

**Universidade Estadual de Campinas**  
**Faculdade de Engenharia Química**  
**Área de Concentração Engenharia de Processos**

**UNICAMP**  
**BIBLIOTECA CENTRAL**  
**SEÇÃO CIRCULANTE**

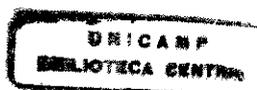
**Estudo da Adsorção de Inulinases em Colunas com Resinas de Troca Iônica : Parâmetros Experimentais e Modelagem.**

**Autor**  
**Fábio Ribeiro Campos da Silva**

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

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

**Campinas – SP**  
**2000**



011910000

UNIDADE	30
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	Si 38e
V. Ex.	
TOMBO BC/	42808
PROC.	16-278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	20/10/00
N.º CPD	

CM-00147204-4

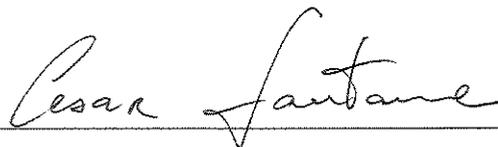
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

Si38e Silva, Fábio Ribeiro Campos da  
Estudo da adsorção de inulinases em coluna com resinas de troca iônica : parâmetros experimentais e modelagem / Fábio Ribeiro Campos da Silva.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

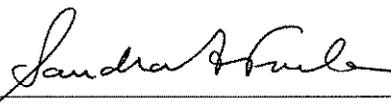
1. Adsorção. 2. Troca iônica. 3. Otimização matemática. 4. Modelos matemáticos. I. Santana, César Costapinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese de Doutorado defendida por Fábio Ribeiro Campos da Silva e aprovada em 28 de abril de 2000 pela banca examinadora constituída pelos Doutores.



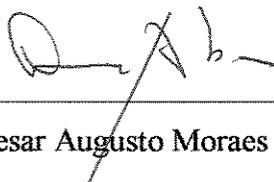
---

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana - Orientador



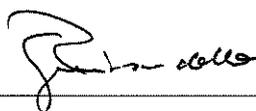
---

Prof. Dra. Sandra Aparecida Furlan (titular)



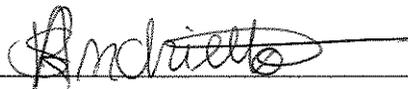
---

Prof. Dr. Cesar Augusto Moraes de Abreu (titular)



---

Prof. Dr. Reginaldo Guirardello(titular)



---

Prof. Dr. Sílvio Roberto Andrietta (titular)

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Fábio Ribeiro Campos da Silva e aprovada pela Comissão julgadora em 28 de abril de 2000.

A handwritten signature in black ink, reading "Cesar Costapinto Santana", written in a cursive style. The signature is positioned above a horizontal line.

---

Profº Dr. Cesar Costapinto Santana

Orientador

Aos meus pais e irmãos pelo grande incentivo.

A Solange pelo carinho.

# AGRADECIMENTOS

À Deus,

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UNICAMP.

Ao Professor Dr. Cesar Costapinto Santana pela orientação e todo apoio na realização deste trabalho.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À Coordenação de Pós-graduação da FEQ, pelo amparo e funcionalidade nas diversas atividades de apoio aos pos-graduandos.

À Novo Nordisk (Araucária-PR), pela doação das amostras de Fructozyme®.

Ao pessoal da minha segunda casa, Eduardo Ósorio, Marcelo Moreira, Luis Fernando, André Fedatto, Adilson Chinatto, Marcelo Fernandes, Marco Antônio e a querida Dona Maria.

Aos incontestáveis colegas de trabalho do laboratório de biosseparações pela presteza e grande colaboração e que ao longo desta grande jornada estiveram presentes: Mariana Araújo, Joel Cruz, Sebastião Avelino, Eduardo Arruda, José Antonio, Sérgio Luiz Lucena, Marisa Beppu, Adriano Azzoni, Cesar Accounci, Sandra Vançan, Roberta Ventura, Denise, Rosana Emi, Ana Carolina, Elcimar Nóbrega, Líbia Conrado, Luciana Cristina e Vinicius Veredas.

Aos pais, irmãos e cunhados pelo apoio e incentivo constante.

Ao Frede de Oliveira Carvalho e Helenice pelo apoio e incentivo durante o curso.

Aos amigos e funcionários da FEQ que contribuíram para o desenvolvimento dos trabalhos.

# SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Nomeclatura	iv
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	xvii
Capítulo 1	1
1. - Introdução	1
1.1 - Objetivos	3
Capítulo 2	5
2. - Revisão da Literatura	5
2.1. - A Inulina	5
2.2. - Inulinases	6
2.3. - Concentração e Purificação de Inulinases	8
2.3.1. - Revisão de Trabalhos Seleccionados	9
2.4. - Desenvolvimento de Estratégias para Purificação de Proteínas	18
2.4.1. - Estratégia para Purificação de Proteínas	19
2.4.2. - Ordenamento de Técnicas Aplicadas para Purificação	20
2.5. - Processo de Adsorção.	21
2.5.1. - Adsorção de Proteínas em Trocadores de Íons.	22
2.5.2. - Adsorventes Trocadores de Íons.	23
2.6. - Processos Cromatográficos de Adsorção.	26
2.6.1. - Operações Cromatográficas por Análise Frontal em Leito Expandido.	27
2.7. - Isoterma de Adsorção e Capacidade do Adsorvente.	30
Capítulo 3	35
3. - Modelagem Matemática dos Processos de Adsorção	35
3.1 - Modelo Simplificado para Cinética de Adsorção em Tanque Agitado.	36
3.2 - Modelo Completo para Cinética de Adsorção em Tanque Agitado	37
3.3 - Modelos Simplificados para Adsorção em Leito Fixo.	42

3.4 - Modelo Completo para Adsorção em Leito Fixo.	44
Capítulo 4	49
4. - Materiais e Métodos.	49
4.1. - Reagentes.	49
4.2. - Adsorventes Utilizados no Processo de Concentração de Inulinases.	49
4.3. - Métodos de Análises.	50
4.3.1. - Análise de Proteínas.	50
4.3.2. - Análise de Atividade Enzimática.	51
4.3.2.1. - Reação de Hidrólise Enzimática.	52
4.3.2.2. - Método do Açúcar Redutor (Método do DNS).	52
4.3.3. - Diálise.	52
4.3.4. - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE.	52
4.3.5. - Reação de Hidrólise Enzimática das Amostras Purificadas.	53
4.3.5.1. - Análise Cromatográfica dos Açúcares.	53
4.3.6. - Determinação da Distribuição do Tamanho de Poros e Área dos Adsorventes.	54
4.3.7. - Determinação da Distribuição do Tamanho de Partículas.	54
4.4. - Experimentos de Adsorção em Tanques Agitados.	55
4.4.1. - Determinação das Curvas Cinéticas de Adsorção das Inulinases em Experimentos em Tanques Agitados.	56
4.4.2. - Determinação de Isotermas de Equilíbrio de Adsorção.	57
4.5. - Caracterização das Porosidades do Leito de Adsorção e das Partículas dos Adsorventes.	58
4.6. - Experimentos de Adsorção em Leito Fixo.	62
4.7. - Adsorção em Leito Expandido.	64
Capítulo 5	67
5. - Resultados e Discussões: Adsorção e Modelagem Matemática.	67
5.1. - Caracterização dos Adsorventes.	68
5.1.1. - Propriedades Físicas: Área Superficial e Distribuição de Tamanhos de Poros.	68
5.1.2. - Caracterização das Porosidades do Adsorvente e dos Leitos por Análise da Distribuição do Tempo de Residência.	70

5.1.3. - Estudo do Fator de Fluidização (Expansão) no Adsorvente Accell Plus QMA.	73
5.2. - Experimentos de Adsorção em Tanques Agitados.	74
5.2.1 - Estudo do Efeito do pH na Adsorção de Inulinases.	74
5.2.2. - Determinação das Curvas Cinéticas de Adsorção para Inulinases.	76
5.2.3. - Determinação das Isotermas de Equilíbrio de Adsorção.	80
5.3.- Modelagem Matemática da Adsorção em Tanques Agitados.	83
5.3.1. - Resultados do Ajuste do Modelo Simplificado:Obtenção das Constantes de Adsorção e Dessorção.	83
5.3.2 - Solução Numérica do Modelo Completo.	88
5.3.2.1. - Ajuste do Modelo Completo aos Dados cinéticos: Obtenção dos Parâmetros de Transferência de Massa.	91
5.4. - Operações de Adsorção em Colunas Cromatográficas.	95
5.4.1. - Etapas de Adsorção, Lavagem e Eluição em Colunas Cromatográficas em Leito Fixo.	95
5.4.1.1. - Experimentos de Adsorção no Sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B.	96
5.4.1.2. - Experimentos de Adsorção no Sistema Inulinases-Accell Plus QMA.	102
5.4.2. - Etapas de Adsorção, Lavagem e Eluição em Colunas Cromatográficas em Leito Expandido.	104
5.5. - Modelagem Matemática Aplicada na Adsorção em Colunas Cromatográficas.	108
5.5.1. - Ajuste das Curvas de Saturação da Coluna de Leito Fixo ao Modelo de Adsorção Simplificado.	108
5.5.2. - Ajuste das Curvas de Saturação do Modelo de Completo de Adsorção de Leito Fixo .	110
5.5.2.1. - Ajuste do Modelo de Completo de Adsorção de Leito Fixo no Sistema Inulinases-CM-Sepharose.	114
5.5.2.2. - Ajuste do Modelo de Completo de Adsorção de Leito Fixo no Sistema Inulinases-Accell Plus QMA.	117
5.5.2.3. - Ajuste do Modelo de Completo de Adsorção de Leito Expandido no Sistema Inulinases-Accell Plus QMA.	119

Capítulo 6	123
6. - Resultados e Discussão: Separação das Inulinases.	123
6.1. - Introdução.	123
6.2. - Processo de Polimento por Cromatografia em Coluna Analítica do Tipo Mono Q.	124
6.2.1. - Resultado da Análise Cromatográfica por Adsorção em Coluna Mono Q.	124
6.2.2. - Resultados da Análise dos Açúcares Produzidos por Hidrólise das Frações Coletadas da Cromatografia na Coluna Mono Q.	126
6.3. - Processo de Polimento por Cromatografia de Permeação em Gel Sephacryl S 100 HR.	130
6.3.1. - Resultados da Análise dos Açúcares Produzidos pela Hidrólise das Frações Coletadas da Cromatografia por Permeação em Gel.	131
6.4. - Determinação da Massa Molecular das Enzimas Purificadas.	133
Capítulo 7	137
7.0 - Conclusões.	137
7.1 - Sugestões para Trabalhos Futuros.	138
Capítulo 8	139
8. - Referências Bibliográficas.	139
Anexo A	151
Anexo B	153
B.1 - Caracterização do Leito de Adsorvente e Partícula por Aplicação da Análise dos Momentos com Pulso Traçador.	153
B.2 - Modelo de Dispersão	155
Anexo C	161

## RESUMO

SILVA DA, F. R. C. Estudo da Adsorção de Inulinas em colunas com Resinas de Troca Iônica : Parâmetros Experimentais e Modelagem. Tese(Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 1999. Palavras chaves : 1- Inulinas. 2- Adsorção. 3- Modelagem. 4 - Cromatografia de troca iônica. 5- Leito expandido.

