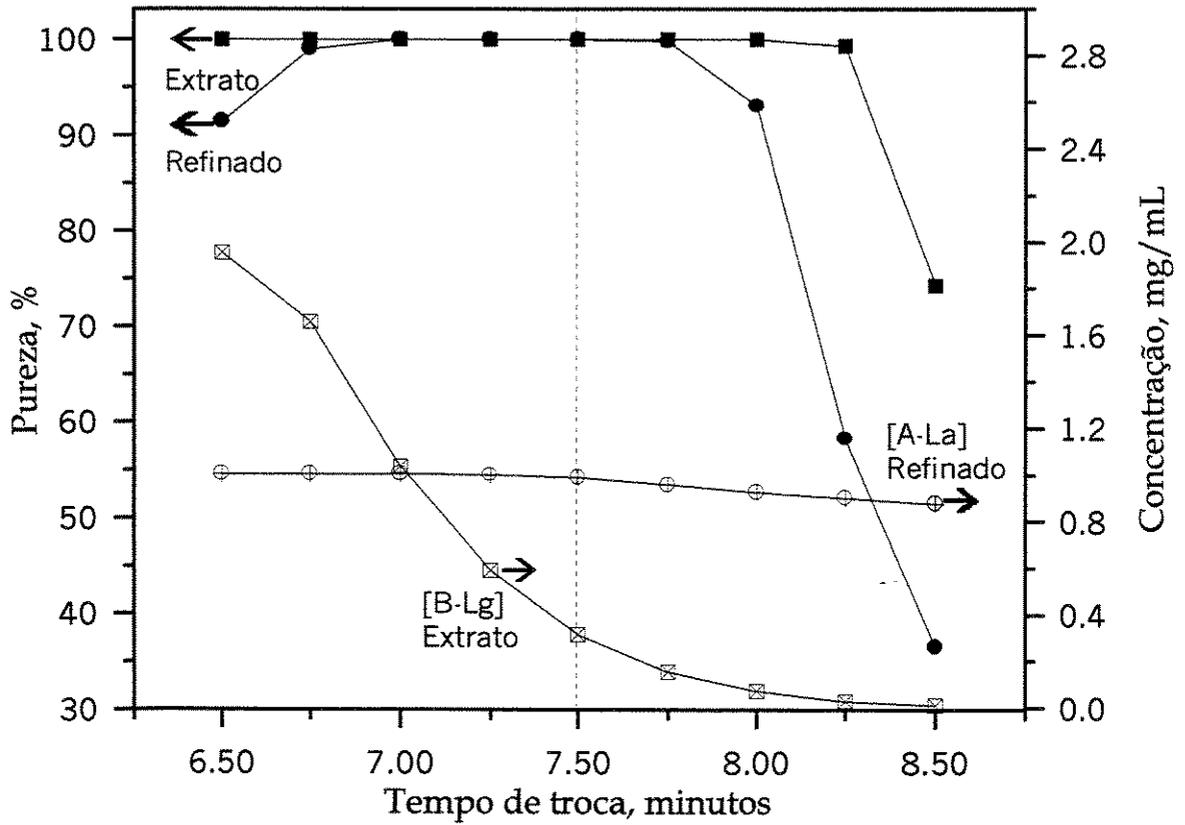


Figura 5.10.c: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Os símbolos são pontos simulados. $\beta_1=\beta_4=1,15$ e $\beta_2=\beta_3=1,05$.

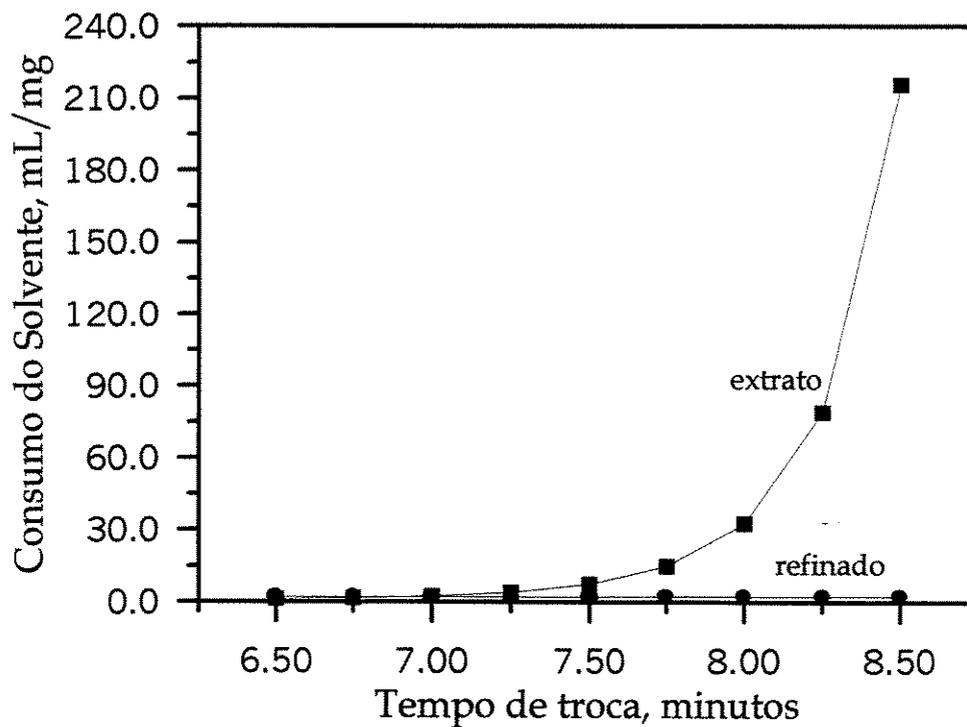


Figura 5.10.d: Consumo do solvente no extrato e no refinado como função do tempo de troca para $\beta_1=\beta_4=1,15$ e $\beta_2=\beta_3=1,05$. Os símbolos são pontos calculados.

- **Conjunto 4:** $\beta_1=\beta_4=1,05$; $\beta_2= 1,10$; $\beta_3=1,25$

Este conjunto fornece a seguinte combinação de vazões em cada zona do LMS:

- Vazão na zona I = 2,174 mL/min;
- Vazão na zona II = 4,996 mL/min;
- Vazão na zona III= 2,570 mL/min;
- Vazão na zona IV= 5,631 mL/min.

As vazões de entrada e saída do sistema são:

- Vazão da alimentação= 2,426 mL/min;
- Vazão do refinado= 2,823 mL/min;
- Vazão do extrato= 3,060 mL/min;
- Vazão do dessorvente= 3,457 mL/min.

Os resultados para este conjunto são mostrados na Fig.5.11.

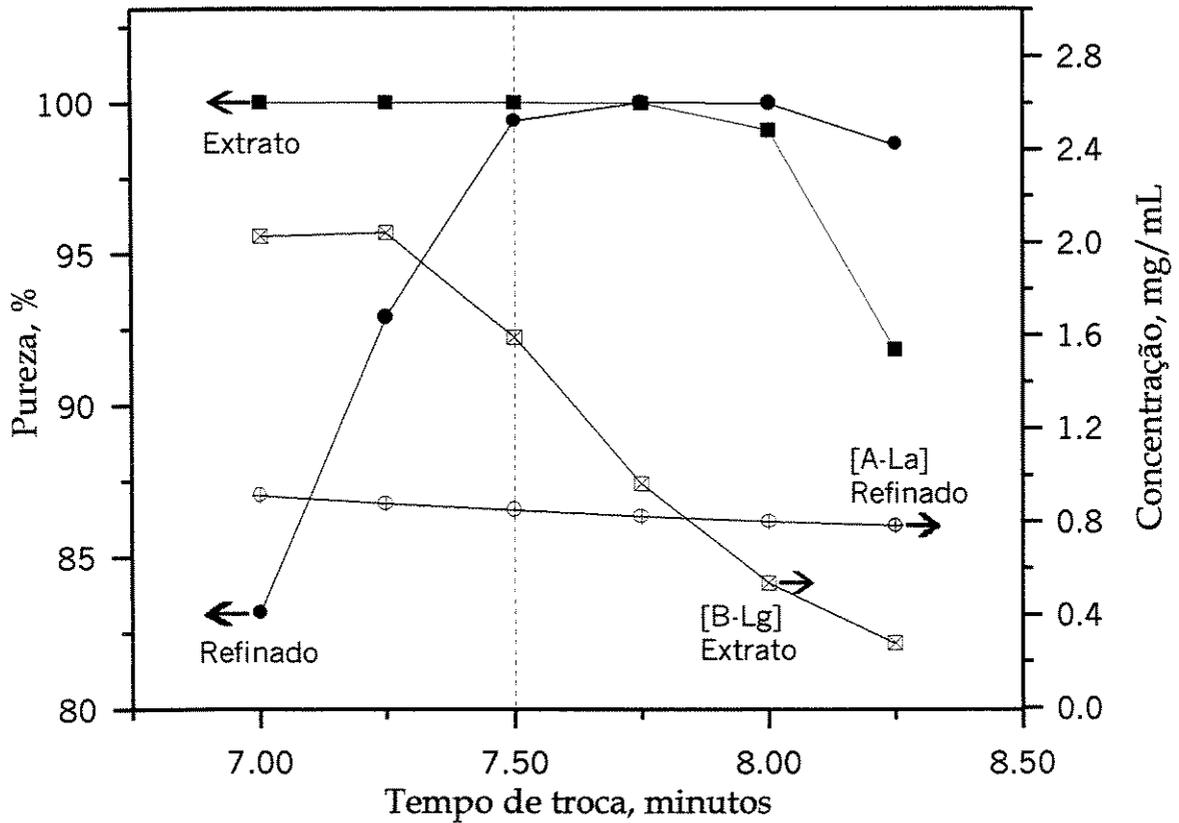


Figura 5.11: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Os símbolos são pontos simulados. $\beta_1=\beta_4=1,05$ e $\beta_2=1,10$; $\beta_3=1,25$.

- **Conjunto 5:** $\beta_1=\beta_4=1,05$ e $\beta_2=1,25$; $\beta_3=1,10$

Este conjunto fornece a seguinte combinação de vazões em cada zona do LMS:

- Vazão na zona I = 2,174 mL/min;
- Vazão na zona II = 4,505 mL/min;
- Vazão na zona III= 2,570 mL/min;
- Vazão na zona IV= 5,631 mL/min.

As vazões de entrada e saída do sistema são:

- Vazão da alimentação= 2,135 mL/min;
- Vazão do refinado= 2,332 mL/min;
- Vazão do extrato= 3,260 mL/min;
- Vazão do dessorvente= 3,457 mL/min.

Os resultados para este conjunto são mostrados na Fig.5.12.

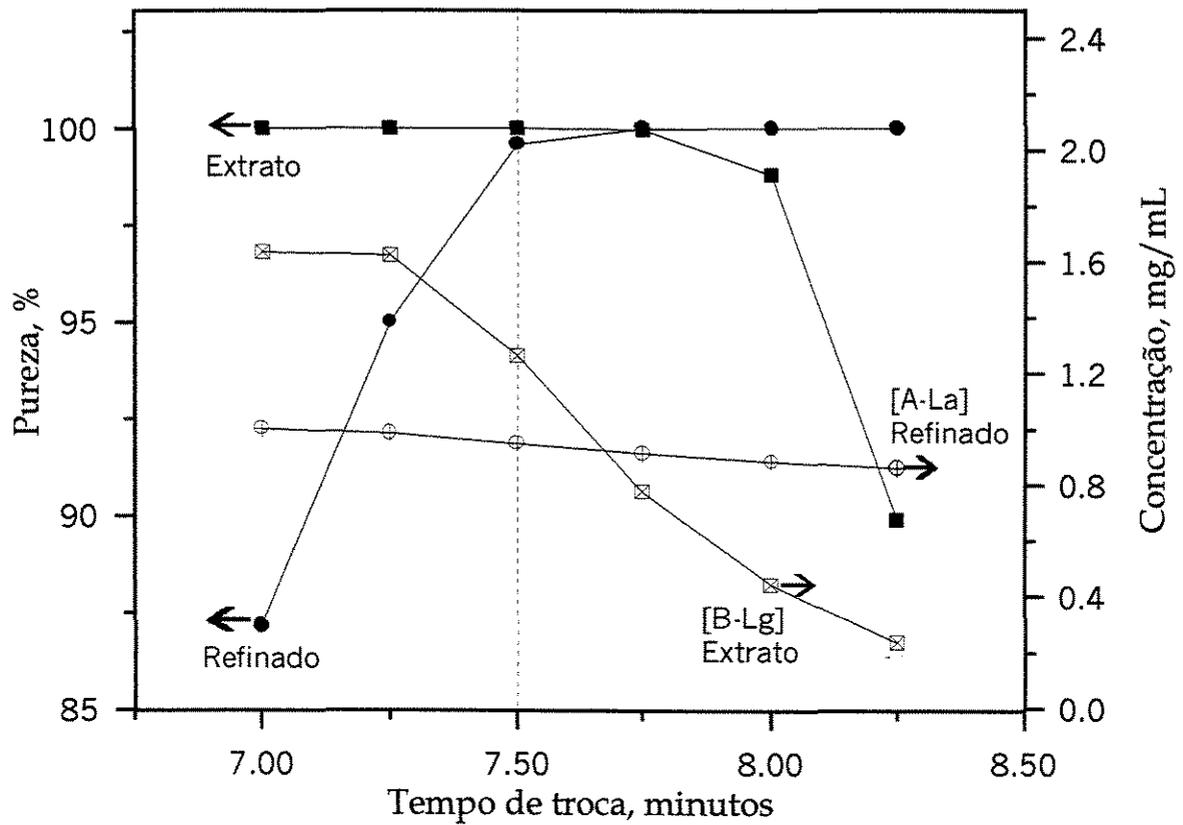


Figura 5.12: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=3,0$ mg/mL, $K_{A-La}=1,205$ e $K_{B-Lg}=4,070$. Os símbolos são pontos simulados. $\beta_1=\beta_4=1,05$ e $\beta_2=1,25$; $\beta_3=1,10$.

As tabelas 5.1.a e 5.1.b resumem os resultados obtidos para os cinco conjuntos dos parâmetros de segurança β_j utilizados no cálculo das vazões de operação do LMS para o tempo de troca igual a 7,50 minutos. Os valores presentes na tabela 5.1.b são para o estado estacionário.

Tabela 5.1.a: Vazões de entrada (alimentação e dessorvente) e de saída (extrato e refinado) para cinco conjuntos do parâmetro de segurança β_j .

β_j	Q_A (mL/min)	Q_D (mL/min)	Q_E (mL/min)	Q_R (mL/min)
$\beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = \beta_4 = 1,05$	2,887	3,457	3,327	3,017
$\beta_1 = \beta_4 = 1,05; \beta_2 = \beta_3 = 1,15$	2,381	3,457	3,193	2,645
$\beta_1 = \beta_4 = 1,15; \beta_2 = \beta_3 = 1,05$	2,887	4,017	3,777	3,128
$\beta_1 = \beta_4 = 1,05; \beta_2 = 1,10; \beta_3 = 1,25$	2,426	3,457	3,060	2,823
$\beta_1 = \beta_4 = 1,05; \beta_2 = 1,25; \beta_3 = 1,10$	2,135	3,457	3,260	2,332

Tabela 5.1.b: Concentrações, pureza e consumo de solvente no extrato e no refinado para cinco conjuntos do parâmetro de segurança β_j com o tempo de troca igual a 7,50 minutos.

β_j	$C_{B-Lg,E}$	$C_{A-La,R}$	PE%	PR%	CSE (mL/mg)	CSR (mL/mg)
$\beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = \beta_4 = 1,05$	1,81	0,99	100	99,41	1,03	1,98
$\beta_1 = \beta_4 = 1,05; \beta_2 = \beta_3 = 1,15$	1,48	0,91	100	99,48	1,18	2,09
$\beta_1 = \beta_4 = 1,15; \beta_2 = \beta_3 = 1,05$	0,31	0,99	100	100	7,39	2,11
$\beta_1 = \beta_4 = 1,05; \beta_2 = 1,10; \beta_3 = 1,25$	1,59	0,85	100	99,40	1,13	2,20
$\beta_1 = \beta_4 = 1,05; \beta_2 = 1,25; \beta_3 = 1,10$	1,26	0,95	100	99,59	1,31	2,02

5.2.2-SIMULAÇÕES UTILIZANDO PARÂMETROS DE EQUILÍBRIO DAS PROTEÍNAS PURAS APLICADOS NO MODELO DE EQUILÍBRIO DISPERSIVO

Neste caso temos: $K_{A-La}=0,873$ e $K_{B-Lg}=1,963$ ($\alpha=2,249$). Nas Figs. 5.13.a, 5.13.b e 5.13.c foi utilizada a seguinte combinação de vazões, obtidas utilizando os critérios de separação, sendo: $\beta_1=\beta_2=\beta_3=\beta_4=1,05$ com $Q_s=1,106$ mL/min.

Vazões em cada zona do LMS:

- Vazão na zona I = 1,824 mL/min;
- Vazão na zona II = 2,972 mL/min;
- Vazão na zona III= 1,918 mL/min;
- Vazão na zona IV= 3,183 mL/min.

As vazões de entrada e saída do sistema são:

- Vazão da alimentação= 1,053 mL/min;
- Vazão do refinado= 1,147 mL/min;
- Vazão do extrato= 1,265 mL/min;
- Vazão do dessorvente= 1,359 mL/min.

E ainda,

Concentração da A-La na alimentação = 1,0 mg/mL

Concentração da B-Lg na alimentação= 1,0 mg/mL

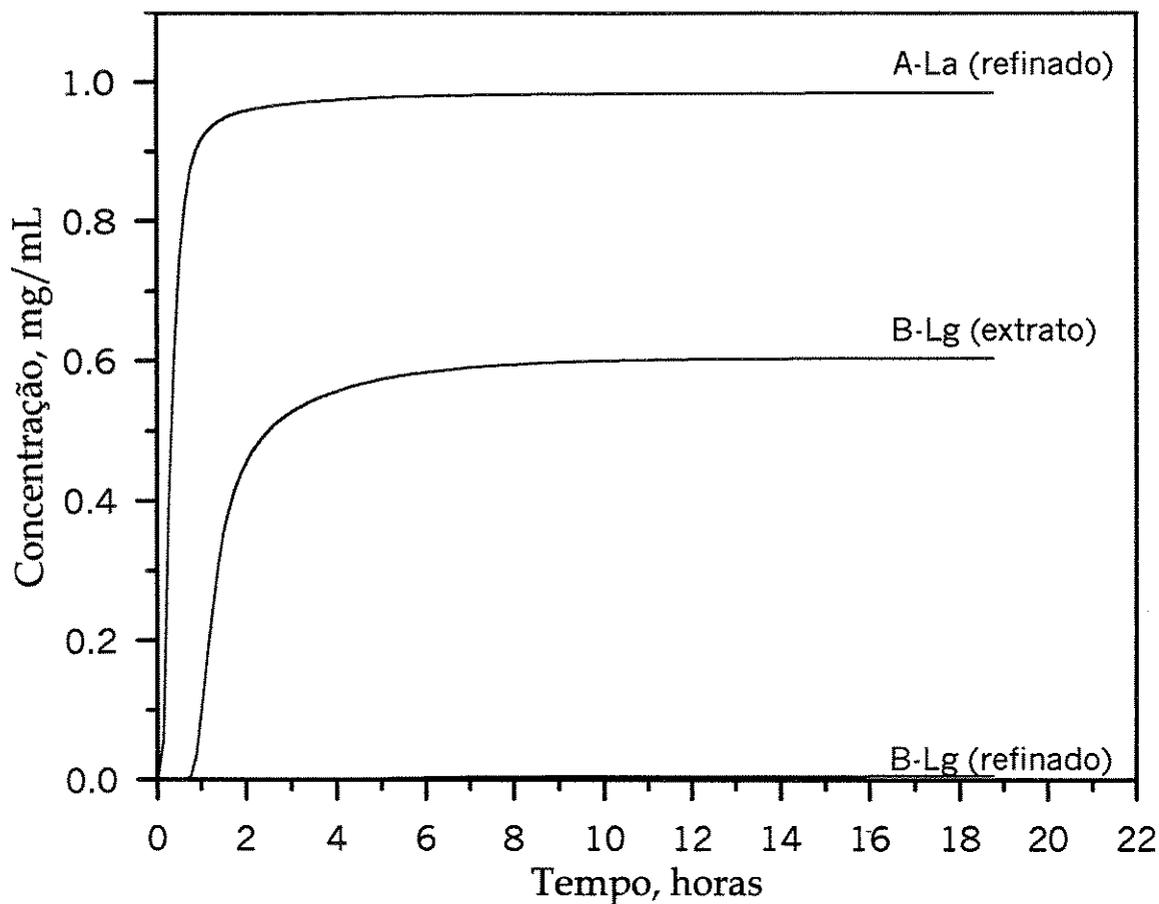


Figura 5.13.a: Perfis dinâmicos do extrato e do refinado. Tempo de troca igual a 7,50 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas puras. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL, $K_{A-La}=0,873$ e $K_{B-Lg}=1,963$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,41%. Consumo do solvente no extrato foi igual a 2,04 mL/mg e o consumo do solvente no refinado foi igual a 2,37 mL/mg.

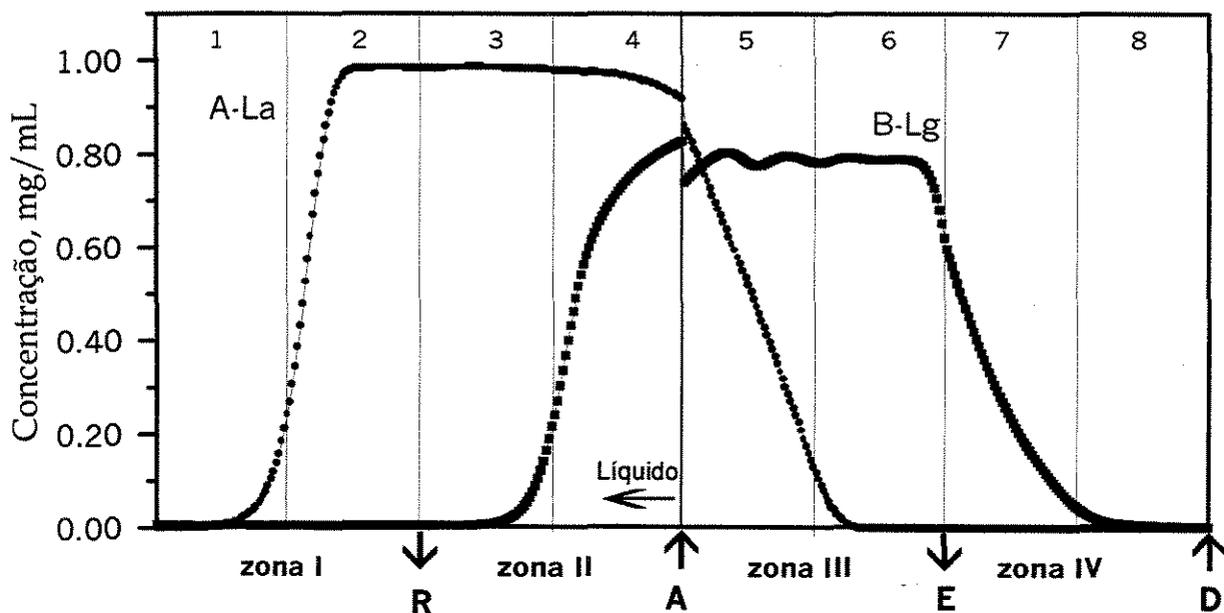


Figura 5.13.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona). Tempo de troca igual a 7,50 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas puras. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,41%. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL, $K_{A-La}=0,873$ e $K_{B-Lg}=1,963$.

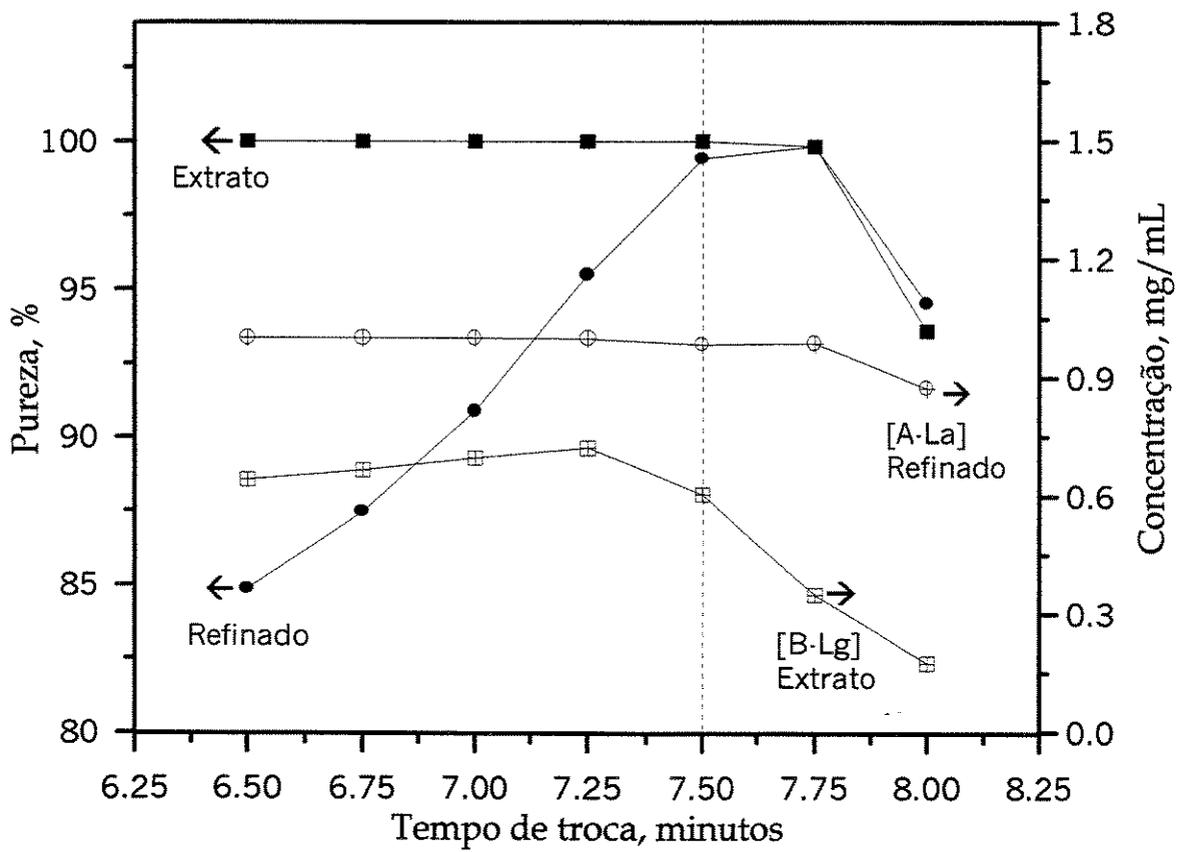


Figura 5.13.c: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL, $K_{A-La}=0,873$ e $K_{B-Lg}=1,963$. Os símbolos são pontos obtidos na simulação.