As inulinas são enzimas com grande potencial comercial, pois atuam hidrolisando a inulina e gerando produtos importantes para a indústria de alimentos, tais como frutose e oligômeros de frutose. A separação e purificação dessas enzimas, com eficiência e custos compatíveis, é de grande importância para o desenvolvimento de técnicas e protocolos de adsorção que possam otimizar e que permitam a ampliação de escala da operação. Este trabalho tem como objetivo dar uma contribuição à utilização de técnicas experimentais e de modelagem matemática no estudo da adsorção de enzimas do tipo inulinas em resinas trocadoras de íons. No presente trabalho são determinados os parâmetros característicos de equilíbrio e da cinética de adsorção, realizando-se experimentos em tanques agitados contendo adsorventes CM- Sepharose CL-6B e Accel Plus QMA, permitindo convalidar os modelos de difusão do sorbato na superfície e nos poros do sólido com os dados experimentais. Realizou-se experimentos de saturação dos adsorventes em coluna de leito expandido com a resina Accel Plus QMA e também operações em leito fixo sobre os dois adsorventes, baseando-se no método de cromatografia por análise frontal, com uma mistura comercial de inulinas Fructozyme<sup>®</sup>. Utilizando-se um modelo matemático completo, no qual são consideradas a dispersão axial e a resistência à transferência de massa, foram obtidos os parâmetros através da solução numérica das equações do balanço de massa com uso do método de colocação ortogonal associado ao método de otimização não-linear multivariável para obtenção dos coeficientes otimizados de transferência de massa e dispersão axial. Os valores médios dos coeficientes foram  $0,633 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  e  $0,10 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  em inulinas-

CM-Sepharose CL-6B e  $0,747 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  e  $0,258 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  em inulinases-Accell Plus QMA. As enzimas foram identificadas com massa molecular de 80 kDa (exo-inulinase) e 63 kDa (endo-inulinase) após filtração em gel Sephacryl S 100 HR.

## ABSTRACT

SILVA DA, F. R. C. Research on Inulinase Adsorption in Ion-Exchange Resin Columns: Experimental Parameters and Modeling. Thesis(Doctor) - School of Chemical Engineering. State University of Campinas, 1999. Key Words : 1- Inulinases. 2- Adsorption. 3- Modeling. 4 - Ion-Exchange Chromatography. 5- Expanded Bed.

The inulinases are enzymes with great commercial potencial, as they hydrolise inulin producing important products for the food industry such as fructose and fructose oligomeres. The separation and purification of these enzymes, with efficiency and compatible costs, is of great importance to the development of adsorption techniques and protocols which may optimize and amplify the operation. The objective of this work is to contribute to the improvement of the experimental techniques and mathematical modeling in the adsorption study of the inulinase enzymes on ion-exchange resins. In this work the characteristic equilibrium and adsorption kinetics parameters are determined via experiments in stirred tanks containing CM-Sepharose CL-6B and Accel Plus QMA adsorbents, allowing a good agreement between models of diffusion of sorbate on the surface and in the pores of the solid with the experimental data. Saturation experiments were made in expanded bed column with Accell Plus QMA resin and fixed bed with the two adsorbents, based on frontal analysis chromatography with a commercial mixture of inulinases-Frucozyme™. Using a complete mathematical model, where axial dispersion and resistance to mass transfer are considered, the parameters were obtained by numerical solution of the mass balance equation using the orthogonal collocation method associated with the non-linear multivariable optimization method for the obtention of the optimized mass transfer and axial dispersion coefficients. The medium values of coefficients were  $0,633 \cdot 10^{-7} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  and  $0,10 \cdot 10^{-8} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  in inulinases-CM-Sepharose CL-6B  $0,747 \cdot 10^{-7} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  and  $0,258 \cdot 10^{-8} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  in inulinases-Accell Plus QMA. The enzymes were characterised with molecular weight in 80 kDa (exo-inulinase) and 63 kDa (endo-inulinase) after gel filtration in Sephacryl S 100 HR.

## NOMECLATURA

a	Coeficiente usado na função de Bessel modificada	(-)
b	Coeficiente usado na função de Bessel modificada	(-)
A	Matriz de colocação ortogonal	(-)
B	Matriz de colocação ortogonal	(-)
$Bi_m$	Número de Biot de massa, $(\frac{k_f R}{\beta D_{ef}})$	(-)
C	Concentração de proteína na saída do leito de partículas	$(mg \cdot cm^{-3})$
$C_b$	Concentração de proteína na fase líquida	$(mg \cdot cm^{-3})$
$C_i$	Concentração de proteína nos poros da partícula	$(mg \cdot cm^{-3})$
$C_o$	Concentração de proteína na fase líquida inicial	$(mg \cdot cm^{-3})$
$C^*$	Concentração de equilíbrio	$(mg \cdot cm^{-3})$
$C(t)$	Concentração do traçador na saída da coluna	$(mg \cdot cm^{-3})$
$\bar{C}_i(t)$	Concentração de proteína nos poros da partícula	$(mg \cdot cm^{-3})$
$D_{ef}$	Coeficiente de difusividade efetiva	$(m^2 \cdot min^{-1})$
$D_{ax}$	Coeficiente de dispersão axial	$(m^2 \cdot min^{-1})$
$K_A$	Constante de adsorção	$(cm^3 \cdot s \cdot mg^{-1})$
$k_d$	Constante de dissociação	$(mg \cdot cm^{-3})$
$k_f$	Coeficiente convectivo externo de transferência de massa	$(m \cdot min^{-1})$
$k_i$	Coeficiente convectivo externo de transferência de massa	$(m \cdot min^{-1})$
$k_1$	Constante cinética de adsorção	$(cm^3 \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1})$
$k_{-1}$	Constante cinética de dessorção	$(min^{-1})$

L	Comprimento da leito de adsorventes	(cm)
q*	Concentração de equilíbrio	(UA.mL <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )
q <sub>i</sub>	Concentração de equilíbrio da fase sólida	(UA.mL <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )
q <sub>max</sub>	Capacidade máxima de adsorção na fase sólida	(UA.mL <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )
Pe	Número de Peclet, $(\frac{k_1 Z^2}{D_{ax} R})$	(-)
N	Número de pontos de colocação	(-)
V	Volume da fase líquida	(cm <sup>3</sup> )
V <sub>i</sub>	Sinal coletado pelo medidor UV-Vísivel	(mv)
v	Volume da fase sólida	(cm <sup>3</sup> )
R	Raio da partícula	(m)
r	Variável espacial	(m)
t	Variável temporal	(min)
t <sub>o</sub>	Tempo de permanência no “loop” de injeção	(s)
t <sub>R</sub>	Tempo de residência	(s)
u	Variável adimensional	(-)
u <sub>o</sub>	Velocidade superficial	(cm s <sup>-1</sup> )
x	Variável espacial adimensional	(-)
y	Variável espacial adimensional	(-)
z	Comprimento	(m)
Z	Variável adimensional de comprimento	(-)

## Simbolos

UA	Unidade de atividade enzimática	
β	Porosidade da partícula	(-)

$\varepsilon$	Porosidade do leito	(-)
$\theta$	Concentração adimensional, $(C_b/C_o)$	(-)
$\lambda$	Grupo adimensional, $(3k_1Z^2(1-\varepsilon/\varepsilon)/D_{ax}R)$	(-)
$\mu_1$	Momento absoluto de 1ª ordem	(s)
$\mu_{1L}$	Momento de 1ª ordem do leito de adsorvente	(s)
$\mu_2$	Momento absoluto de 1ª ordem	(s <sup>2</sup> )
$\sigma_R^2$	Variância reduzida	
$\sigma_L^2$	Momento de 2ª ordem central para o leito de adsorvente	(s <sup>2</sup> )
$\sigma_{L,C}^2$	Momento de 2ª ordem central para a coluna com leito de adsorvente	(s <sup>2</sup> )
$\sigma_{L,B}^2$	Momento de 2ª ordem central para coluna sem o leito de adsorvente	(s <sup>2</sup> )
$\rho_p$	Densidade da partícula	(mg.cm <sup>-3</sup> )
$\xi$	Concentração adimensional, $(C/C_o)$	(-)
$\tau$	Variável adimensional de tempo, $(tD_{ef}/R^2)$	(-)
$\psi$	Concentração adimensional, $(\bar{C}_i/C_o)$	(-)
$\frac{\partial}{\partial \tau}$	Primeira derivada parcial	
$\frac{\partial^2}{\partial \tau^2}$	Segunda derivada parcial	

## Indices

i	Poros na fase líquida
j	Pontos de colocação (j=1 ...N)
k	Refere-se pontos de colocação (k=1 ...N+1)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b>	Estrutura esquemática do polímero de inulina.	<b>05</b>
<b>Figura 2.2</b>	Esquema de purificação de inulinasas, segundo ETTABILI e BARATTI (1987).	<b>10</b>
<b>Figura 2.3</b>	Implementação da cromatografia por adsorção em leite expandido no procedimento convencional para recuperação e purificação de bioprodutos (THÖMMES, 1997).	<b>28</b>
<b>Figura 3.1</b>	Mecanismos envolvidos nos processos de adsorção, DECHOW (1987).	<b>35</b>
<b>Figura 4.1</b>	Equipamento giratório utilizado em processo de adsorção em batelada.	<b>56</b>
<b>Figura 4.2</b>	Modo de operação : (a) coluna sem leite, e (b) coluna empacotada com adsorvente.	<b>59</b>
<b>Figura 4.3</b>	Esquema utilizado na determinação das porosidade do leite e das partículas (1) fase móvel (solução tampão); (2) sistema de injeção (válvula e “loop” de 200 $\mu$ L); (3) coluna de leite fixo; (4) cromatógrafo composto por bombas (4 a, b) e detetor UV-visível (4c); (5) microcomputador com placa aquisitora de sinal e (6) recipiente para descarte de efluente.	<b>60</b>
<b>Figura 4.4</b>	Esquema experimental para operação de adsorção por cromatografia frontal: (1) e (2) recipientes;(3) conjunto de bombas(3a), (3b) e (3c) detetor de luz visível-ultravioleta; (4) coluna cromatográfica;(5) computador com placa aquisitora de sinais e (6)coletor de frações.	<b>63</b>

<b>Figura 4.5</b>	Etapas envolvidas em operações de adsorção em leito expandido (A) adsorvente sedimentado; (B) equilíbrio(leito expandido); (C) aplicação da amostra; (D) lavagem (leito expandido);(E) eluição (leito fixo); (F) regeneração (leito fixo).	<b>64</b>
<b>Figura 5.1</b>	Fluxograma de informações dos processos de adsorção em tanque agitados e colunas de adsorção.	<b>67</b>
<b>Figura 5.2</b>	Curva de distribuição de tamanhos de partículas do adsorvente CM-Sepharose CL-6B.	<b>69</b>
<b>Figura 5.3</b>	Curva de distribuição de tamanhos de partículas do adsorvente Accell Plus QMA.	<b>69</b>
<b>Figura 5.4</b>	Curvas de distribuição do tempo de residência(DTR), usando traçador acetona no leito de $h=2,5$ cm com adsorvente Accell Plus QMA e fluxo volumétrico de $0,35 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .	<b>70</b>
<b>Figura 5.5</b>	Dados experimentais e ajuste linear à equação do modelo aplicada a distribuição do tempo de residência(DTR), utilizando-se os traçadores acetona e dextrana 'blue' no leito de CM-Sepharose CL-6B.	<b>71</b>
<b>Figura 5.6</b>	Dados experimentais e ajuste linear à equação do modelo aplicada a distribuição do tempo de residência(DTR), utilizando-se os traçadores acetona e dextrana 'blue' no leito de Accell Plus QMA.	<b>72</b>
<b>Figura 5.7</b>	Curva de expansão do leito para o adsorvente Accell Plus QMA.	<b>73</b>
<b>Figura 5.8</b>	Capacidade de adsorção do adsorvente CM-Sepharose CL-6B.	<b>75</b>
<b>Figura 5.9</b>	Capacidade de adsorção do adsorvente Accell Plus QMA.	<b>76</b>
<b>Figura 5.10</b>	Curvas cinéticas de adsorção no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B.	<b>77</b>
<b>Figura 5.11</b>	Curva cinética de adsorção no sistema Inulinases-Accell Plus QMA em atividade enzimática volumétrica, $C_0 = 102 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$ .	<b>78</b>