5.2.3-SIMULAÇÕES UTILIZANDO O MODELO DE FORÇA MOTRIZ LINEAR

Para aplicar este modelo, foi necessário obter o valor do parâmetro de transferência de massa, k_{fa_v} , para cada proteína. Isto foi feito ajustando este parâmetro às curvas de *breakthrough* experimentais obtidas para a mistura 1:1. A Fig.5.14 mostra o ajuste efetuado e os valores obtidos que foram aplicados na correspondente rotina do LMS. Obteve-se $k_{fa_v}=3,5 \text{ min}^{-1}$ para a A-La e $k_{fa_v}=4,3 \text{ min}^{-1}$ para a B-Lg.

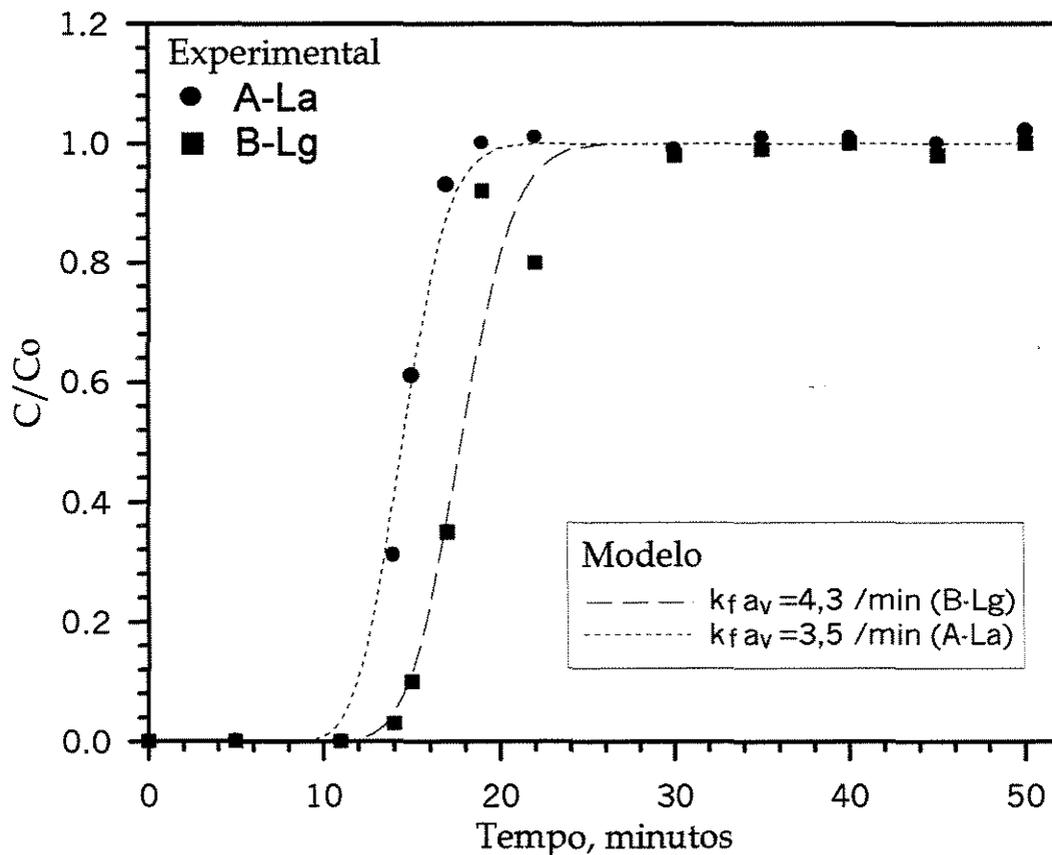


Figura 5.14: Curvas de *breakthrough* experimentais para a mistura 1:1 da proteínas A-La e B-Lg e o modelo (linhas) de força motriz linear aplicado para uma coluna 9,4 x 1,6 cm. A concentração na alimentação foi 1,0 mg/mL para ambas proteínas em tampão Bis-Tris-HCl pH 6,5 com 250 mM NaCl e a vazão foi 1,0 mL/min. Resina Accell-Plus QMA . Temperatura foi 25 °C.

Os parâmetros de equilíbrio são: $K_{A-La}=0,93$ e $K_{B-Lg}=1,26$.

Nas Figs. 5.15.a e 5.15.b foi utilizada a seguinte combinação de vazões:

Vazões em cada zona do LMS:

- Vazão na zona I = 0,993 mL/min
- Vazão na zona II = 1,798 mL/min
- Vazão na zona III= 1,201 mL/min
- Vazão na zona IV= 2,266 mL/min

As vazões de entrada e saída do sistema são:

- Vazão da alimentação= 0,597 mL/min
- Vazão do refinado= 0,805 mL/min
- Vazão do extrato= 1,065 mL/min
- Vazão do dessorvente= 1,273 mL/min

E ainda,

concentração da A-La na alimentação = 1,0 mg/mL

concentração da B-Lg na alimentação= 1,0 mg/mL

O consumo do solvente no extrato foi igual a 10,19 mL/mg e o consumo do solvente no refinado foi igual a 4,14 mL/mg no tempo de troca igual a 9,00 minutos.

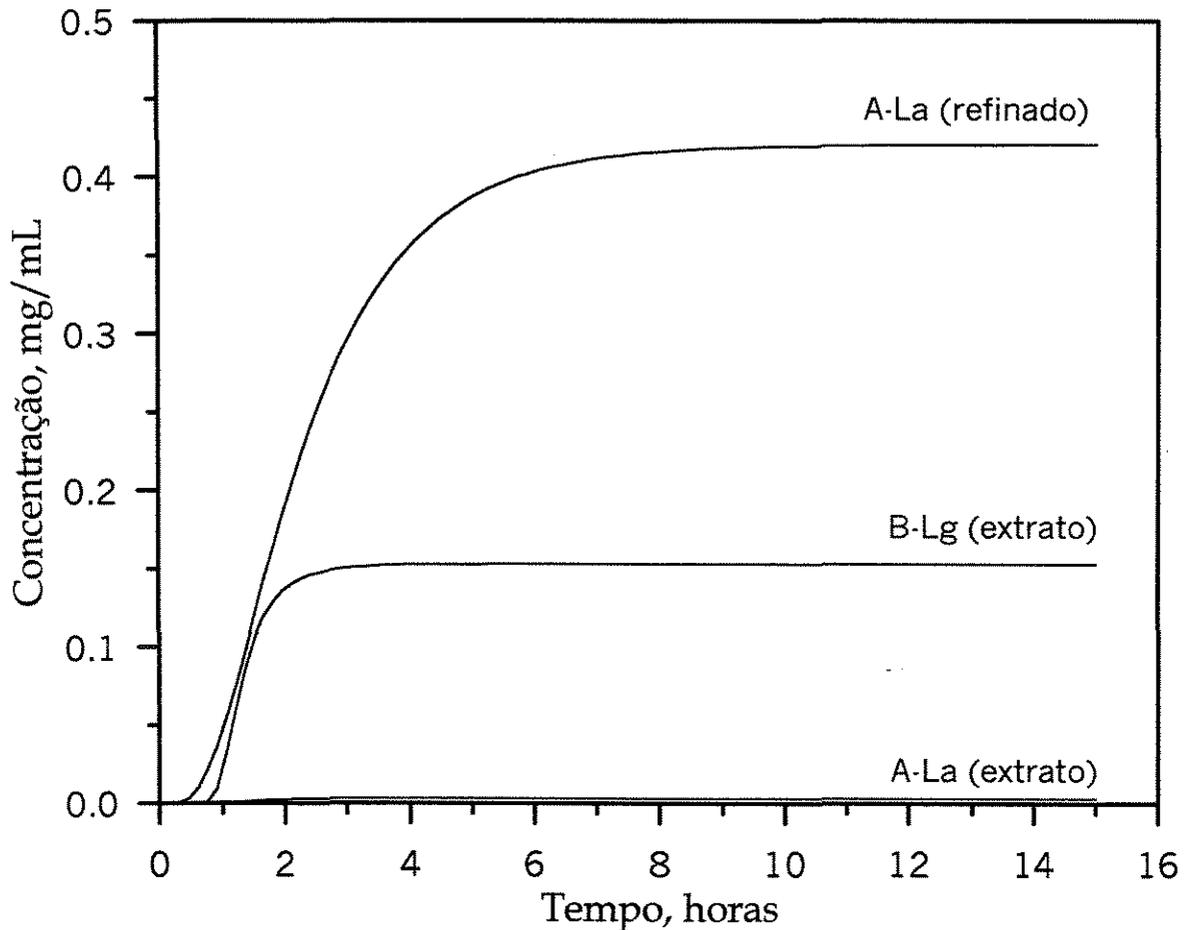


Figura 5.15.a: Perfis dinâmicos do extrato e do refinado obtidos pelo modelo que considera a taxa de adsorção representada por força motriz linear. Tempo de troca igual a 9,0 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura 1:1; $K_{A-La}=0,93$ e $K_{B-Lg}=1,26$. Parâmetros de transferência de massa: $k_{fa_v}=3,5 \text{ min}^{-1}$ para a A-La e $k_{fa_v}=4,3 \text{ min}^{-1}$ para a B-Lg. Pureza do extrato: 97,9%; pureza do refinado: 100%. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para ambas proteínas. Consumo do solvente no extrato foi igual a 10,19 mL/mg e o consumo do solvente no refinado foi igual a 4,14 mL/mg.

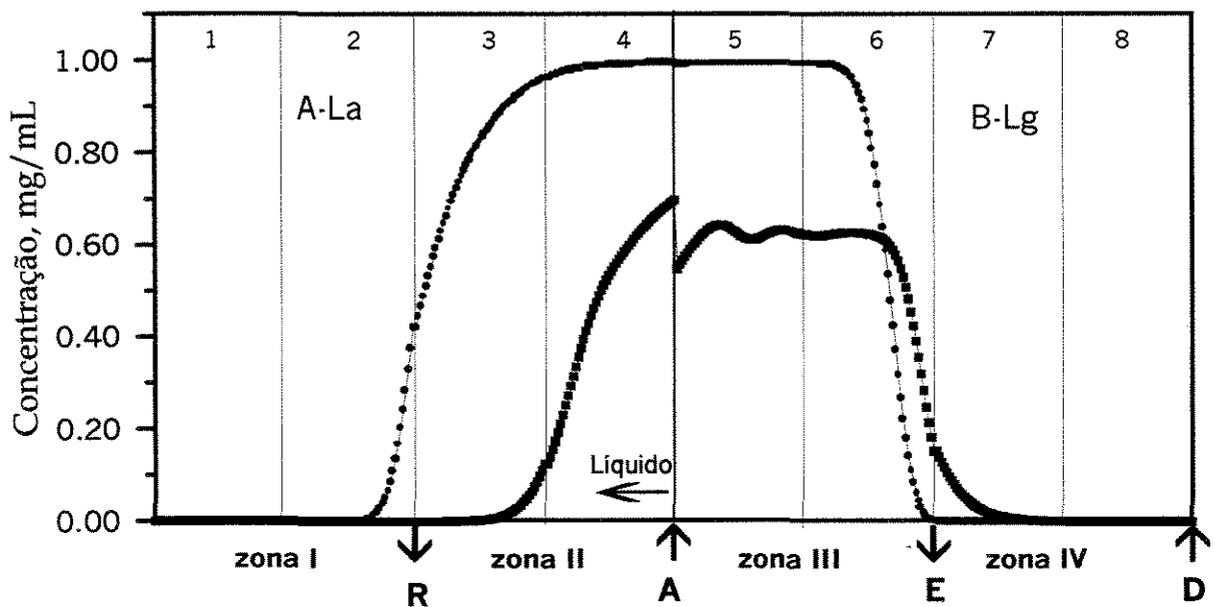


Figura 5.15.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera a taxa de adsorção representada por força motriz linear. Tempo de troca igual a 9,0 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas numa mistura 1:1; $K_{A-La}=0,93$ e $K_{B-Lg}=1,26$. Pureza do extrato: 97,9%; pureza do refinado: 100%. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para ambas proteínas.