<b>Figura 5.12</b>	Curva cinética de adsorção no sistema Inulinases-Accell Plus QMA em atividade enzimática volumétrica $C_o = 46 \text{ UA. mL}^{-1}$ .	<b>79</b>
<b>Figura 5.13</b>	Curva cinética de adsorção no sistema Inulinases-Accell Plus QMA em atividade enzimática volumétrica $C_o = 25,50 \text{ UA. mL}^{-1}$ .	<b>79</b>
<b>Figura 5.14</b>	Isoterma de equilíbrio de adsorção em atividade enzimática no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B, à temperatura de $25^\circ\text{C}$ e 25 rpm.	<b>80</b>
<b>Figura 5.15</b>	Isoterma de equilíbrio de adsorção em atividade enzimática no sistema Inulinases-Accell Plus QMA, à temperatura de $25^\circ\text{C}$ e 25 rpm.	<b>81</b>
<b>Figura 5.16</b>	Isoterma de equilíbrio de adsorção em proteína total no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B, à temperatura de $25^\circ\text{C}$ e 25 rpm.	<b>82</b>
<b>Figura 5.17</b>	Isoterma de equilíbrio de adsorção em proteína total no sistema Inulinases-Accell Plus QMA, à temperatura de $25^\circ\text{C}$ e 25 rpm.	<b>83</b>
<b>Figura 5.18</b>	Curvas cinéticas de adsorção e ajuste do modelo simplificado no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B.	<b>85</b>
<b>Figura 5.19</b>	Curva cinética de adsorção e ajuste do modelo simplificado no sistema Inulinases-Accell Plus QMA, $C_o = 102 \text{ UA.mL}^{-1}$ .	<b>86</b>
<b>Figura 5.20</b>	Curva cinética de adsorção e ajuste do modelo simplificado no sistema Inulinases-Accell Plus QMA, $C_o = 46 \text{ UA.mL}^{-1}$ .	<b>86</b>
<b>Figura 5.21</b>	Curva cinética de adsorção e ajuste do modelo simplificado do sistema no Inulinases-Accell Plus QMA, $C_o = 25,50 \text{ UA. mL}^{-1}$ .	<b>87</b>
<b>Figura 5.22</b>	Curva cinética de adsorção experimental e ajuste do modelo completo sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B para $C_o = 301 \text{ UA.mL}^{-1}$ .	<b>91</b>

- Figura 5.23** Curva cinética de adsorção experimental e ajuste do modelo completo no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B para  $C_0 = 150 \text{ UA.mL}^{-1}$ . 92
- Figura 5.24** Curva cinética de adsorção experimental e ajuste do modelo completo no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B para  $C_0 = 108 \text{ UA.mL}^{-1}$ . 92
- Figura 5.25** Curva cinética de adsorção experimental e ajuste do modelo completo no sistema Inulinases-Accell Plus QMA para  $C_0 = 102 \text{ UA.mL}^{-1}$ . 93
- Figura 5.26** Curva cinética de adsorção experimental e ajuste do modelo completo sistema Inulinases-Accell Plus QMA para  $C_0 = 46 \text{ UA.mL}^{-1}$ . 93
- Figura 5.27** Curva cinética de adsorção experimental e ajuste do modelo completo no sistema Inulinases-Accell Plus QMA para  $C_0 = 25,50 \text{ UA.mL}^{-1}$ . 94
- Figura 5.28** - Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema inulinases-CM-Sepharose CL-6B. Ensaio realizado na coluna HR 5/10 com leito de 8 cm, fluxo volumétrico de  $0,35 \text{ mL.min}^{-1}$ , solução enzimática de  $11,5 \text{ UA.mL}^{-1}$  e  $1,45 \text{ mg.ml}^{-1}$  de proteína total. Eluição por gradiente linear (0-1M NaCl), duração de 100 min. 97
- Figura 5.29** - Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema inulinases-CM-Sepharose CL-6B. Ensaios realizados na coluna HR 5/10 com leito de 8 cm, fluxo volumétrico de  $0,35 \text{ mL.min}^{-1}$ , solução enzimática de  $11,5 \text{ UA.mL}^{-1}$  e  $1,45 \text{ mg.ml}^{-1}$  de proteína total. Eluição por gradiente linear (0-1M NaCl), duração de 35 min. 98

- Figura 5.30** Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição de inulinas em CM-Sepharose CL-6B, Condições operacionais na coluna HR 5/10: concentração enzimática  $15,6 \text{ UA.mL}^{-1}$ , fluxo volumétrico  $0,25 \text{ mL.min}^{-1}$ . Eluição em gradiente linear (0-1 M NaCl) por 35 min. 99
- Figura 5.31** Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinas-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais na coluna C 10/20: concentração enzimática  $25,0 \text{ UA.mL}^{-1}$  e  $1,96 \text{ mg.mL}^{-1}$  proteína total, altura do leito de 3 cm e fluxo volumétrico de  $0,65 \text{ mL.min}^{-1}$ . Eluição em gradiente linear (0-1M NaCl) por duração de 35 min. 100
- Figura 5.32** Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinas-CM-Sepharose CL-6B em coluna C 10/20, concentração enzimática  $27,6 \text{ UA.mL}^{-1}$ , fluxo volumétrico  $0,75 \text{ mL.min}^{-1}$  e eluição em gradiente linear (0-1 M NaCl) em 35 min. 101
- Figura 5.33** Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinas-CM-Sepharose CL-6B em coluna C 10/20, concentração inicial  $35,9 \text{ UA.mL}^{-1}$ , fluxo volumétrico  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$  e eluição em gradiente linear (0-1 M NaCl) em 35 min. 101
- Figura 5.34** Cromatograma de adsorção de Inulinas-Accell Plus QMA em leito fixo, coluna HR 5/2 com 100 mg de adsorvente e leito de 3 cm,  $C_0 = 78,9 \text{ UA mL}^{-1}$  e proteína total  $9,95 \text{ mg.mL}^{-1}$  sob fluxo de  $0,45 \text{ mL min}^{-1}$ . 102
- Figura 5.35** Cromatograma de adsorção de Inulinas-Accell Plus QMA em leito fixo, coluna HR 5/2 com 100 mg de adsorvente e leito de 3 cm,  $C_0 = 68,6 \text{ UA mL}^{-1}$  e proteína total de  $8,65 \text{ mg.mL}^{-1}$  sob fluxo volumétrico de  $0,55 \text{ mL min}^{-1}$ . 103

- Figura 5.36** Cromatograma de adsorção de Inulinases-Accell Plus QMA em leito fixo, coluna HR 5/2 com 100 mg de adsorvente e leito de 3 cm,  $C_o = 105 \text{ UA mL}^{-1}$  e proteína total  $13,2 \text{ mg.mL}^{-1}$  sob fluxo volumétrico de  $0,65 \text{ mL min}^{-1}$ . 104
- Figura 5.37** Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinases-Accell Plus QMA em solução Tris-HCl(30 mM, pH 7,5). Ensaio de adsorção realizado na coluna C 10/20 nas condições operacionais: massa do adsorvente 700 mg, altura do leito expandido  $H_{ex} = 4,4 \text{ cm}$ , fluxo volumétrico de  $0,65 \text{ mL.min}^{-1}$ ,  $C_o = 98,8 \text{ UA.mL}^{-1}$  e proteína total de  $12,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Eluição em gradiente linear (0-1 M NaCl) em 35 min. 105
- Figura 5.38** Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinases-Accell Plus QMA em solução Tris-HCl(30 mM, pH 7,5). Ensaio de adsorção realizado na coluna C 10/20 nas condições operacionais: massa do adsorvente 700 mg, altura do leito expandido  $H_{ex} = 4,7 \text{ cm}$ , fluxo volumétrico de  $0,75 \text{ mL.min}^{-1}$ ,  $C_o = 93,75 \text{ UA.mL}^{-1}$  e proteína total de  $11,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Eluição em gradiente linear (0-1 M NaCl) em 35 min. 106
- Figura 5.39** Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinases-Accell Plus QMA em solução Tris-HCl(30 mM, pH 7,5). Ensaio de adsorção realizado na coluna C 10/20 nas condições operacionais: massa do adsorvente 700 mg, altura do leito expandido  $H_{ex} = 5,7 \text{ cm}$ , fluxo volumétrico de  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ ,  $C_o = 89 \text{ UA.mL}^{-1}$  e proteína total de  $11,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Eluição em gradiente linear (0-1 M NaCl) em 35 min. 107
- Figura 5.40** Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo simplificado no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais coluna HR 5/10: solução enzimática de  $11,5 \text{ UA.mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $0,35 \text{ mL.min}^{-1}$ . 108

- Figura 5.41** Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo simplificado no sistema Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais coluna HR 5/10: concentração de 35,9 UA.mL<sup>-1</sup> e fluxo volumétrico de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. 109
- Figura 5.42** Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo simplificado no sistema Inulinasas-Accell Plus QMA. Condições operacionais coluna HR 5/2: concentração de 105 UA mL, fluxo volumétrico de 0,65 mL.min<sup>-1</sup>. 109
- Figura 5.43** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais coluna HR 5/10: leito de 8 cm e 300 mg, C<sub>o</sub> = 15,6 UA mL<sup>-1</sup> e fluxo volumétrico de 0,25 mL min<sup>-1</sup>. 114
- Figura 5.44** Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais coluna HR 5/10: leito de 8 cm e 300 mg, C<sub>o</sub> = 11,5 UA.mL<sup>-1</sup> e fluxo volumétrico de 0,35 mL.min<sup>-1</sup>. 115
- Figura 5.45** Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais coluna C 10/20: leito de 3 cm e 3,2 g, C<sub>o</sub> = 25 UA.mL<sup>-1</sup> e fluxo volumétrico de 0,65 mL.min<sup>-1</sup>. 115
- Figura 5.46** Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais coluna C 10/20: leito de 3 cm e 3,2 g, C<sub>o</sub> = 27,6 UA.mL<sup>-1</sup> e fluxo volumétrico de 0,75 mL.min<sup>-1</sup>. 116
- Figura 5.47** Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais na coluna C 10/20: leito de 3 cm e 3,2 g, C<sub>o</sub> = 35,9 UA.mL<sup>-1</sup> e fluxo volumétrico de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. 117