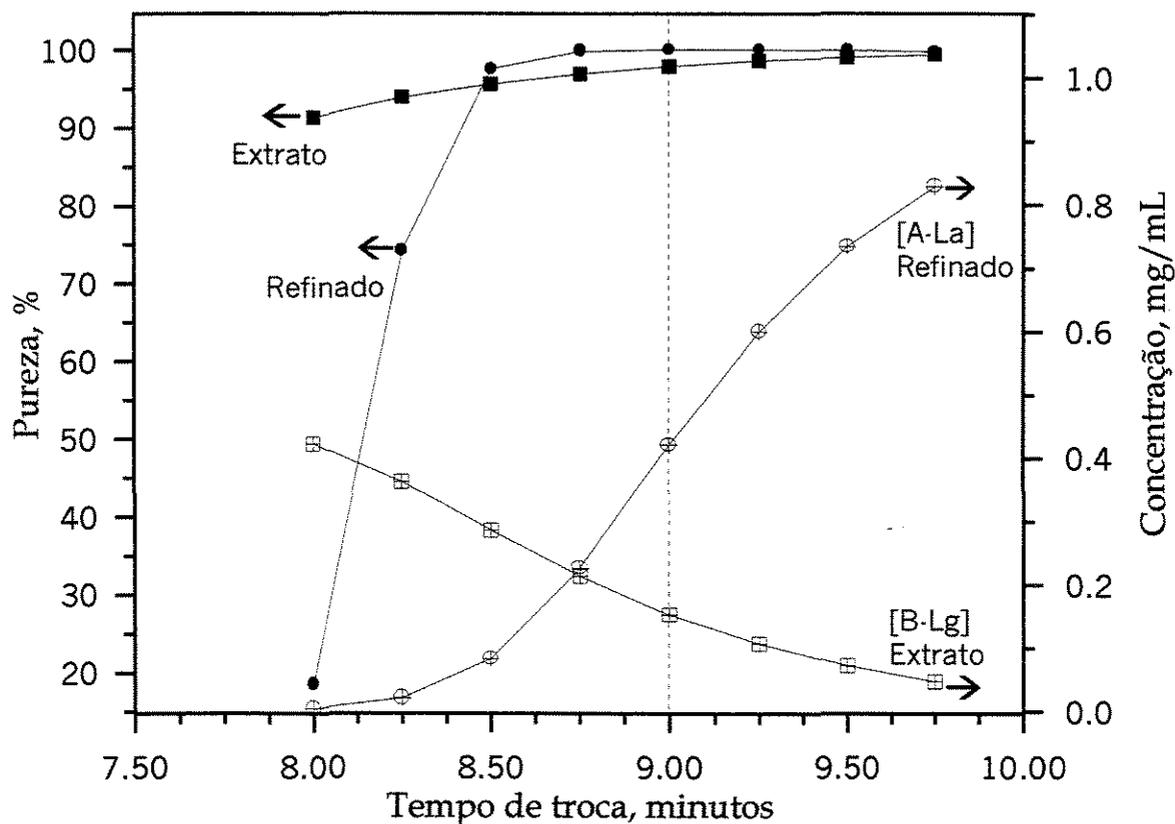


Figura 5.15.c: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL. Os símbolos são pontos obtidos na simulação do LMS que considera a taxa de adsorção representada por força motriz linear.

5.2.4-SIMULAÇÕES UTILIZANDO PARÂMETROS DE EQUILÍBRIO DA MISTURA BINÁRIA 1:1 APLICADOS NO MODELO EQUILÍBRIO DISPERSIVO

Nas Figs. 5.16.a, b e c foi utilizada a mesma combinação de vazões utilizadas no modelo que considera força motriz linear (item 5.2.3). Para a mistura binária 1:1, os parâmetros de equilíbrio são: $K_{A-La}=0,93$ e $K_{B-Lg}=1,26$.

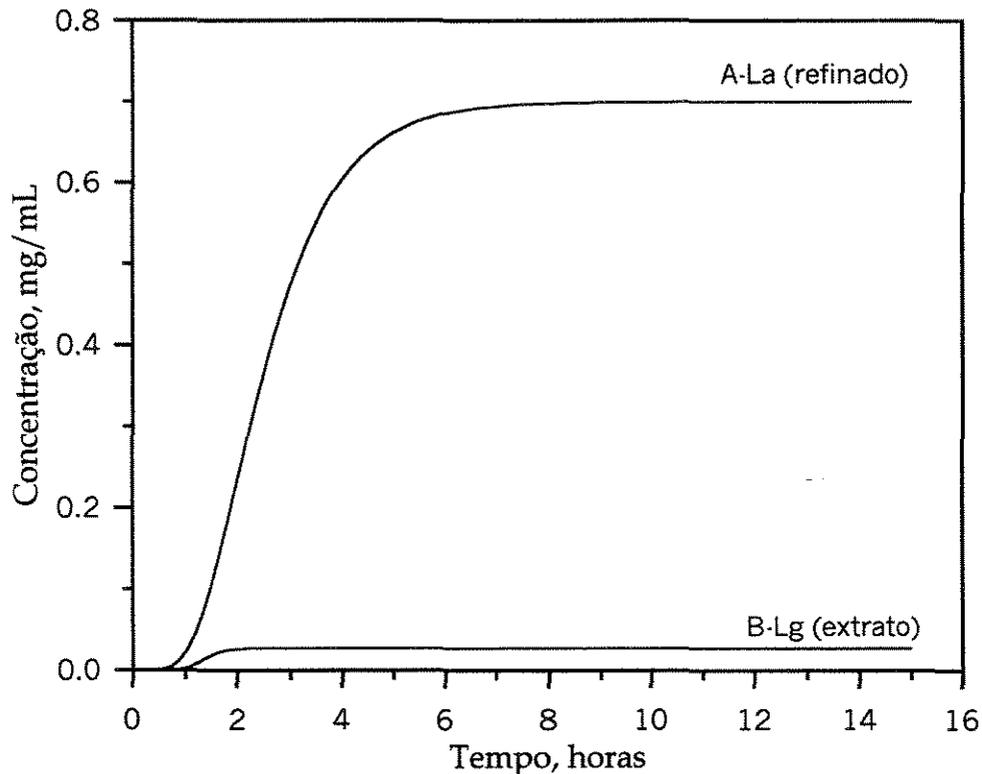


Figura 5.16.a: Perfis dinâmicos do extrato e do refinado. Tempo de troca igual a 9,00 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas na mistura binária 1:1. $C_{A-La,R}=0,70$ mg/mL e $C_{B-Lg,E}=0,03$ mg/mL, $K_{A-La}=0,93$ e $K_{B-Lg}=1,26$. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 100%. Consumo do solvente no extrato foi igual a 52,02 mL/mg e o consumo do solvente no refinado foi igual a 2,49 mL/mg. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL.

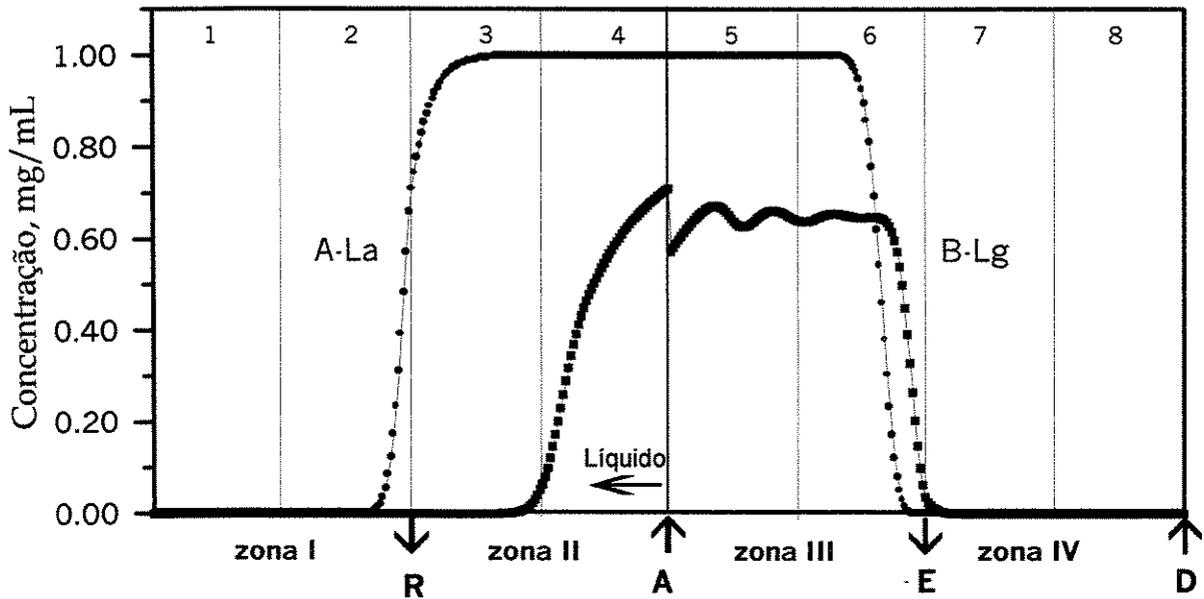


Figura 5.16.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona). Tempo de troca igual a 9,00 minutos. Parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas na mistura binária 1:1. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 100%. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL, $K_{A-La}=0,93$ e $K_{B-Lg}=1,26$.

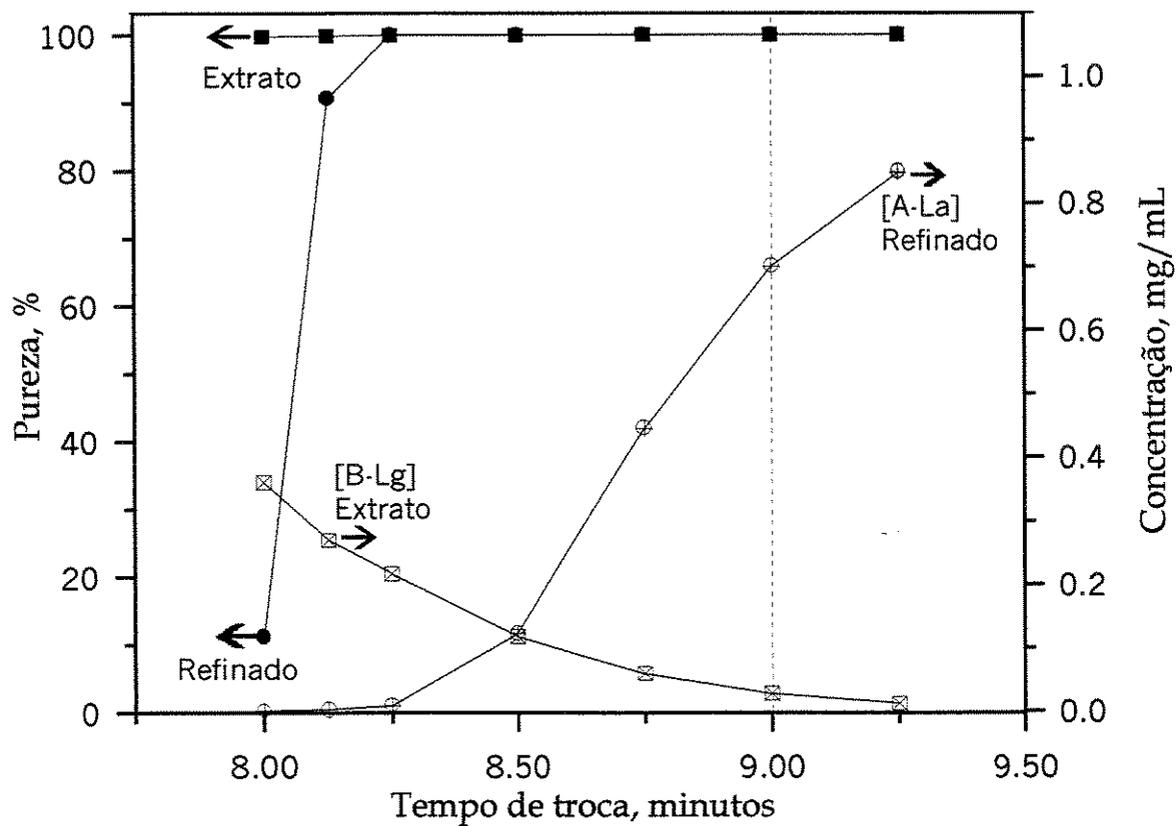


Figura 5.16.c: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL. $K_{A-La}=0,93$ e $K_{B-Lg}=1,26$. Os símbolos são pontos simulados.

5.2.5 SIMULAÇÕES DO MODELO DE EQUILÍBRIO DISPERSIVO QUE CONSIDERA ADSORÇÃO COMPETITIVA

Para aplicar este modelo, foram "supostas" duas isotermas competitivas com base nas isotermas experimentais para a mistura binária 1:1. A suposição foi feita apenas com o intuito de aplicar o modelo do LMS competitivo. A Fig. 5.16 mostra, graficamente, as isotermas representadas matematicamente nas equações 5.3a e 5.3b :

$$q^*_{A-La} = \frac{(45)(0,0476)C^*_{A-La}}{(1 + 0,0476C^*_{A-La} + 0,0625C^*_{B-Lg})} \quad (5.3a)$$

$$q^*_{B-Lg} = \frac{(50)(0,0625)C^*_{B-Lg}}{(1 + 0,0625C^*_{B-Lg} + 0,0476C^*_{A-La})} \quad (5.3b)$$

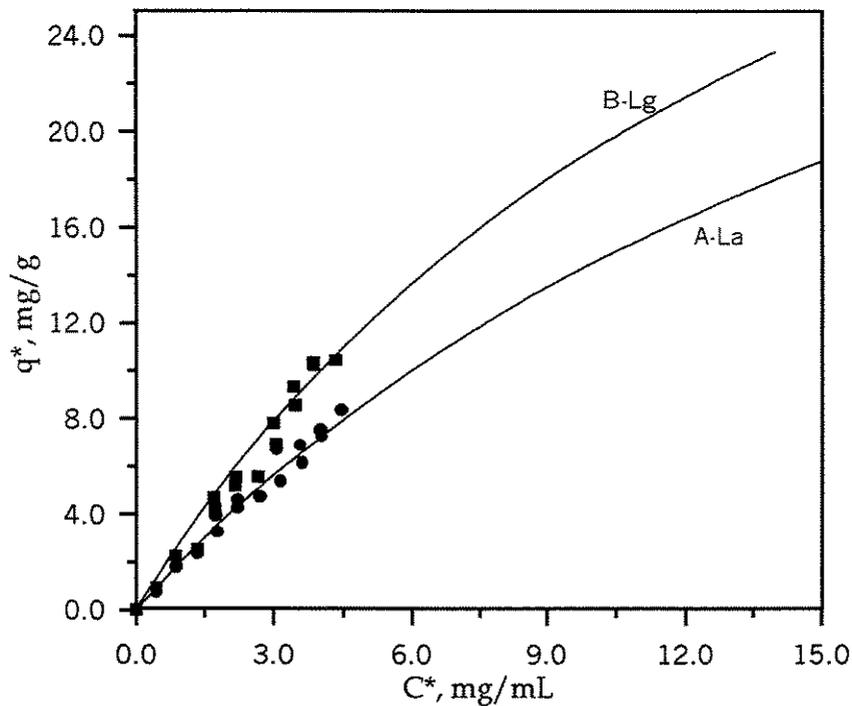


Figura 5.17: Isotermas competitivas aplicadas na rotina do LMS competitivo.