- Figura 5.48** Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no Inulinases-Accell Plus QMA. Condições operacionais coluna HR 5/2: leito de 3 cm e 100 mg,  $C_o = 78,9 \text{ UA.mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $0,45 \text{ mL.min}^{-1}$ . 118
- Figura 5.49** Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no Inulinases-Accell Plus QMA. Condições operacionais coluna HR 5/2: leito de 3 cm e 100 mg,  $C_o = 105 \text{ UA.mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $0,65 \text{ mL.min}^{-1}$ . 119
- Figura 5.50** Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinases-Accell Plus QMA. Condições operacionais coluna C 10/20: leito de partículas 700 mg, altura do leito expandido  $H_{ex} = 4,4 \text{ cm}$ ,  $C_o = 98,8 \text{ UA.mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $0,65 \text{ mL.min}^{-1}$ . 120
- Figura 5.51** Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinases-Accell Plus QMA. Condições operacionais coluna C 10/20: leito de partículas 700 mg, altura do leito expandido  $H_{ex} = 4,7 \text{ cm}$ ,  $C_o = 93,8 \text{ UA.mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $0,75 \text{ mL.min}^{-1}$ . 121
- Figura 5.52** Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinases-Accell Plus QMA. Condições operacionais coluna C 10/20: leito de partículas 700 mg, altura do leito expandido  $H_{ex} = 5,7 \text{ cm}$ ,  $C_o = 117,7 \text{ UA.mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ . 122
- Figura 6.1** Cromatograma de adsorção de inulinases em coluna mono Q: injeção do pool eluído dos processos de adsorção com CM-Sepharose CL-6B e Accell Plus QMA. 125
- Figura 6.2** Cromatograma da mistura FOS - S - F (32,04-39,76-28,20 %), componentes frutossil nistose(GF4), nistose(GF3), kestose(GF2), sacarose (S), glicose(G) e frutose(S). 126

<b>Figura 6.3</b>	Cromatograma dos produtos da hidrólise enzimática da inulina(4%), a partir da fração M1 coletada da cromatografia analítica em coluna Mono Q.	127
<b>Figura 6.4</b>	Cromatograma dos produtos da hidrólise da inulina a partir da fração M2, coletada da cromatografia analítica em coluna Mono Q.	128
<b>Figura 6.5</b>	Cromatograma dos produtos da hidrólise da inulina a partir da fração M3, coletada da cromatografia analítica em coluna Mono Q.	129
<b>Figura 6.6</b>	Cromatograma da exclusão em gel Sephacryl S-100 HR, amostra injetada proveniente da eluição do sistema inulinases-Accell Plus QMA.	131
<b>Figura 6.7</b>	Cromatograma do produto formado pela hidrólise da inulina a partir da ação da(s) enzima(s) presente na fração F22, coletada na cromatografia por permeação em gel Sephacryl S 100 HR.	132
<b>Figura 6.8</b>	Cromatograma do produto da hidrólise da inulina a partir da fração F32, coletada da cromatografia por permeação em gel Sephacryl S 100 HR	133
<b>Figura 6.9</b>	Curva de calibração de proteínas padrões e ajuste linear.	134
<b>Figura 6.10</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS 12,5%. Faixas A e B proteínas padrões: 1A - Ferritina (220 kDa); 2B - Fosforilase B(94 kDa); 3A e 3B - Albumina de soro bovino (67kDa); 4A - Catalase (60 kDa); 5B - Ovoalbumina (43 kDa); 6A - Lactato desidrogenase (36 kDa); 7B - Anidrase carbônica (30 kDa), 8B - Inibidor de tripsina de soja (20,10 kDa); 9A - Ferritina (18,5 kDa) e 10B - $\alpha$ -Lactoalbumina (14,4 kDa). Faixa C e H, amostra injetada. Faixa D e E amostra eluída F32. Faixa F e G, amostra da fração eluída F22. Tempo de migração 58 min e voltagem 200 V.	135

<b>Figura 6.11</b>	Curva de calibração de proteínas e frações de interesse F22 e F32.	136
<b>Figura A.1</b>	Curva de calibração para proteína total.	151
<b>Figura A.2</b>	Curva de calibração para atividade enzimática.	152
<b>Figura B.1</b>	Sinal típico da curva C.	154
<b>Figura C.1</b>	Curva de dessorção de N <sub>2</sub> em Accell Plus QMA.	161

# CAPÍTULO 1

## 1 - Introdução

Os avanços gerados pela indústria biotecnológica vêm contribuindo para o desenvolvimento de novas formulações de produtos alimentícios, farmacêuticos, entre outros, dotados de alto valor agregado.

O processo de produção desses compostos freqüentemente envolvem conversões de substratos por meio de enzimas. Enzimas são catalisadores orgânicos, de natureza protéica, produzidos por células vivas.

As enzimas são formadas por uma seqüência de aminoácidos que constituem a estrutura primária. O arranjo regular e recorrente das cadeias polipeptídicas ao longo de uma dimensão espacial representa a estrutura secundária. O enovelamento das cadeias de polipeptídeos é mantido por forças que incluem as ligações de hidrogênio, dissulfeto e hidrofóbicas, que conferem uma estrutura compacta firmemente enovelada às proteínas globulares e representa a estrutura terciária. Por meio de interações de forças as cadeias polipeptídicas são associadas formando múltiplas unidades (subunidades enzimáticas), fornecendo a estrutura quaternária e global do sistema protéico. Sendo uma proteína, a enzima perde suas propriedades catalíticas se submetidas a ações bastante drásticas por agentes como calor, ácidos ou bases fortes, solventes orgânicos ou outro material que desnatura a proteína (LEHNINGER, 1993).

A maioria dos processos biotecnológicos atuais para produção de enzimas é realizado por processos fermentativos fúngicos ou bacterianos, desenvolvidos em fase líquida ou em meio semi-sólido. Posteriormente à etapa de produção e obtenção do extrato enzimático, torna-se necessária a remoção de impurezas do produto final.

Devido à natureza poliiônica das proteínas, resultante dos grupos ionizáveis dos aminoácidos que as originaram, algumas técnicas de separação e purificação utilizam

princípios que se baseiam em interações com esses grupos dotados de cargas elétricas. Esse processo pode ser representado pela técnica de cromatografia por troca iônica, que é bastante explorada em nível de escala de laboratório e também nos processos de escala industrial (SCOPES, 1987; JANSON e RYDÉN, 1998).

Tradicionalmente, esses processos de purificação contém múltiplas operações unitárias, o que afeta a sua eficiência global, tornando-os indesejáveis do ponto de vista econômico, pois aumenta os custos operacionais, o tempo de processamento e causa baixo rendimento do produto (PHARMACIA, 1998).

A maioria dos processos de purificação utiliza a adsorção por cromatografia convencional em leito fixo ou empacotado, e necessita de operações preliminares de clarificação, antes que o material seja submetido à adsorção.

Por outro lado, a cromatografia de adsorção em leitos expandidos ou fluidizados, apresenta-se como alternativa viável para processos de concentração e purificação em grande escala. Como amplamente discutido por THÖMMES (1997), a adsorção em leitos expandidos substitui um conjunto de etapas tradicionais e preliminares de separação sólido-líquido, concentração e também adsorção em leito fixo, levando à diminuição significativa do número de etapas de um processo de purificação, podendo atingir uma maior eficiência em relação ao processo tradicional, reduzindo consideravelmente os custos operacionais.

A enzima inulinase é uma hidrolase que atua sobre a inulina, um polímero natural de frutose com uma unidade terminal de glicose. O interesse na separação e purificação dessa enzima é decorrente do grande potencial de aplicação dos produtos gerados pela hidrólise da inulina, tais como unidades de frutose e/ou oligômeros de frutose. A demanda por xaropes ricos em frutose vem crescendo em nível mundial nas últimas décadas (CHAPLIN e BUCKE, 1990). Os oligômeros de frutose são utilizados na formulação de adoçantes que apresentam baixo teor calórico, não são cariogênicos e ainda estimulam o crescimento de bifidobactérias na flora intestinal (HIDAKA e HIRAYAMA, 1991). Por essa razão, esses novos açúcares são apresentados atualmente como possíveis substitutos do açúcar tradicional de sacarose.

## 1.1 - Objetivos

O presente trabalho se insere numa contribuição à utilização de técnicas experimentais e de modelagem matemática para o estudo de adsorção de enzimas do tipo inulinases em resinas trocadoras de íons. A partir de uma mistura comercial de inulinases, denominada "Fructozyme 230", foram estabelecidas metodologias combinadas de experimentos laboratoriais e do emprego de modelos matemáticos em adsorção com os seguintes objetivos principais:

- Caracterização física dos adsorventes quanto ao tamanho e distribuição dos poros, porosidade do leito e das partículas e tamanho de partícula.
- Obtenção de isotermas de adsorção e cinética de adsorção com dois tipos de adsorventes, sendo um deles de natureza aniônica e outro de natureza catiônica.
- Utilização de cromatografia frontal para a obtenção de curvas de ruptura ("breakthrough"), de modo a otimizar a utilização dos adsorventes na recuperação da enzima inulinase.
- Determinação dos parâmetros otimizados dos modelos adsorptivos em sistemas sólido-líquido, visando assim o escalonamento do processo de adsorção.
- Comparação entre os desempenhos de leitos fixos e leitos expandidos no processo de adsorção das enzimas.
- Realização de ciclos de adsorção, lavagem e eluição com gradiente linear, de modo a avaliar o fator de concentração das enzimas no processo global de recuperação das mesmas.
- Realização de um esforço laboratorial para efetuar a separação de dois tipos de inulinases (endo e exo-inulinases), para a geração de açúcares a partir do substrato inulina.

## CAPÍTULO 2

### 2. - Revisão da Literatura

#### 2.1. - A Inulina

A inulina é um polímero de origem vegetal, considerado uma grande fonte de carboidrato. Está presente em várias plantas das famílias da *Compositae* e *Gramineae*, como a alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.), dália (*Dahlia pinnata* C.), chicória (*Cichorium intybus* L.), dente-de-leão (*Taraxacum officinale* W.), bardana (*Arctium*) e outras, as quais acumulam grandes quantidades de inulina segundo VANDAMME e DERYCKE (1983). A inulina e outros análogos, apresentam-se como um polímero de frutose. As unidades de frutose são unidas por ligação  $\beta$ -2-1 na estrutura e numa extremidade finalizada por uma unidade de sacarose. A estrutura do polímero de inulina é representada na Figura 2.1, sendo composta em média de 30 unidades primárias de frutose, a chicória apresenta uma média 18 unidades.

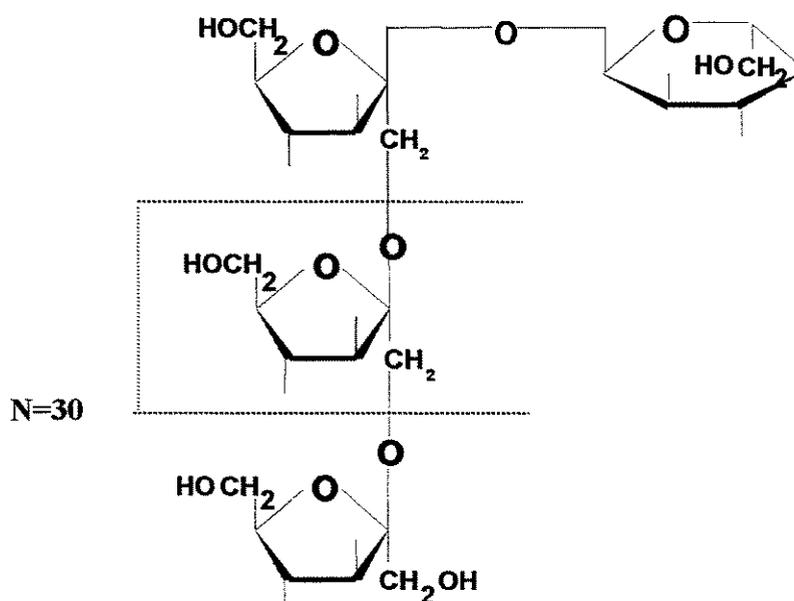


Figura 2.1 – Estrutura esquemática do polímero de inulina.

O tamanho da cadeia polimérica é função da origem da planta e do período de colheita. Como exemplo, a alcachofra apresenta uma maior cadeia no período mais quente e esta decresce no período mais ameno.

RUTHERFORD e DEACON (1972), GROOTWASSINK e FLEMING (1980) observaram que no período de estocagem dos tubérculos de chicória, alcachofra e dália, ocorria um decréscimo no grau de polimerização. A hipótese levantada pelos autores e depois confirmada, foi a presença de enzimas as quais provocavam a degradação da inulina por hidrólise.

Devido à variação no comprimento da cadeia, a massa molecular varia entre 3500 até 5500 g. mol<sup>-1</sup>. A inulina é insolúvel em água fria e pouco sóluvel (cerca de 5%) em água a 55 °C. Pode ser precipitada numa mistura de etanol-água e é hidrolizável em meio ácido numa faixa de temperaturas relativamente alta (70 - 80°C). Em condições reacionais e favoráveis em presença de enzimas com atividade hidrolíticas, a inulina pode ser convertida em frutose e/ou em outros oligossacarídeos (VANDAMME e DERYCKE, 1983).

## 2.2 - Inulinases

As inulinases são  $\beta$ -frutosidases, que atuam reduzindo a molécula da inulina pela quebra da ligação  $\beta$ -2,1, onde se produz unidades de frutose e glicose. Essas enzimas são designadas como 2,1- $\beta$ -D-frutana-frutanohidrolase (EC 3.2.1.7), diferenciando das invertases, que hidrolisam a sacarose em glicose e frutose, sendo classificada como  $\beta$ -D-fruto-furanosideo-fruto-hidrolase (EC 3.2.1.26).

As enzimas com atividade  $\beta$ -frutosidase, geralmente podem ser encontradas em plantas e também em algumas linhagens fúngicas e bacterianas. Na literatura, encontram-se grandes variedades de espécies de microrganismos que produzem enzimas intracelulares ou extracelulares e que em condições favoráveis de crescimento produzem atividade inulinolíticas. A Tabela 2.1, apresenta algumas fontes de microrganismos que produzem inulinases.

Tabela 2.1- Microrganismos produtores de inulinases.

Microrganismo	Fontes de C e N <sub>2</sub>	Tempo de incubação (h)	Condições do ensaio	Atividade Enzimática (UA.mL <sup>-1</sup> )	Referências
<i>Fungos</i>					
<i>Aspergillus niger</i> 12	Maltose Extrato de Milho	108	5% Inulina Ph 4,35 30 min, 55 °C	20,1	DERYCKE e VANDAMME (1984)
<i>Aspergillus Niger</i>	Sacarose (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	168	0,25% Inulina pH 5,0 30 min, 40 °C	48,4	OHTA et al. (1983)
<i>Aspergillus phoenicius</i>	Inulina NaNH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Extrato de levedura	192	5% Inulina pH 4,50 30 min, 55 °C	36	PETERS et al. (1983)
<i>Aspergillus niger</i> A42	Alcachofra de Jerusalém (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Extrato de levedura	120	5% Inulina pH 4,50 30 min, 50 °C	50	ONGEN-BAYSAL et al. (1994)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Inulina NaNO <sub>3</sub>	216	0,2% Inulina pH 5,6 30 min, 37 °C	0,008	GUPTA et al. (1990)
<i>Penicillium rugulosum</i>	Inulina NH <sub>4</sub> Cl Peptona	40	1% Inulina pH 6,0 30 min, 50 °C	54	BARTHOMEF et al. (1991)
<i>Penicillium Purpurogenum</i>	Inulina Maltose NH <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	72	0,5% Inulina pH 5,0 5min, 37 °C	4,45	ONODERA e SHIOMI (1988)
<i>Leveduras</i>					
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Chicória Peptona	36	1% Inulina pH 5,4 30 min, 55 °C	1,44	GUPTA et al. (1989)
<i>Kluyveromyces cicesporium</i>	Alcachofra de Jerusalém (NH <sub>4</sub> )PO <sub>4</sub>	168	5% Inulina pH 4,7 15 min, 50 °C	96	MANZONI e CAVAZZONI (1991)
<i>Candida kefyf</i>	Inulina Ureia Extrato de levedura	60	2% Inulina pH 4,5 30 min, 40 °C	30	NEGORO e KITO (1973)

Nos tubérculos de plantas como chicória, alcachofra de Jerusalém e dente-de-leão, as inulinases isoladas por JEFFORD e EDELMAN (1964), FLOOD et al.(1967) e RUTHERFORD e DEACON (1972), não apresentaram nenhuma atividade do tipo invertase.

Já as inulinases produzidas por alguns microrganismos, tais como, *Candida kefir* (NEGORO e KITO, 1973,a,b), *Penicillium* sp 1 (NAKAMURA et al. 1978), *Kluyveromyces fragillis* (BYUN e NAHM, 1977, WORKMAN e DAY, 1983), *Debaromyces cantarelli* e *D. phaffi* (BELUCHE et al., 1980), apresentaram também atividade do tipo invertase.

As inulinases, produzidas por uma cultura de *Arthrobacter ureafaciens*, foram isoladas por UCHIYAMA et al. (1973) e hidrolisaram a inulina em di-D-frutofuranose-1,2',3'-dianidrido e pequenas quantidades de outras unidades de oligofrutose, que foram também identificadas por TANAKA et al. (1972). Essas enzimas que foram designada inulinase II, atuaram no substrato inulina especificamente quebrando a ligação  $\beta$ -2-1 produzindo unidades de frutose livres. Outro tipo de inulinase, designada III, foi produzida numa cultura de *Aspergillus niger* por NAKAMURA et al. (1978). Obtiveram da hidrólise do substrato inulina, os produtos inulotriose, inulotetrose e inulopentose, não sendo identificada nenhuma frutose livre em solução.

Através destes trabalhos, classificaram-se as enzimas em duas formas em função da ação enzimática sobre o substrato de inulina:

- |                                       |        |                 |
|---------------------------------------|--------|-----------------|
| - Produtoras de oligômeros de frutose | —————> | Endo-inulinases |
| - Produtoras de frutose livre         | —————> | Exo-inulinases. |

### 2.3 – Concentração e Purificação de Inulinases

Como foi relatado anteriormente, as inulinases são obtidas tanto por processos fermentativos do tipo submerso quanto semi-sólido, sendo que essas enzimas podem ser sintetizadas por várias espécies de microrganismos. Na produção de inulinases, inúmeras variáveis são controladas e otimizadas nos processos fermentativos, visando a maximizar

a produção da enzima. Na etapa de separação por extração, a enzima recuperada sempre apresenta-se numa forma bem diluída no extrato que contém outras enzimas e substâncias indesejáveis (corantes), desta forma, objeto de concentração e purificação em etapas posteriores. Inúmeras metodologias foram desenvolvidas visando a recuperação, concentração e purificação de inulinas. Tendo como escopo principal, a caracterização das enzimas em tamanho e mecanismo de ação sob o substrato como também obtê-las purificadas com alto grau de pureza.

Foram realizadas várias pesquisas bibliográficas, conforme relato a seguir, as quais mostraram que uma grande maioria dessas publicações utilizaram trocadores iônicos para concentração em processos cromatográficos a leito fixo. As pesquisas também mostraram, existência de poucas publicações que utilizam processos cromatográficos por adsorção em leitos expandidos.

### 2.3.1- Revisão de Trabalhos Selecionados

A purificação de inulinase intracelular de um extrato produzido pela cultura de *Candida kefyr* obtida por NEGORO e KITO (1973), realizou-se em duas etapas cromatográficas. A estratégia adotada na purificação foi por centrifugação e precipitação em ácido tânico (pH 4,5) como etapas de pré-purificação seguida por diálise, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex e cromatografia em SE-Sephadex. Neste processo os autores obtiveram um fator de purificação de cerca de 55 vezes relativo ao extrato inicial.

ETTALIBI e BARATTI (1987) isolaram nove enzimas, sendo uma invertase (Inv), cinco exo-inulinas (Exo 1, 2, 3, 4 e 5) e três endo-inulinas (Endo 1, 2 e 3), presentes no produto comercial de inulinas de *Aspergillus ficcum*. A estratégia de purificação envolveu precipitação por sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, filtração em gel e, na etapa final, utilizou-se cromatografia de troca iônica do tipo analítica com coluna mono Q. A Figura 2.2 ilustra os processos envolvidos na purificação das enzimas. A caracterização das massas moleculares nas diversas frações de enzimas

purificadas, foram realizadas por filtração em gel Ultrogel ACA 34 e também por eletroforese SDS-PAGE. Os valores obtidos pelas duas técnicas apresentaram concordância, a invertase (84 kDa), as exo-inulinases (74, 75 e 76 kDa) e as endo-inulinases (64 kDa). A ação das enzimas purificadas foi observada através da incubação com os respectivos substratos de sacarose e inulina. Os produtos da conversão enzimática foram comparados com padrões de frutose e oligômeros de frutose por análise cromatográfica em camada delgada.