Foram aplicadas as seguinte vazões:

Vazões em cada zona do LMS:

- Vazão na zona I = 0,993 mL/min
- Vazão na zona II = 1,798 mL/min
- Vazão na zona III= 1,201 mL/min
- Vazão na zona IV= 2,266 mL/min

As vazões de entrada e saída do sistema são:

- Vazão da alimentação= 0,597 mL/min
- Vazão do refinado= 0,805 mL/min
- Vazão do extrato= 1,065 mL/min
- Vazão do dessorvente= 1,273 mL/min

E ainda,

Concentração da A-La na alimentação = 1,0 mg/mL

Concentração da B-Lg na alimentação= 1,0 mg/mL

Os resultados para este caso são mostrados nas Figs.5.18.a,b,c e d. A Fig.5.19 mostra o consumo de solvente no extrato e no refinado como função do tempo de troca.

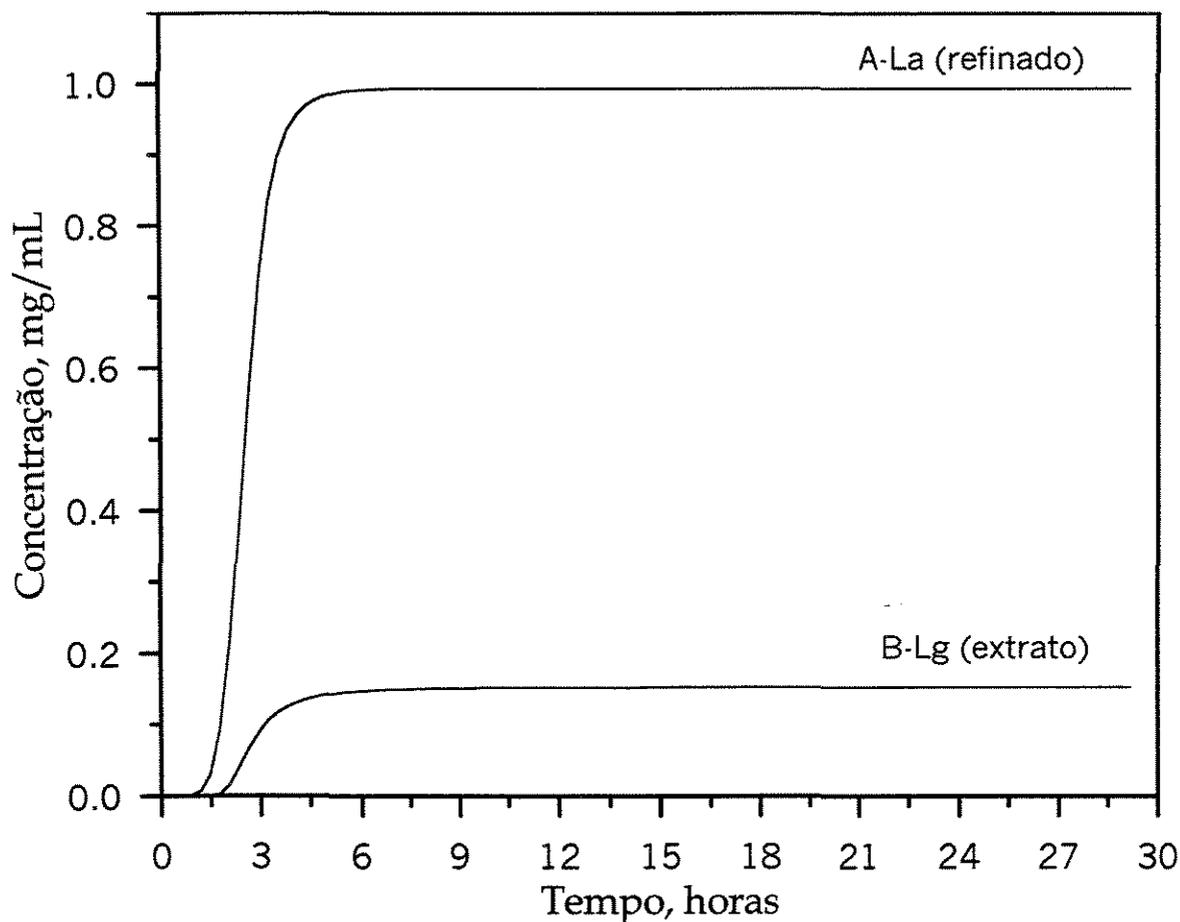


Figura 5.18.a: Perfis de concentrações dinâmicos do extrato e refinado para o LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera adsorção competitiva. Tempo de troca igual a 17,50 minutos. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 100%. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para ambas proteínas. Concentração da A-La no refinado= 0,994 mg/mL e concentração da B-Lg no extrato= 0,152 mg/mL.

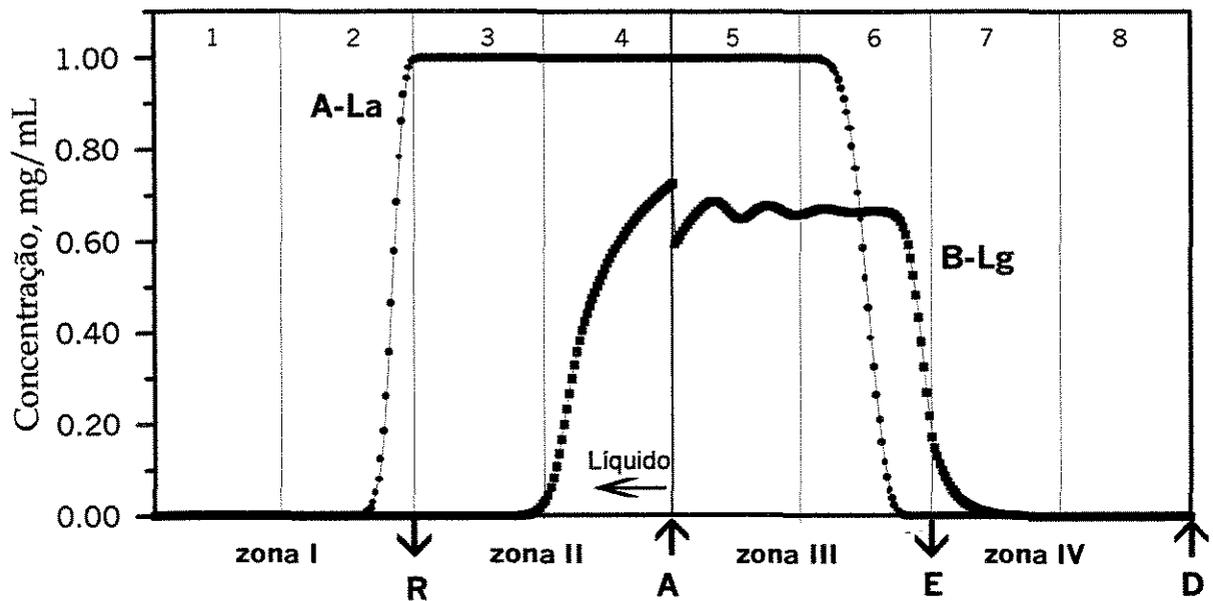


Figura 5.18.b: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera adsorção competitiva. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para ambas proteínas. Tempo de troca igual a 17,50 minutos. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 100%. Concentração da A-La no refinado=0,994 mg/mL e concentração da B-Lg no extrato= 0,152 mg/mL. CSE=10,23 mL/mg; CSR=1,75 mL/mg.

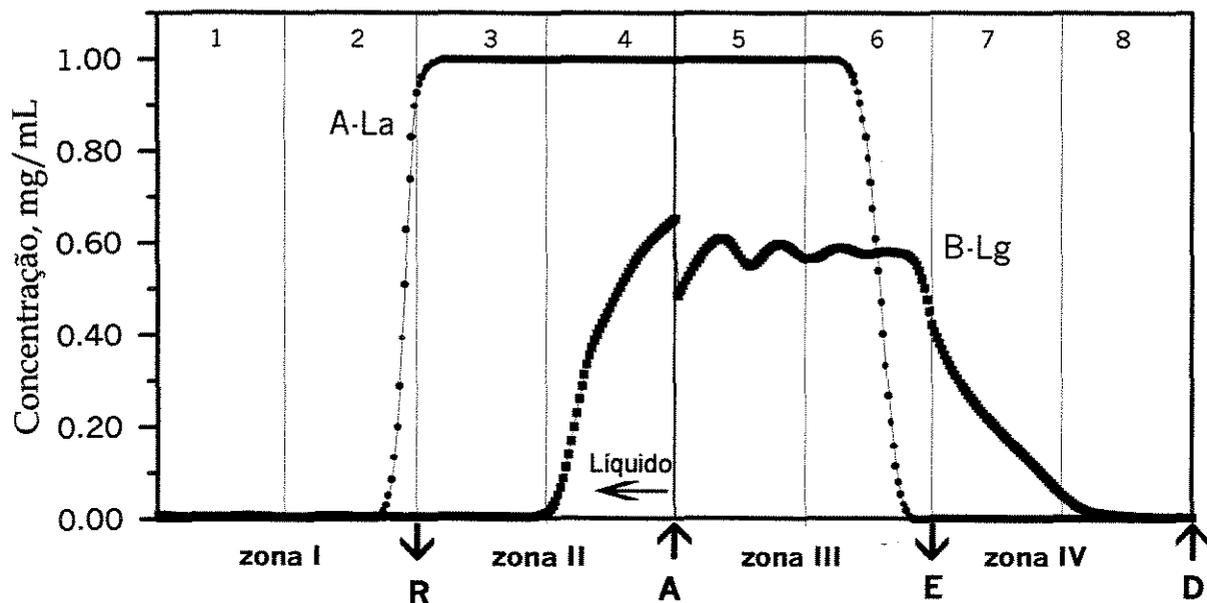


Figura 5.18.c: Perfis internos do LMS com 8 colunas (2 por zona) obtido pelo modelo que considera adsorção competitiva. Concentração da alimentação foi 1,0 mg/mL para ambas proteínas. Tempo de troca igual a 16,50 minutos. Pureza do extrato: 100%; pureza do refinado: 99,31%. Concentração da A-La no refinado=0,924 mg/mL e concentração da B-Lg no extrato= 0,410 mg/mL. CSE=3,81 mL/mg; CSR=1,88 mL/mg.