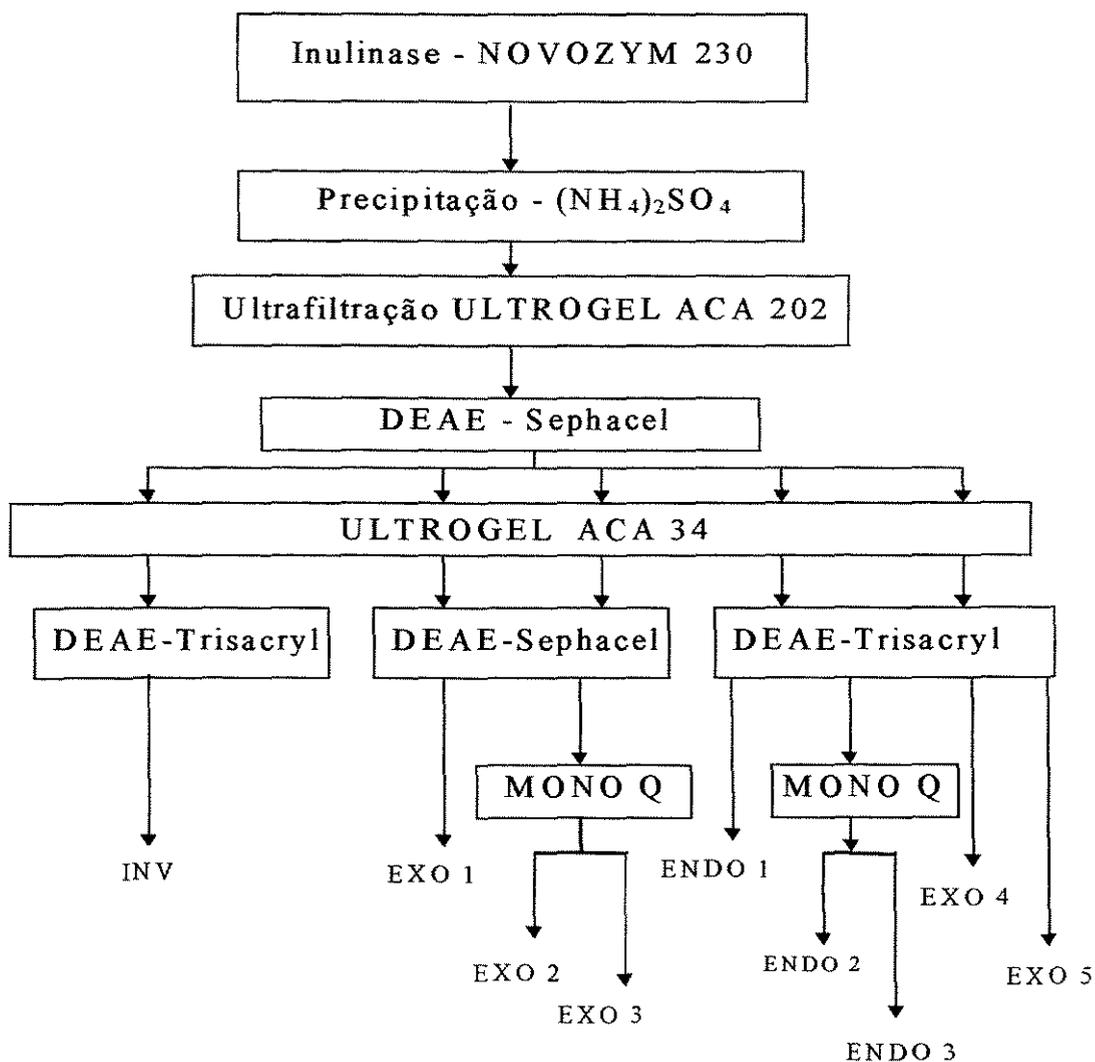


Figura 2.2 – Esquema de purificação de inulinases, segundo Ettabili e Baratti(1987).

Seguindo as várias etapas utilizadas nos processos de purificação das enzimas, ETTABILI e BARATTI (1987) conseguiram fatores de purificação máximos de 3,5 vezes para invertase, 64,5 para endo-inulinase e 30,5 vezes para exo-inulinases.

UHM et al. (1987) purificaram três formas de inulinase produzidas por uma cultura isolada de *Aspergillus niger*, utilizando as etapas de ultrafiltração, cromatografia em DEAE-Trisacryl e filtração em gel Sephadex G-150. As enzimas identificadas no processo como I, II e III, apresentaram pontos isoelétricos de 4,5; 4,9; 5,2, quantificados por focalização isoelétrica analítica. A caracterização foi possível pela análise por cromatografia líquida de alta eficiência na coluna PAK-300. As enzimas foram estimadas com massas moleculares de 302, 310 e 324 kDa e na eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS (SDS-PAGE) as subunidades foram estimadas aproximadamente em torno de 85 kDa. A hidrólise enzimática sob o substrato de inulina comprovou a formação de unidades de frutose e glicose, identificadas através de cromatografia em camada delgada, caracterizando a enzima como sendo exo-inulinase. Obtiveram no final do processo o fator de purificação de 787 vezes em relação ao extrato inicial.

MUKHERJEE e SENGUPTA (1988) estudaram a purificação da inulinase produzida por uma cultura de *Paneolus papillonaceus*. A estratégia de purificação envolveu ultrafiltração, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex, diálise, filtração em Biogel P-300, diálise e filtração em Biogel P-200. Determinaram que a enzima apresentava ponto de máxima atividade enzimática no pH 6,0 e na temperatura de 60 °C em tampão fosfato 0,1 M e pH 6,5. A massa molecular da enzima foi determinada por filtração em gel Biogel P-300, calculando-se um valor aproximado de 116 kDa e por eletroforese em gel de poliacrilamida, duas enzimas foram identificadas com massa molecular de 60 kDa e 56kDa. Obtiveram ao final do processo de purificação um fator de 5,7 vezes relativo ao extrato inicial.

ONODERA e SHIOMI (1988), utilizando um extrato filtrado proveniente de uma cultura de *Penicillium purpurogenum*, obtiveram uma alta purificação de inulinase caracterizada como endo-inulinase. O processo de purificação foi realizado por cromatografia em DEAE-Sepharose CL-6B, Toyopearl HW-65 e Bio-Gel P-100. A caracterização da massa molecular foi obtida por filtração em gel Bio-Gel P-150 e por

eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS. As técnicas apresentaram concordância estimada em 63 kDa e utilizando a focalização isoeétrica analítica em PhastSystem (Phast Gel IEF 3-9), obtiveram ponto isoeétrico de 3,6. A ação da enzima sobre o substrato inulina, levou à formação de tri, tetra, penta e hexa sacarídeos, identificando a enzima segundo os produtos formados como sendo uma endo-inulinase. Atingiu-se um fator de purificação de 394 vezes em relação ao extrato inicial.

Utilizando um extrato enzimático gerado por uma cultura de *Aspergillus*, AZHARI et al.(1989) obtiveram a purificação e caracterização das duas formas de inulinases do tipo exo e endo. Realizaram a purificação das enzimas por três etapas: diálise (pré-purificação), cromatografia por troca de iônica em CM-Sepharose CL-6B e etapa final por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna de permeação em gel HP-GPC. As enzimas apresentaram massas moleculares de 81 kDa para exo-inulinase e 53 kDa para endo-inulinase obtidas por filtração em gel na coluna HP-GPC e os fatores de purificação foram de 18,5 e 31,9 vezes, respectivamente, para endo e exo-inulinase relativos ao extrato inicial. A ação hidrolizante das enzimas foi determinada por cromatografia em camada delgada e também por cromatografia em coluna Lichrosorb-NH<sub>2</sub>. As enzimas apresentaram decréscimos de atividade quando submetidas a presença de íons metálicos em cerca de 2 vezes para Mg<sup>+2</sup> e Mn<sup>+2</sup>, e na presença de Fe<sup>+3</sup> houve aumento em 20 vezes, já os íons K<sup>+1</sup> e Ca<sup>+2</sup> não apresentaram efeitos. A presença do EDTA promoveu um decréscimo de atividade em cerca 20% para endo-inulinase e 65% para exo-inulinase.

XIAO et al. (1989) obtiveram a purificação de uma endo-inulinase a partir do extrato produzido por uma cultura de *Chrysosporium pannorum*. Utilizaram a seguinte estratégia: cromatografia em troca iônica em DEAE-Sepharose CL-6B, concentração e dessalinização por filtração em gel Bio-Gel P-6, cromatografia em DEAE-Sepharose CL-6B, filtração em gel Sephacryl S-200 e dessalinização por filtração em gel Bio-Gel P-6. A massa molecular da enzima foi obtida por eletroforese em SDS e por filtração em Sephacryl S-200, calculando-se um valor de aproximadamente 58 kDa e 56 kDa, respectivamente e o ponto isoeétrico determinado em 3,8 através de focalização isoeétrica. A ação hidrolítica da enzima apresentou especificidade ao substrato inulina em 147,3 U mg<sup>-1</sup> e os produtos da hidrólise foram analisados por cromatografia líquida de

alta eficiência numa coluna Shodex NH PAK J-411 identificados como inulotriose, inulotetraose e inulopentose.

ROUWENHORST et al. (1990) estudaram a purificação da inulinase extracelular produzida por um cultura de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Nesta levedura foram identificados duas formas de inulinase, uma extracelular (Inu-ext) secretada para fase fluida e a outra retida na parede celular (Inu-pc). Realizaram a purificação por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50, filtração em gel Superose 12 HR, ultrafiltração e concentração em Amicon-30. A caracterização da massa molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) identificou subunidades similares de 64 kDa. E por filtração em gel Superose 12, as enzimas apresentaram massas moleculares de 180 kDa e 450 kDa, respectivamente, para enzima extracelular e intracelular.

Utilizando-se da chicória como fonte de inulina, CLAESSENS et al. (1990) conseguiram identificar e purificar uma inulinase presente nesta raiz. A estratégia de purificação adotada foi baseada na centrifugação, cromatografia de troca iônica em S-Sephrose, dessalinização em gel Sephadex G-25, cromatografia de afinidade em gel Sepharose Concanavalin A, cromatografia de troca iônica em coluna mono Q, outra etapa de dessalinização e concentração em gel Sephadex G-25 e, finalmente, cromatografia de troca iônica em coluna mono S. Neste processo, conseguiram um fator de purificação de 643 vezes em relação ao extrato inicial. Estimaram a massa molecular em aproximadamente 72 kDa por filtração em gel Superose-12 e por eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS foi aproximadamente de 68 kDa, sugerindo que se tratava de uma inulinase de estrutura simples sendo um único polipeptídeo. A enzima purificada foi classificada como uma exo-inulinase, identificada pela formação de frutose, produto da hidrólise do substrato de inulina, comprovada por cromatografia em camada delgada.

O estudo da inulinase extracelular obtida de um isolado da cultura de *Kluyveromyces cicerisporus*, cultivada em extrato de alcachofra de Jerusalém, foi realizado por MANZONI e CAVAZZONI (1991), que utilizaram duas etapas de purificação: cromatografia em troca iônica em DEAE-celulose e precipitação com acetona. A caracterização da massa molecular da enzima purificada foi obtida por

eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS (SDS-PAGE) e estimada em aproximadamente 100 kDa.

ELYACHIOUI et al. (1992) identificaram a bactéria *Arthrobacter* sp. como produtora de inulinase extracelular. A purificação da enzima foi realizada por precipitação em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , seguida por cromatografia em DEAE-Celulose e filtração em Ultrogel ACA-34. Os produtos da ação enzimática, após incubação com substrato, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e não apresentaram formação de oligômeros de frutose, sendo caracterizada como uma enzima do tipo exo-inulinase.

NAKAMURA et al. (1994), a partir de um extrato bruto da cultura de *Aspergillus niger* mutante, identificaram, após processo de purificação, dois tipos de endo-inulinase. O procedimento de purificação foi baseado em quatro etapas: diálise, ultrafiltração, cromatografia de troca iônica em DEAE-Cellulofine A-500 e etapa final com cromatografia em Q-Sepharose. As frações isoladas das enzimas P-IA e P-IB, apresentaram massas moleculares aproximadas de 70 kDa e 80 kDa, obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS e o processo de purificação proporcionou fatores em torno de 177 e 170 vezes sobre extrato inicial. A ação das enzimas foi avaliada por cromatografia em camada delgada e testada por variedades de oligosacarídeos do tipo 1-kestose GF2, nistose GF3, rafinose, inulina, sacarose e levana. As enzimas apresentaram poder hidrolisante sobre o substrato de inulina produzindo inulotriose e outros oligômeros de frutose.

A produção e purificação da inulinase extracelular de uma cultura de *Kluyveromyces fragilis* foi realizada por GUPTA et al. (1994). A purificação do meio extracelular da cultura foi obtida por precipitação em etanol a 200%, filtração em gel Sephadex G-200, cromatografia em troca iônica em DEAE-Celulose e, finalmente, outra etapa cromatográfica em coluna de troca iônica em CM-Celulose. A ação enzimática da inulinase purificada sobre a inulina, apresentou unicamente formação de unidades de frutose identificando assim a enzima como uma exo-inulinase. Estimou-se a massa molecular em 250 kDa através de filtração em gel Sephadex G-200. O processo de purificação atingiu um fator de 26,5 vezes em relação ao extrato inicial. Observaram que

a presença de íons afetava a atividade enzimática, havendo acréscimo de atividade com os cátions  $Ba^{+2}$  (60%),  $Fe^{+3}$  (46%),  $Zn^{+2}$  (40%),  $Ca^{+2}$  (33%) e  $Mg^{+2}$  (26%), decrescendo em (90%) na presença de  $NO_2^-$  e apresentando inibição total na presença de  $Hg^{+2}$ .

A identificação e purificação de inulinase extracelular produzida pela bactéria *Bacillus stearothermophilus*, foi conseguida por BELAMRI et al. (1994). O procedimento de purificação foi realizado por cromatografia em DEAE-Sepharose e filtração em gel Sephacryl S300 HR. No processo de purificação obtiveram o fator de 8 vezes em relação ao extrato inicial. A caracterização da enzima foi possível, utilizando-se a cromatografia por permeação em Sephacryl S300 HR, como também, da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS (SDS-PAGE). Essas técnicas estimaram aproximadamente a massa molecular em 600 kDa por cromatografia de permeação em gel e 60 kDa nas subunidades, caracterizando uma estrutura composta de 10 subunidades.

As informações relativas aos diversos processos de purificação de inulinases descritos, como também, em outras publicações são resumidas nas Tabelas 2.2, 2.3 e 2.4.

Tabela 2.2 - Processos de purificação de inulinases sintetizados por fungos filamentosos.

Fonte	Adsorventes	Técnicas de Caracterização	Enzimas	Fator de Purificação	Referências
<i>Aspergillus niger</i>	DEAE- Cellolofine A-500 Q-Sepharose HP	SDS-PAGE	Endo (70 kDa, 83kDa)	170,70	NAKAMURA et al. (1994)
<i>Aspergillus</i>	CM-Sepharose	HP-GPC	Endo (53 kDa) Exo (81 kDa)	31,9	AZHARI et al. (1989)
<i>Aspergillus niger</i>	DEAE-Trisacryl Sephadex G-150 Ultrogel ACA 202	HPLC SDS-PAGE	Exo (85 kDa)	787	UHM et al. (1987)
<i>Aspergillus ficcum</i>	DEAE-Sephacl DEAE-Trisacryl Mono Q Ultrogel ACA 34	SDS- PAGE	Invertase(84kDa) Exo (74-76 kDa) Endo (64 kDa)	30,5 64,5	ETTALIBI e BARATTI (1987)
<i>Panaeolus papillonaceus</i>	DEAE – Sephadex A-50 Biogel P300 Biogel P200	GPC SDS-PAGE	116 kDa 60 kDa, 56 kDa	5,7	MUKHERJEE e SENGUPTA (1988)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	DEAE-Sepharose CL-6B Toyopearl HW-65 Bio-Gel P100	GPC SDS-PAGE	Endo	394	ONODERA e SHIOMI (1988)
<i>Chrysosporium pannorum</i>	DEAE-Sepharose CL-6B Sephacryl S-200	SDS-PAGE HPLC	Endo (58 kDa, 56 kDa)	12,20	XIAO et al. (1989)

**Tabela 2.3** - Processos de purificação de inulinases sintetizados por leveduras.

Fonte	Adsorventes	Técnicas de Caracterização	Enzimas	Fator de Purificação	Referências
<i>Candida kefir</i>	DEAE-Sephadex SE-Sephadex			56,26	NEGORO e KITO (1973)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Sephadex G-200 DEAE-celulose CM-celulose	GPC	Exo (250 kDa)	26,5	GUPTA et al. (1994)
<i>Kluyveromyces cicerisporius</i>	DEAE-Celulose	SDS-PAGE	Exo (100 kDa)	–	MANZONI e CAVAZZONI (1991)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	DEAE-Sephadex A-50 Superose 12 HR	SDS-PAGE	Endo (64 kDa)	–	ROUWENHORST et al. (1990)

**Tabela 2.4** - Processos de purificação de inulinases sintetizados por bactérias.

Fonte	Adsorventes	Técnicas de Caracterização	Enzimas	Fator de Purificação	Referências
<i>Arthrobacter</i>	DEAE-Celulose P-Toypearl	SDS-PAGE	Endo (75 kDa)	63	KANG et al.(1998)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	QEAE Sepharose FF Sephacryl S300 HR	SDS-PAGE	Exo (60 kDa)	8	BELAMRI et al. (1994)

## 2.4. - Desenvolvimento de Processos para Purificação de Proteínas

Define-se em três etapas básicas, que são recomendadas para se atingir o isolamento de uma proteína. Primeira, realizar experimentos analíticos em escala laboratorial, são executados na prática, para testar a(s) técnica(s) adequada(s) à separação da proteína de interesse. Organizando-se numa sequência de técnicas, com objetivo de atingir um produto final, livre de outras proteínas desconhecidas e que geralmente aparecem como contaminantes no processo. Segunda, o processo é aumentado para uma escala superior tipo preparativa, considerando sempre a quantidade de material disponível, para a obtenção do produto isolado no final do processo. Finalmente, a conferência do grau de pureza no produto final purificado (LILLEHOJ e MALIK, 1989).

Frequentemente pode ser necessário corrigir o protocolo de purificação, baseado no grau de pureza do produto, pois alguns contaminantes podem aparecer durante as etapas do processo de purificação em escala preparativa, e que antes não eram detetados nos experimentos em escala laboratorial. Neste caso, é conveniente analisar uma amostra de proteína no último estágio do protocolo de separação na escala preparativa. A mudança de escala será satisfatória após reenxame no grau de pureza do produto final.

É importante enfatizar que o conceito de grau de pureza “aceitável” varia de acordo com a aplicabilidade da proteína isolada. Por exemplo, a pureza de uma proteína com atividade biológica, tal como uma enzima, pode ser aceitável com grau de pureza médio, isto é, basta que a proteína purificada esteja livre de inibidores ou substâncias interferentes que minimizam a atividade enzimática(LILLEHOJ e MALIK, 1989).

Por outro lado, a purificação de proteínas estruturais necessita de um grau de pureza elevado, sendo primordial a ausência de qualquer tipo de contaminante (LILLEHOJ e MALIK, 1989).

## 2.4.1 – Estratégia para Purificação de Proteínas

No desenvolvimento de um processo de purificação de proteínas o objetivo é atingir rendimento máximo com alta seletividade, considerando os custos das operações empregadas. Desta forma, no processo de purificação deve-se ter um sequenciamento adequado das etapas envolvidas no processo e um número otimizado de operações unitárias envolvidas. Cada proteína possui propriedades que diferenciam uma das outras, as quais são exploradas por diversas técnicas num protocolo de purificação. Partindo-se de uma mistura de proteínas, contendo aquela que se deseja purificar, cada técnica de purificação será recomendada de acordo com suas propriedades e o tipo de amostra (HARRIS, 1995). É apresentada na Tabela 2.5, um resumo das técnicas em função dessas propriedades.

**Tabela 2.5** - Propriedades das técnicas de purificação de proteínas (HARRIS, 1995).

Técnica	Propriedade	Capacidade	Resolução	Rendimento	Custos
Precipitação alteração do pH	Carga	Alta	Muito Baixa	Médio	Baixo
Precipitação (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Hidrofobicidade	Alta	Muito Baixa	Alto	Baixo
Extração Bifásica	Mistura	Alta	Muito	Alto	Baixo
	Bioafinidade		Baixa	Variável	Alto
Crom. Troca Iônica	Carga	Média	Média	Médio	Médio
Crom. Interação Hidrofóbica	Hidrofobicidade	Média	Média	Médio	Médio
Focalização Isoelétrica	Carga e pI	Baixa	Alta	Médio	Alto
Crom. Afinidade (Corante)	Mistura	Média	Alta	Médio	Médio
Crom. Afinidade (Ligante)	Bioatividade	Média-baixa	Muito Alta	Baixo	Alto
Crom. Exclusão em Gel	Tamanho	Muito Baixa	Baixa	Alto	Médio

A escolha da técnica utilizada, deverá ser selecionada em relação à sua capacidade, resolução, seletividade, rendimento provável de proteína e, levando sempre em consideração, o fator econômico. A capacidade da técnica está relacionada com a concentração de proteína e quantidade de amostra ou volume disponível. Um requisito prioritário no início do processo de purificação, é a redução do volume onde se encontra a proteína que se deseja purificar. Técnicas que requerem alta capacidade, tal como a precipitação, são empregadas geralmente no início do processo (HARRIS, 1995).

Os processos cromatográficos que envolvem a propriedade de troca de carga iônica são considerados de alta capacidade e, por conseguinte, utilizados em etapas intermediárias do processo de purificação. A cromatografia por permeação em gel, tem baixa capacidade e quase sempre recomenda-se a utilização como etapa final do processo de purificação (HARRIS, 1995).

A medida da habilidade da técnica em adsorver unicamente a proteína de interesse em detrimento de outras é definido como seletividade. Técnicas que possuem alta seletividade são utilizadas em etapas finais de um processo, no qual têm-se maior facilidade em separar as proteínas. Os métodos cromatográficos por afinidade são bons exemplos de técnicas que possuem alta seletividade. A eficiência da separação de um componente (proteína) de interesse de outros, é definida como resolução. Este termo é o mais significativo em um processo, pois representa o quanto uma técnica se diferencia de uma outra. A utilização de métodos com alto poder de resolução, diminuirão o número de etapas necessárias ao objetivo do processo de purificação (a proteína isolada com alto grau de pureza) (HARRIS, 1995).

#### **2.4.2 - Ordenamento de Técnicas Aplicadas para Purificação**

A análise das diversas estratégias de purificação indica que após a fermentação, a homogeneização deve ser a primeira etapa utilizada na maioria dos protocolos de

purificação. O sequenciamento das demais técnicas posteriores, incluirá a precipitação, seguida da cromatografia por troca iônica ou cromatografia por interação hidrofóbica, cromatografia por afinidade e finalmente a cromatografia por permeação em gel. É recomendado que a seqüência para formulação de um protocolo tenha uma lógica bem definida e única, sendo que cada técnica cromatográfica deve explorar uma propriedade diferente da outra (HARRIS, 1995).

Utiliza-se inicialmente a precipitação por sal, visto que esta técnica pode manusear um volume considerado de material e também concentra a proteína presente na amostra. A cromatografia de troca iônica poderá ser utilizada, na seqüência, na remoção da maioria dos contaminantes, antes de usar uma técnica de custo mais elevado; cromatografia por afinidade. A cromatografia por permeação em gel é utilizada como etapa finalizadora, pois a capacidade já não será mais fator limitante no processo de purificação. Não existe uma regra básica que estabeleça uma estratégia universal para todas as proteínas, pois os sistemas protéicos são distintos por natureza (HARRIS, 1995).

A análise do progresso da purificação é geralmente acompanhado por eletroforese em gel, que indicará o quanto está pura a proteína e quantos contaminantes estão presentes nas diversas etapas do processo. A identificação da massa molecular é possível por uso do método de eletroforese em gel SDS-PAGE, determinando a massa molecular das proteínas e dos contaminantes (LILLEHOJ e MALIK, 1989).