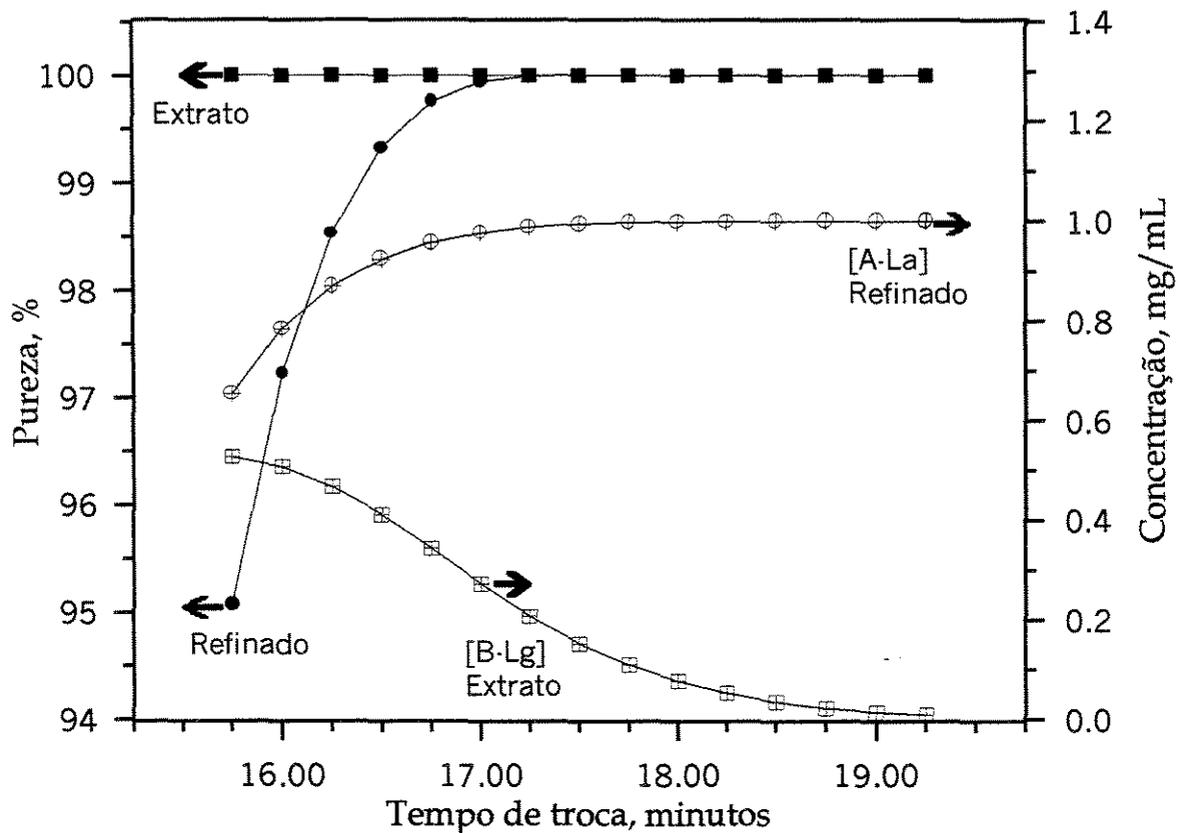


Figura 5.18.d: Pureza e concentração do extrato e do refinado como função do tempo de troca. $C_{A-La,A}=1,0$ mg/mL e $C_{B-Lg,A}=1,0$ mg/mL. Os símbolos são pontos obtidos na simulação do LMS aplicando os parâmetros das isotermas competitivas.

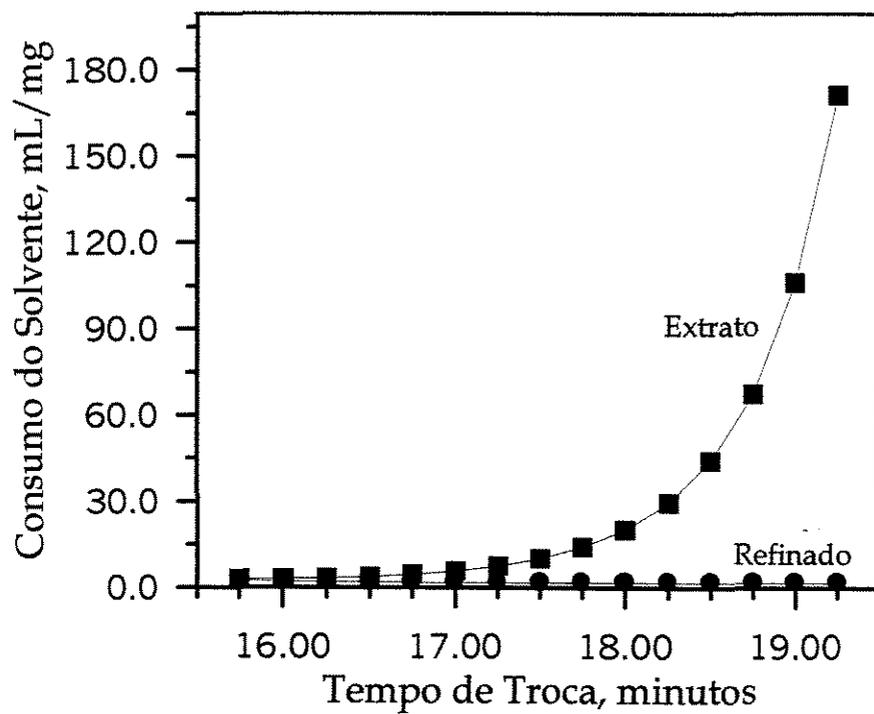


Figura 5.19: Consumo do solvente no extrato e no refinado como função do tempo de troca para o LMS Langmuir competitivo. Os símbolos são pontos calculados.

Capítulo Seis

DISCUSSÕES

6.1-PARTE EXPERIMENTAL

As proteínas α -lactalbumina (A-La) com pI igual a 4,8 e a β -lactoglobulina (B-Lg) com pI entre 5,4 e 5,5 quando dissolvidas numa solução com pH 6,5 apresentam carga líquida negativa e, assim, podem ser adsorvidas em resinas trocadoras de ânions como a Accell Plus QMA (em pH 6,5 a B-Lg apresenta-se na forma de dímero). Esta resina é um trocador de ânions forte, ou seja, as cargas iônicas características de seus grupos são mantidas numa faixa ampla de pH. Esta resina também possui, para soluções sem a presença do sal NaCl, grande capacidade de adsorção (valores de q^m em torno de 300 mg de proteína/g de resina) e adsorve fortemente as proteínas A-La e B-Lg (constantes de dissociações, em termos molares, sendo $K_d=2,36 \times 10^{-6}$ M para a A-La e $K_d=10,05 \times 10^{-6}$ M para a B-Lg). As isotermas do tipo Langmuir obtidas para ambas sem a presença de NaCl são mostradas na Fig.4.3. No entanto, a alta capacidade e força de adsorção desta resina na ausência de sal não permitem a separação de ambas no sistema LMS aqui estudado, visto que ambas proteínas ficam muito fortemente ligadas à fase sólida. Na tentativa de obter condições propícias à separação de ambas no sistema LMS, foram efetuados experimentos de equilíbrio (isotermas) para a B-Lg com diferentes concentrações de NaCl e assim foi possível avaliar os efeitos deste sal nas constantes de adsorção. A Fig.4.4 mostra as isotermas da B-Lg obtidas com três diferentes concentração de NaCl: 125 mM, 160 mM e 250 mM. Pode-se observar que a presença de sal tem um efeito significativo nas constantes de adsorção e um aumento na concentração do sal promove uma diminuição na capacidade de adsorção e faz com que a proteína adsorva muito mais fracamente quando se compara com a adsorção sem a presença de sal. Além disso, pode-se observar que

quanto maior é a concentração de sal, maior é a faixa de concentrações onde a adsorção é linear. A presença dos íons Na^+ e Cl^- faz com que haja menos cargas disponíveis na resina para serem trocadas com as proteínas.

As constantes de adsorção da B-Lg obtidas nessas três concentrações de sal foram utilizadas para simular curvas de *breakthrough* em colunas com as dimensões físicas das colunas que seriam utilizadas num sistema LMS. Os resultados da simulação de uma coluna com 10,0 cm de comprimento e 1,6 cm de diâmetro interno podem ser vistos na Fig. 5.5. Nota-se que o tempo de *breakthrough* esperado seria de aproximadamente 12,5 horas quando se usa 125 mM de sal, cerca de 4 horas com 160 mM de sal e menos que 30 minutos quando se utiliza 250 mM de sal. As condições de adsorção mais favoráveis à separação num sistema LMS foram aquelas dadas pela utilização de 250 mM de NaCl e, então, foi obtida a isoterma para a A-La nesta condição. As duas isotermas (A-La e B-Lg) obtidas com 250 mM de sal são mostradas na Fig. 4.5 e pode-se ver, para ambas, uma boa relação linear entre a concentração média no adsorvente (q^*) em equilíbrio com a concentração no líquido sobrenadante (C^*). Podemos observar que a A-La e a B-Lg apresentam constantes de adsorção bem distintas, sendo que a B-Lg adsorve mais fortemente que a A-La ($K_{A-La}=1,746 \text{ mL/g}$ e $K_{B-Lg}=3,925 \text{ mL/g}$).

Para uma aplicação prática no LMS, essas proteínas estarão presentes numa mistura binária e, assim, torna-se interessante conhecer o comportamento da adsorção de ambas nesta condição. Foram, então, obtidas isotermas para uma mistura binária contendo a A-La e a B-Lg numa proporção mássica 1:1 na presença de 250 mM de NaCl. O resultado pode ser visto na Fig.4.6 e os pontos experimentais mostram uma boa relação linear entre q^* e C^* . Podemos observar que a A-La e a B-Lg também apresentam constantes de adsorção bem distintas quando a adsorção procede a partir da mistura, sendo que a B-Lg continua adsorvendo mais fortemente que a A-La ($K_{A-La}=1,86 \text{ mL/g}$ e $K_{B-Lg}=2,51 \text{ mL/g}$). No caso de uma operação no LMS, isto indica que a B-Lg sairá no extrato, por ser o componente mais "lento", enquanto que a A-La sairá no refinado. Os valores das

constantes de adsorção foram diferentes daqueles obtidos com as proteínas puras. Isto era esperado, visto que agora temos duas substâncias sendo adsorvidas simultaneamente. Foi realizado um experimento para se obter as curvas de *breakthrough* a partir dessa mistura binária 1:1 e o resultado desse experimento pode ser visto na Fig.4.9. Isto possibilitou uma comparação entre as curvas de *breakthrough* experimentais com o modelo da coluna que considera equilíbrio dispersivo linear. Podemos notar um bom ajuste do modelo com os pontos experimentais. No entanto, não foi feita duplicata devido a limitações na quantidade de proteína disponível.

Para uma aplicação ainda mais realista, foram obtidas isotermas numa mistura binária 1:3. Esta relação mássica A-La:B-Lg é a mais próxima à do soro do queijo. Foi utilizada uma solução com 200 mM de sal para que fossem obtidas constantes de adsorção um pouco mais altas para a A-La e para a B-Lg. As isotermas obtidas para a mistura binária 1:3 podem ser vistas na Fig.4.7 e os pontos experimentais mostram uma boa relação linear entre q^* e C^* . Podemos observar que a A-La e a B-Lg apresentaram constantes de adsorção maiores e bem distintas comparadas com as obtidas com 250 mM de sal, conforme esperado, sendo que a B-Lg adsorveu mais fortemente que a A-La ($K_{A-La}=2,41$ mL/g e $K_{B-Lg}=8,14$ mL/g). O fator de separação neste caso de mistura binária 1:3 foi igual a 3,38 enquanto que na mistura binária 1:1 o fator de separação foi igual a 1,35. Isto indica que a separação no LMS seria mais fácil para a mistura 1:3 com 200 mM de NaCl do que com a mistura 1:1 usando 250 mM de sal.

6.2- SIMULAÇÕES DOS MODELOS

6.2.1- SIMULAÇÕES DOS MODELOS PARA UMA COLUNA

Para simular os modelos, foram construídas rotinas computacionais utilizando o ambiente MS Fortran PowerStation 4.0 e o uso de um PC Pentium II

400 MHz. As soluções numéricas foram obtidas com razoável rapidez aplicando o algoritmo Runge-Kutta-Fehlbergh. Os modelos foram primeiramente simulados para uma coluna com 10,0 cm de comprimento e 1,6 cm de diâmetro interno, resultando nas curvas de *breakthrough*. Também foram obtidos os perfis de concentrações internos ao longo da coluna e podemos observar, em todos os casos, uma boa estabilidade da solução numérica (Figs. 5.1 a 5.4). Para o modelo que considera adsorção competitiva, os perfis para ambas proteínas são obtidos simultaneamente. Nos outros casos, a rotina é executada individualmente para cada substância sendo adsorvida. Na Fig.5.6 é mostrada a influência típica da dispersão axial no formato da curva de *breakthrough* (diferentes Pe). Em todos os outros casos, o coeficiente de dispersão axial, quando aplicado, foi considerado igual a $5 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{min}$, sendo este um valor que representou bem o formato dos pontos das curvas de *breakthrough* experimentais. Entretanto, pode-se aplicar a técnica dos momentos (Blanch e Clark, 1997) para se determinar este parâmetro nas colunas do LMS a ser construído. Em geral, o coeficiente de dispersão axial é bastante pequeno e geralmente pode ser desprezado para baixas vazões.

6.2.2- SIMULAÇÕES DOS MODELOS PARA O LEITO MÓVEL SIMULADO (LMS)

Com as rotinas computacionais operando de forma estável para uma coluna, foram desenvolvidas as rotinas para um sistema LMS com oito colunas e duas colunas por zona, o qual deverá ser montado futuramente no Laboratório de Biosseparações do Departamento de Processos Biotecnológicos (DPB) da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp e que, por motivos alheios à nossa vontade, infelizmente, não foi possível de ser efetuado no transcorrer deste trabalho.

As rotinas computacionais para o LMS foram executadas com razoável rapidez (cerca de 10 minutos) sendo um pouco mais demorada para o caso que considera adsorção do tipo Langmuir competitiva.

Como resultado do LMS, obtêm-se os perfis de concentrações no extrato e no refinado ao longo do tempo no momento de troca das correntes. Tais perfis foram chamados de perfis dinâmicos, os quais poderão ser verificados experimentalmente, e também os perfis de concentrações internos em cada zona do LMS no estado estacionário, e cujos pontos a serem verificados experimentalmente são aqueles entre as colunas do sistema. A Fig. 6.1 mostra um exemplo dos pontos a serem verificados experimentalmente (símbolos). Os pontos na linha de alimentação são após a mistura da solução alimentada com a corrente vinda da zona III.

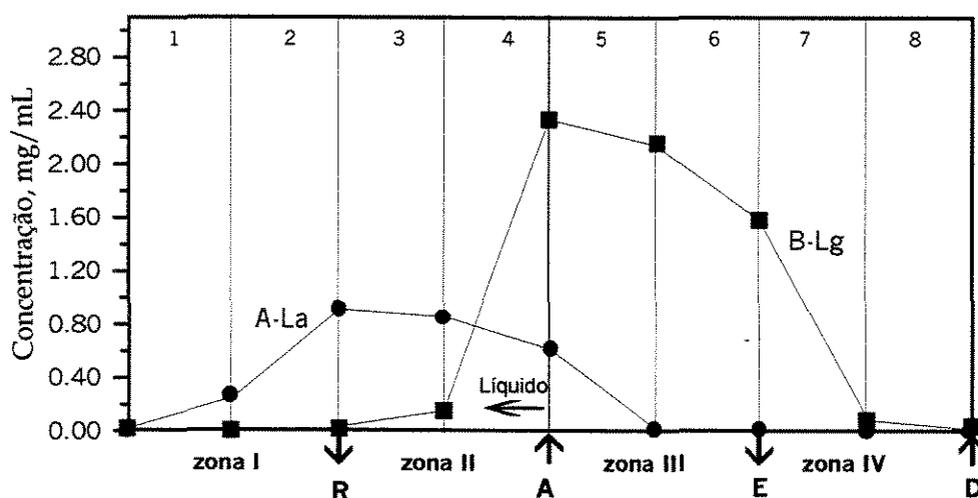


Figura 6.1: Exemplo de pontos a serem verificados experimentalmente para a A-La e para a B-Lg após atingido o estado estacionário no extrato e no refinado.

Dentre as variáveis operacionais mais importantes do LMS, estão as vazões nas diferentes zonas do sistema. Uma forma segura de escolha dessas vazões foi aplicando a metodologia do fatores de segurança, β_j , de Yun e colaboradores (1997) que foi desenvolvida para o caso de isotermas lineares. Como vimos, as isotermas obtidas para a A-La e B-Lg na mistura binária 1:1 com 250 mM de NaCl e na mistura binária 1:3 com 200 mM de NaCl mostraram relações lineares entre q^* e C^* para faixas de concentrações além das comumente encontradas no soro do

queijo e assim foi possível aplicar os fatores de segurança para se determinar as vazões de operação do LMS. No entanto, tal metodologia não fornece qual é o número ótimo de colunas. Como a constituição física do LMS a ser montado já estava definida como um sistema com oito colunas e duas colunas por zona, a partir das vazões fornecidas é possível fazer as simulações para diferentes tempos de troca e assim construir gráficos relacionando a pureza do extrato e do refinado, bem como as concentrações nessas correntes, com os diferentes tempos de troca, o que permite fazer uma escolha do tempo de troca que fornece o melhor compromisso entre pureza e concentrações do extrato e do refinado para uma dada combinação de vazões.

Foi feito um estudo mais detalhado da influência dos fatores de segurança β_j para o caso da mistura 1:3 de modo que fossem obtidas as melhores condições de operação do LMS. Para este caso, foram escolhidos arbitrariamente, dentro da região de segurança, cinco diferentes conjuntos de β_j e pôde-se avaliar os resultados com relação à pureza, concentrações e consumo do solvente no extrato e no refinado. A vazões de alimentação, de dessorvente, do extrato e do refinado obtidas para cada conjunto de β_j são mostradas na tabela 5.1.a . Na tabela 5.1.b são mostradas as concentrações obtidas durante a simulação para a B-Lg no extrato e para a A-la no refinado e também a pureza do extrato e do refinado e o consumo do solvente para cada conjunto de β_j . Podemos observar que para maximizarmos a vazão de alimentação os valores de β_2 e β_3 devem ser os menores possíveis e para minimizarmos o consumo de dessorvente os valores de β_1 e β_4 devem ser os menores possíveis. Ainda, diminuindo β_3 há um aumento na vazão de extrato e pode-se obter um extrato menos concentrado com um aumento no consumo do solvente. Quando β_2 é diminuído, aumenta-se a vazão de refinado e pode-se obter um refinado menos concentrado e há um aumento no consumo do solvente. Nas tabelas 6.1.a e b podemos verificar tais observações a partir dos resultados obtidos.

Tabela 6.1.a: Influência de β_3 na vazão, concentração da B-Lg e consumo do solvente no extrato.

β_3	Q_E (mL/min)	$C_{B-Lg,E}$ (mg/mL)	CSE (mL/mg)
1,25	3,060	1,59	1,13
1,15	3,193	1,48	1,18
1,10	3,260	1,26	1,31

Tabela 6.1.b: Influência de β_2 na vazão, concentração da A-La e consumo do solvente no refinado.

β_2	Q_R (mL/min)	$C_{A-La,R}$ (mg/mL)	CSR (mL/mg)
1,25	3,332	0,95	2,02
1,15	2,645	0,91	2,09
1,10	2,823	0,85	2,20

Devido a interdependência entre as vazões nas zonas do LMS, torna-se necessário estabelecer um compromisso entre vazões de entrada e saídas do LMS com as purezas e concentrações das correntes do extrato e do refinado. A tabela 6.2 ajudará na otimização de uma determinada operação do LMS, baseando-se no conjunto de equações (Eqs. 3.30.a, b, c e d) que fornecem as vazões de alimentação, extrato, refinado e dessorvente em função dos fatores de segurança β_j .

Tabela 6.2: Mudanças nos fatores β_j causados por um aumento em cada uma das quatro vazões do LMS; (\downarrow = diminui, \uparrow = aumenta).

Vazão	β_1	β_2	β_3	β_4
Alimentação		\downarrow	\downarrow	
Extrato			\downarrow	\uparrow
Refinado	\uparrow	\downarrow		
Dessorvente	\uparrow			\uparrow

Podemos observar nas Figs. 5.8.d, 5.9.d e 5.10.d que o componente crítico, no que se refere ao consumo de solvente, é a B-Lg que apresentou uma maior variação com o tempo de troca. Já para o consumo do solvente no refinado, este apresentou menores variações na faixa de tempo de troca estudada quando comparado com o consumo de solvente no extrato. Os valores de $\beta_j=1,05$ forneceram as melhores condições para a operação do LMS pois foram obtidos extrato e refinado com baixas diluições e vazões mais altas nessas correntes bem como na corrente de alimentação (o que implica em maior produção).

As Figs.5.8.a, 5.9.a e 5.10.a mostram os perfis dinâmicos do extrato (B-Lg) e do refinado (A-La) para os três primeiros conjuntos de β_j no tempo de troca igual a 7,50 minutos. Nota-se que o tempo para se atingir o estado estacionário (no caso LMS, o estado estacionário é cíclico) nas correntes do extrato e do refinado depende da combinação de vazões utilizadas, sendo que a corrente do extrato, que contém o componente que foi mais fortemente adsorvido (B-Lg), poderá levar mais tempo para se chegar ao estado estacionário, demorando cerca de 8 horas numa operação real quando $\beta_1=\beta_2=\beta_3=\beta_4=1,05$. Já a corrente do refinado atingiu o estado estacionário com cerca de 2 horas de operação para essa combinação de vazões.

As Figs.5.8.b, 5.9.b e 5.10.b mostram os perfis de concentrações internos da A-La e da B-Lg nas diferentes zonas do LMS após atingido o estado estacionário. Foram mostrados apenas os perfis internos para os três primeiros conjuntos de β_j no tempo de troca igual a 7,50 minutos. Pode-se observar como estes perfis são afetados pelas vazões nas diferentes zonas. Nota-se, a partir da alimentação, que a A-La, por adsorver mais fracamente que a B-Lg, tende a se distribuir entre as zonas I e II, enquanto que a B-Lg se distribui principalmente entre as zonas III e IV. A aparente oscilação para o perfis da B-Lg na zona III se deve ao próprio fenômeno da adsorção combinados com o típico modo cíclico de operação do LMS.

As Figs.5.8.c, 5.9.c, 5.10.c, 5.11 e 5.12 mostram, para os cinco conjuntos de β_j , como a pureza e as concentrações do extrato e do refinado são afetadas pelo tempo

de troca. É notável, para uma dada combinação de vazões, como o tempo de troca afeta as concentrações e, conseqüentemente, o grau de pureza das correntes do extrato e do refinado. Isto é causado pela mudança na vazão aparente do adsorvente, o qual é dependente do tempo de troca.

As simulações do LMS efetuadas aplicando os parâmetros de equilíbrio obtidos com as proteínas puras e cujos resultados são mostrados nas Figs. 5.13.a, b e c são apenas de caráter ilustrativo, pois numa operação real elas estarão presentes numa mistura e como vimos, com parâmetros de equilíbrio diferentes. Um outro caso para ser verificado experimentalmente é quando se considera que a taxa de adsorção é representada por força motriz linear (FML). Os resultados da simulação do LMS considerando este caso, bastante utilizado na literatura e que não considera a dispersão axial, são mostrados nas Figs. 5.15.a, b e c. Os resultados são para a mistura binária 1:1. Neste caso, a separação é mais difícil que no caso da mistura 1:3 visto que o fator de separação é menor. As vazões utilizadas não foram otimizadas, no entanto, as mesmas considerações com respeito à obtenção das vazões de operação do caso da mistura binária 1:3 podem ser aplicadas neste caso. Para aplicar a rotina do LMS-FML foi necessário conhecer o parâmetro de transferência de massa $k_f a_v$ para cada proteína (coeficiente global de transferência de massa). Isto foi conseguido aplicando o modelo para uma coluna ajustando a posição das curvas de *breakthrough* obtidas pelo modelo com as curvas de *breakthrough* experimentais, conforme procedimento de Maki e colaboradores (1987). Os valores de $k_f a_v$ para a A-La e para a B-Lg que melhor representaram os pontos experimentais foram então aplicados na rotina do LMS. Este procedimento não foi feito para a mistura 1:3 devido a limitação na quantidade de proteínas disponível.

Os parâmetros de equilíbrio para a mistura binária 1:1 também foram aplicados no modelo de equilíbrio dispersivo linear. Os resultados podem ser vistos nas Figs. 5.16.a,b e c. As concentrações obtidas no extrato e no refinado, utilizando a mesma combinação de vazões do caso LMS-FML mostram uma

grande diferença entre os valores obtidos nos dois casos. Essa diferença pode ser visualizada comparando as Figs. 5.15.a e 5.16.a que mostram os perfis dinâmicos do extrato e do refinado para um tempo de troca igual a 9,00 minutos. Se observarmos as curvas de *breakthrough* para a mistura 1:1, notaremos que a escolha dos parâmetros de transferência de massa k_{fa_v} para ambas as proteínas permitiram um ajuste melhor com as curvas de *breakthrough* experimentais quando comparado com a curva obtida pelo modelo que considera equilíbrio dispersivo linear. A diferença nos tempos de *breakthrough* em ambos os modelos, embora pequena, pode ter sido significativa na operação do LMS. Assim, é importante que as curvas de *breakthrough* sejam obtidas com bastante precisão, sugerindo-se experimentos no mínimo em duplicata.

Um outro caso ilustrativo é o modelo que considera adsorção competitiva. As isotermas competitivas, mostradas na Fig. 5.17, foram supostas com base nos pontos experimentais apenas com o intuito de se testar a rotina do LMS competitivo. Quando os parâmetros dessas isotermas são aplicados no modelo da coluna, as curvas de *breakthrough* obtidas através do modelo não representam as curvas de *breakthrough* obtidas experimentalmente para esta mistura 1:1 (pode se comparar as curvas de *breakthrough* da Fig.5.3.a com os pontos das curvas de *breakthrough* experimentais (Fig.4.9) embora estas tenham sido obtidas com uma coluna com 9,4 cm x 1,6 cm e aquelas do modelo foram obtidas para uma coluna 10 cm x 1,6 cm. Os tempos de *breakthrough* considerando as supostas isotermas competitivas são quase que duas vezes maiores que os obtidos experimentalmente. Assim, os resultados do LMS competitivo são apenas ilustrativos e são vistos nas Figs. 5.18.a,b,c e d. A Fig.5.18.a mostra o perfil dinâmico para o tempo de troca igual a 17,50 minutos, as Figs.5.18.b e c mostram os perfis internos nos tempos de troca iguais a 17,50 minutos e 16,50 minutos respectivamente. Observa-se na Fig.5.18.d que a partir do tempo de troca igual a 16,50 minutos é possível a separação com um grau de pureza acima de 99% para o refinado. O extrato sai com pureza de 100% em todos os tempos de troca utilizados, no entanto, a concentração da B-Lg no extrato cai rapidamente para os tempo de troca entre 16,00 e 18,00 minutos. A

partir do tempo de troca igual a 17,00 minutos, o consumo de solvente pelo extrato aumenta rapidamente, conforme pode ser visto na Fig. 5.19. Para o tempo de troca igual a 16,50 minutos, o consumo do solvente pelo extrato foi igual a 3,81 mL/mg, já para o tempo de troca igual a 17,50 minutos, o consumo do solvente pelo extrato foi igual a 10,23 mL/mg. Para este caso, a operação com tempo de troca igual a 16,50 minutos é a mais indicada se a rotina se aplicasse.

Capítulo Sete

CONCLUSÃO

E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

7.1- CONCLUSÕES

A rotina computacional desenvolvida para o sistema leito móvel simulado com oito colunas e duas colunas por zona permitiu a obtenção dos perfis dinâmicos de concentrações no extrato e no refinado e os perfis internos nas diferentes zonas do LMS para as proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina. Os resultados das simulações do LMS mostram que é possível separar e purificar as proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina quando estão presentes numa mistura binária utilizando pH 6,5 em tampão Bis-Tris-HCl na presença de concentrações de NaCl em torno de 200 a 250 mM utilizando resinas de troca aniônica Accell Plus QMA. Os resultados mostram que é possível obter extrato (B-Lg) e refinado (A-La) com pureza superiores a 99% no estado estacionário. As isotermas de adsorção a 25 °C forneceram os parâmetros de equilíbrio que foram aplicados nos modelos. O uso de 200 mM e 250 mM de NaCl permitiu que os parâmetros da adsorção se situassem numa faixa propícia à aplicação no LMS e ainda as isotermas mostraram uma relação linear entre a concentração média na fase sólida em equilíbrio com a concentração no líquido numa ampla faixa. O modelo que considera equilíbrio dispersivo linear aplicado para uma coluna, permitiu um bom ajuste com as curvas de *breakthrough* experimentais para a A-La e B-Lg presentes numa mistura binária 1:1. Ainda, com as curvas de *breakthrough* experimentais, podemos obter os parâmetros globais de transferência de massa ($k_{f(a_v)}$) para ambas proteínas aplicando o modelo da coluna que considera força motriz linear, sendo possível utilizá-los na correspondente rotina do LMS.

Foi possível escolher com segurança as vazões de operação do LMS através da aplicação dos fatores de segurança para cada zona. Além disso, a análise desses fatores permite otimizar uma operação, fazendo com que a vazão de alimentação seja maximizada para maximizar a taxa de produção e minimizar a entrada de dessorvente de modo que as correntes do extrato e do refinado saiam com baixa diluição em relação à concentração da alimentação. Podemos afirmar, para uma dada combinação de vazões, que o tempo de troca que fornece a melhor separação entre a A-La e a B-Lg não coincide necessariamente com o tempo de troca que fornece a concentração mais elevada nas correntes do extrato e, ou do refinado.

7.2-SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

As simulações do LMS indicaram que é possível separar as proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina com alto grau de pureza utilizando como adsorvente a resina de troca aniônica Accell-Plus QMA. Sugere-se a montagem e operação de um sistema LMS com a mesma configuração utilizada nas simulações (oito colunas com duas colunas por zona) e assim, obter resultados experimentais para as misturas binárias 1:3 e 1:1 nas mesmas condições de pH, concentração de sal, temperatura e combinação de vazões utilizadas nas simulações para que tais resultados (experimentais e simulados) possam ser comparados. Tal procedimento permitirá verificar a validade ou os desvios dos modelos aplicados no sistema LMS virtual.

Sugere-se também testar outras configurações do LMS e também verificar a recuperação dos produtos.

Sugere-se fazer curvas de *breakthrough* para a mistura 1:3 com 200 mM de sal em pH 6,5 e assim testar o modelo da coluna nesta condição.

Sugere-se experimentos utilizando o próprio soro do leite (filtrado e desengordurado) para verificar o comportamento do LMS quando uma mistura de

composição mais complexa é utilizada na alimentação e assim, aprofundar os estudos neste campo. Para tal, sugere-se que o soro do leite seja aplicado previamente numa coluna de troca de ânions em pH 6,5 até a saturação da coluna e em seguida promoveria a eluição das proteínas que ficaram adsorvidas obtendo-se frações que seriam utilizadas no LMS.

Sugere-se também um estudo para avaliar a separação da B-Lg A e B em LMS.

Referências Bibliográficas

- ASENJO, J. A . (1990), "The rational design of large scale protein separation processes", em *Separations for biotechnology 2*, Elsevier (D.L. Pyle editor), Barbing , 519-528.
- ATKINSON, B. E SAINTER, P.J. (1982), "Development of Downstream Processing", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **32**, 100.
- BARKER, P.E. E ABUSABAH, E.K.E.,(1985) "The separation of Synthetic Mixtures of Glucose and Fructose and also Inverted Sucrose Feedstocks Using Countercurrent Chromatographic Techniques", *Chromatographia*, **20**, 1, 9-12.
- BLANCH, H.B. E CLARK, D. S. (1997), *Biochemical Engineering*, Cap. 6: Product Recovery, Marcel Dekker Inc., New York.
- BROUGHTON, D.B. (1961), Patent US2, 985, 589; 23.05.
- BUTLER, J.B. E OCKRENT, C. (1930), "Studies in electrocapillarity, part III: the surface tension solutions containing two surface active solutes", *J. Phys. Chem.*, **34**, 2841-2859.
- CARRÉRE, H. (1993), "Extraction des protéines du lactoserum par chromatographie échange d'ions en lit fluidisé", Tese de Doutorado, Institut National Polytechnique de Toulouse, França.
- CHING, C.B. E RUTHVEN, D.M.,(1984), "Analysis of the performance of a simulated counter-current chromatography system for fructose-glucose separation", *Canadian Journal of Chem. Eng.*, **62**, 398-403.
- COIMBRA, J. S. R. E SANTANA, C. C. (1996), Relatório referente ao processo Fapesp No. 95/4742-1 - Faculdade de Engenharia Química - Unicamp.
- FARFÁN, J. A.,(1994), *Química de proteínas aplicada à ciência e a tecnologia dos alimentos*, Editora da Unicamp, 2ª Edição, Campinas (SP)
- FOX, P.F. (1989), "The milk protein system", em *Developments in Dairy Chemistry - 1*. (Ed. P.F. Fox), Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London e New York, 1-53.

- FURLAN, L.T. (1994), "Applicazione della tecnologia del letto mobile simulato alle separazioni per adsorbimento", Tesi di Dottorato in Ingegneria Chimica, Politecnico di Milano, Itália.
- GANETSOS, G. E BARKER, P.E. (1993)., *Preparative and production scale chromatography* , Marcel Dekker, Inc., New York.,
- GERALD, C.F. E WHEATLEY, P.O. (1994), *Applied numerical analysis* (5ª Ed.), Addison-Wesley Publishing Co.
- GOTTSCHLICH, N. E KASCHE, V. (1997), "Purification of monoclonal antibodies by simulated moving-bed chromatography, *Journal of Chromatography A*, 765, 201-206.
- GOTTSCHLICH, N., WEIDGEN, S. E KASCHE, V. (1996), "Continuous biospecific affinity purification of enzymes by simulated moving-bed chromatography: theoretical description and experimental results", *Journal of Chromatography A*, 719, 267-274.
- HAMBRAEUS, L. (1982), "Nutritional aspects of milk proteins", em *Developments in Dairy Chemistry - 1.*, Ed. P.F. Fox, Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London e New York, 289-313.
- HASHIMOTO, K., ADACHI, S., E SHIRAI, Y. (1993-a), "Operation and design of simulated moving-bed adsorbers", *Preparative and Production Scale Chromatography* , Marcel Dekker, Inc., New York. 273-300.
- HASHIMOTO, K. , SHIRAI, Y. E ADACHI, S. (1993-b), "A simulated moving-bed adsorber for the separation of tricomponents", *J. Chem. Engng. Japan*, 26 (1), 52-56.
- HASHIMOTO, K., ADACHI, S. E SHIRAI, Y. (1988), "Continuous desalting of proteins with a simulated moving-bed adsorber", *Agric. Biol. Chem.*, 52 (9), 2161-2167.
- HASHIMOTO, K., ADACHI, S., NOUJIMA, H. E UEDA, Y. (1983), "A new process combining adsorption and enzyme reaction for producing higher fructose syrup, *Biotechnol. Bioengng.*, 25, 2371-2393.
- HASHIMOTO, K., YAMADA, M.. E SHIRAI, Y. (1987), "Continuous separation of glucose-salts mixture with nonlinear and linear adsorption isotherms by using a simulated moving-bed adsorber, *J. of Chem. Engineering of Japan*, 20 (4), 405-410.

- HASHIMOTO, K., ADACHI, S., NOUJIMA, H. E MARUYAMA, H. (1983), "Models for the separation of glucose/fructose mixture using a simulated moving-bed adsorber", *Journal of Chem. Engineering of Japan*, **16** (5), 400-406.
- HIDAJAT, K., CHING, C.B. E RUTHVEN, D.M. (1986), "Simulated counter-current adsorption processes: a theoretical analysis of the effect of subdividing the adsorbent bed, *Chem. Eng. Science*, **41**(11), 2953-2956.
- HUANG, S.Y., LIN, C. K., CHANG, W. H. E LEE, W. S. (1986), Enzyme purification and concentration by simulated moving bed chromatography: an experimental study, *Chemical Engineering Communications*, **45**, 291-309.
- JAMES, E.A. (1994), "The application of multicomponent adsorption theory to an ion exchange chromatography system for recovery of whey proteins, Ph.D, Thesis, Dept. of Chem. Eng., University of Queensland, Austrália.
- KACZMAREK, J. (1980), "Whey protein separation and processing", *Proc. Whey Products Conf. Whey Products Inst. and US Dept. of Agric., Chigago, IL.*
- LANGMUIR, I. (1916), "The constitution and fundamental properties of solids and liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, **38**, 2267-2295.
- LIAO, A .W., RASSI, Z. E., MASTER, D. M. E HORVATH, C.S., (1987) "High performance displacement chromatography of proteins: separation of b-lactoglobulin A and B. *Chromatographia*, **24**, 881-885.
- MAKI, H., FUKUDA, H. E MORIKAWA, H. (1987), "The separation of glutathione and glutamic acid using a simulated moving-bed adsorber system, *J. Fermentation Technol.*, **65**, 61.
- MICHAELS, A ., S.,(1990), "Frontiers of bioseparations technology: unsolved problems and novel process concepts", em *Separations for biotechnology 2*, Elsevier (D.L. Pyle editor), Barbing , 3-8.
- RUTHVEN, D. E CHING, C.B. (1989), "Counter-current and simulated counter-current adsorption separation processes", *Chem. Engng Science*, **44** (5), 1011-1038.
- RUTHVEN, D.M. (1984), *Principles of adsorption and adsorption processes* - John Wiley & Sons, New York.

- STORTI, G., MASI, M., PALUDELLO, R., MORBIDELLI, M. E CARRÀ, S. (1988), "Adsorption separation processes: countercurrent and simulated countercurrent operations". *Computers Chem. Eng.*, **12**, 475-482.
- SWAISGOOD, H. E. (1982), em *Developments in Dairy Chemistry - 1*. (Ed. P.F. Fox), Elsevier Applied Science Publishers Ltd, London e New York, 44-49.
- TESSIER, M., VIOLLET B. E EGLY, J.M., (1992), "La précipitation des protéines". *Le Technoscope de Biofutur*, **115**.
- YAMAMOTO, S., NAKANISHI, K. E MATSUNO, R. (1988), *Ion-exchange chromatography of proteins*, Chromatographic Science Series - Marcel Dekker Inc. , New York, **43**.
- YUN, T., ZHONG, G., E GUIOCHON G. (1997), "Experimental study of the influence of the flow rates in SMB chromatography", *AIChE Journal*, **43**, no.11, 2970-2983.
- ZHONG G., E GUIOCHON, G. (1996), "Analytical solution for the linear ideal model of simulated moving bed chromatography", *Chem. Eng. Science*, **51**, 4307.

Apêndice

Para o LMS devemos ter $Q_A + Q_D = Q_E + Q_R$ e, ainda, para ter sentido físico, todas as vazões devem ser positivas. Este fato faz com que os termos entre parênteses nas Eqs.(3.30), sejam positivos e como $\alpha=K_2/K_1$ devemos ter as seguintes condições:

$$\beta_2\beta_3 < \alpha \quad (A1a)$$

$$\frac{\beta_3}{\beta_4} < \alpha \quad (A1b)$$

$$\frac{\beta_2}{\beta_1} < \alpha \quad (A1c)$$

$$\frac{1}{\beta_1\beta_4} < \alpha \quad (A1d)$$

Aplicando a definição de β_j e respectivas condições nas quatro zonas do LMS, as seguintes condições devem ser satisfeitas:

$$\beta_4 > \frac{1}{\alpha}, \quad \beta_4 > 1 \quad (A2a)$$

$$\beta_3 > 1, \quad \beta_3 < \alpha \quad (A2b)$$

$$\beta_2 < \alpha, \quad \beta_2 > 1 \quad (A2c)$$

$$\beta_1 > 1, \quad \beta_1 > \frac{1}{\alpha} \quad (A2d)$$

Assim, β_2 e β_3 devem estar entre 1 e α e β_1 e β_4 devem ser maiores que 1 para que a Eq.(1d) seja satisfeita. Assim, os dois conjuntos de condições podem ser simplificados e combinados para:

$$\beta_j > 1, \quad \forall j \quad (\text{A3a})$$

$$\frac{\beta_3}{\beta_4} < \alpha \quad (\text{A3b})$$

$$\beta_2\beta_3 < \alpha \quad (\text{A3c})$$

$$\frac{\beta_2}{\beta_1} < \alpha \quad (\text{A3d})$$

Como β_2 e β_3 são sempre menores que α , as Eqs.(A3b) e (A3d) são sempre verificadas devido à Eq.(A3a). Sendo assim, o conjunto de equações é reduzido para:

$$\beta_j > 1, \quad \forall j \quad (\text{A4a})$$

$$\beta_2\beta_3 < \alpha \quad (\text{A4b})$$

As Eqs.(A4a) e (A4b) mostram as condições dos possíveis valores dos fatores de segurança β_j para que o LMS opere de forma estável.