## **2.5 - Processos de Adsorção**

A adsorção pode ser seletiva na remoção de uma ou mais espécies presentes numa fase fluida, tendo com finalidade a separação, purificação, destruição ou recuperação. Isso ocorre devido à formação de ligações entre moléculas do soluto e grupos funcionais (sítios de adsorção) distribuídos sobre a superfície de um material

sólido poroso (adsorvente). Em princípio, qualquer material sólido que possua grande área superficial e sítios de adsorção pode ser considerado como adsorvente.

A adsorção é um fenômeno em que as moléculas presentes numa fase fluida interagem e concentram-se na superfície do sólido sem qualquer mudança química. Esta interação física ocorre devido a inadequada força na superfície que atrai e mantém as moléculas (adsorbato), desde a vizinhança fluida na superfície do sólido (adsorvente). A adsorção é essencialmente um fenômeno de superfície, distinguindo-se da absorção, que implica na retenção de um componente no interior (DECHOW, 1988).

A utilização de processos de adsorção para purificação de água, óleos e outros fluidos por adsorventes têm sido explorado com relativo sucesso há várias décadas pela indústria química. A adsorção de biomoléculas vem acompanhando o crescente desenvolvimento da biotecnologia, nas últimas décadas, sendo que um grande número e variedade de substâncias vem sendo purificadas por esta técnica (DECHOW, 1988).

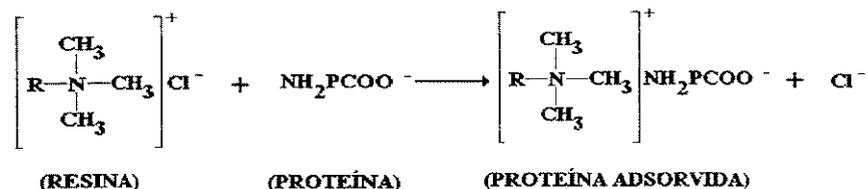
Adsorção é utilizada em processos de recuperação de produtos fermentativos: (a) na remoção de moléculas indesejadas, que conferem coloração ao meio fermentado; (b) para adsorver o produto principal da fermentação aumentando a concentração; (c) adsorvendo seletivamente o soluto do meio fermentado e separando por cromatografia (DECHOW, 1988).

### **2.5.1 - Adsorção de Proteínas em Trocadores de Íons**

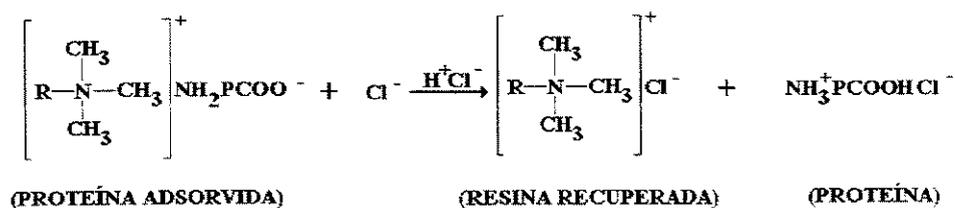
As proteínas são adsorvidas nas resinas trocadoras de íons por ligações eletrostáticas que se formam entre as cargas da superfície da proteína e os grupos carregados dos adsorventes. As cargas são balanceadas por contra-íons, tais como, íons cloreto, íons metálicos ou outros íons existentes na solução tampão. A molécula de proteína desloca os contra-íons que se situam nos poros e interage com o adsorvente. Como resultado global, a região do adsorvente torna-se eletricamente neutra e o saldo de

carga da proteína será de mesmo sinal que os contra-íons deslocados, resultando a designação de “troca de íons” para o mecanismo de adsorção.

Pode-se tomar como exemplo o caso da troca de íons (ânions), a proteína carregada negativamente é adsorvida em uma resina que possui o grupamento amino quaternário e íons cloreto, como :



Essa etapa é denominada também de fixação da proteína. A eluição (ou dessorção) da proteína é obtida numa etapa suplementar através da modificação do pH para um valor inferior ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, com adição de um ácido forte como HCl, exemplificado abaixo.



Este sistema de adsorção foi descrito por CARRÈRE (1993), quando utilizou-se de um adsorvente do tipo Spherosil QMA para concentração das proteínas presentes no soro de queijo (lactalbumina e lactoglobulina) eluindo com HCl 0,1 N.

## 2.5.2 - Adsorventes Trocadores de Íons

Trocador iônico consiste de um sólido macroporoso que possui, ligados na superfície, grupos funcionais com cargas. Esses grupos podem se associar a contra-íons, e os contra-íons podem ser reversivelmente trocados por outros íons de mesma carga sem

alterações do adsorvente. A hidroxiapatita apresenta-se como um trocador versátil possuindo cargas positivas e negativas (KAWASAKI, 1991).

Os trocadores de íons podem ser classificados como catiônicos ou aniônicos conforme permuta dos íons com os contra-íons. Os catiônicos possuem contra-íons positivos (+) e nos aniônicos os contra-íons são negativos (-).

A matriz do trocador de íons pode estar baseada em compostos inorgânicos, resinas sintéticas, ou ainda em polissacarídeos. As características da matriz determinam as propriedades cromatográficas da mesma, podendo-se citar a estabilidade química, a resistência mecânica, a eficiência, bem como a capacidade e recuperação. A presença de grupos carregados é uma propriedade fundamental dos trocadores de íons. O tipo de grupo determinará o tipo e força do trocador de íons e o número de grupos determinarão a capacidade. Existe uma variedade de grupos funcionais que estão presentes em trocadores de íons como é resumido na Tabela 2.6.

**Tabela 2.6** - Grupos de trocadores de íons utilizados em cromatografia aplicados à proteínas, conforme BOSCHETTI (1994).

Grupos	Estruturas	Ligação a matriz	pK	Adsorventes Comerciais
Sulfatos	-OSO <sub>3</sub> H	Éter	< 2	SP-Sepherodex
Sulfonatos	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> SO <sub>3</sub> H	Éter	< 2	SP-Toyopearl
Fosfatos	-OPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	Éter	< 2 e 6	Phosphocellulose
Carboxilatos	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> COOH	Éter	3,5-4,2	CM-Sepharose
Amino-Terciário	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )	Amido Éter	8,5-9,5	DEAETrisacryl
Amino-Quaternário	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> N <sup>+</sup> (R) <sub>3</sub>	Éter Amido	> 9	Q-HyperD

Os grupos sulfonatos, sulfatos, fosfatos e amino-quaternário são considerados trocadores de íons fortes; já os carboxilatos e amino-terciários são grupos trocadores

fracos. A Tabela 2.7 compara uma relação de trocadores iônicos comerciais que são utilizados em cromatografia do tipo preparativa. A escolha do adsorvente adequado deve ser realizada através do compromisso entre a eficiência de adsorção e o volume necessário de solução tampão para equilíbrio do adsorvente (BOSCHETTI, 1994).

**Tabela 2.7** - Características gerais dos principais trocadores de íons utilizados em cromatografia preparativa, BOSCHETTI (1994).

Trocador de íon	Quantidade de grupos iônicos ( $\mu\text{equiv./ml}$ )	Capacidade de adsorção BSA(mg/ml)	Eficiência na adsorção (mg/ $\mu\text{equiv.}$ )	Volume de Equilíbrio (vol.tampão/ vol. Coluna)
QMA Accell	104	111	1.06	1.8
DEAE Bio-Gel A	16	38	2.37	2.5
DEAE Cellufine	186	113	0.61	5.3
DEAE Cellulose	373	131	0.35	2.9
DEAE Fractogel	132	32	0.24	1.1
DEAE-Separon Hema Bio- 1000	320	70	0.21	—
DEAE Sephacel	116	131	1.13	2.3
DEAE Sepharose CL- 6B	161	164	1.02	4.8
DEAE Sepharose FF	132	88	0.66	3.8
DEAE Spheredex	104	98	0.94	3.6
DEAETrisacryl	340	86	0.25	1.5
PAE Matrex	244	42	0.17	4.5
Q Fractogel EMD	35	55	1.57	1.2
Q Poros II	375	40	0.1	5.9
Q Sepharose Fast Flow	179	115	0.64	1.5
Q Super	198	127	0.64	1.7
Q HyperD	160	125	0.83	1.2

(1) determinado experimentalmente por curva de “breakthrough”; titulação com 50 mM de HCl em adsorvente de regeneração alcalina; (2) determinado por BSA em 50 mM de Tris-HCl (pH 8.6); (3) calculado por passagem de Tris-HCl ( 50 mM, pH 8.6) + 1M NaCl até 50 mM Tris-HCl (50 mM, pH 8.6).

## 2.6 - Processos Cromatográficos de Adsorção

A coluna cromatográfica é composta por um leito constituído de partículas sólidas porosas, percolada por um fluxo de líquido contendo uma mistura de proteínas. Este processo é a principal forma de contato para recuperação e separação dos componentes protéicos presentes. As partículas representam a fase sólida (fase estacionária), enquanto que a fase móvel é constituída pela fase líquida que contém a mistura de proteínas.

O princípio da separação cromatográfica consiste na existência de interação entre os diversos constituintes da mistura com a fase estacionária, fazendo com que cada componente da mistura a ser separada percole a coluna em diferentes velocidades. E por consequência, tem-se a separação dos componentes da mistura (COLLINS et al., 1998).

Existem vários tipos de cromatografia aplicáveis aos processos de separação de proteínas estão relatados em COLLINS et al. (1998): a) cromatografia de adsorção, que é governada por forças de Van de Waals, pontes de hidrogênio e diferença de polaridade. A seletividade é muito baixa quando aplicada à purificação de proteínas; b) cromatografia por hidrofobicidade e em fase reversa: é regida pelas interações hidrofóbicas. Para as proteínas prefere-se as interações hidrofóbicas mais fracas, pois evitam a desnaturação protéica; c) cromatografia de afinidade: baseia-se nas interações bioespecíficas e d) cromatografia de troca iônica: baseia-se nas interações iônicas entre o adsorvente e as cargas das proteínas.

As técnicas cromatográficas podem ser classificadas de acordo com o objetivo da separação. A separação analítica tem como objetivo uma análise qualitativa ou quantitativa da mistura. Na preparativa, separa-se uma substância, a qual é isolada em quantidades laboratoriais, onde se obtém alguns gramas do produto purificado. A separação em processo de grande escala de produção, efetua-se em escala semi-industrial ou mesmo industrial da biomolécula (SCOPES, 1987).

Na cromatografia preparativa, o processo de injeção de amostra na coluna é contínuo e denomina-se de cromatografia por análise frontal. A quantidade de proteína que é injetada na coluna devido ao modo contínuo, forma uma frente de concentração que percorre toda coluna. A variação da concentração de adsorbato com o tempo na saída da coluna é conhecida como curva de ruptura (“breakthrough”), e a determinação da curva de ruptura para um dado sistema é chamada de análise frontal (CHASE, 1984).

### **2.6.1- Operações Cromatográficas por Análise Frontal em Leito Expandido**

Na purificação de proteínas pelo processo de cromatografia por análise frontal em leito fixo, a fase móvel (fluido fermentado) deverá estar livre de qualquer material particulado antes de percolar o leito de adsorção, para que não haja colmatação da coluna cromatográfica.

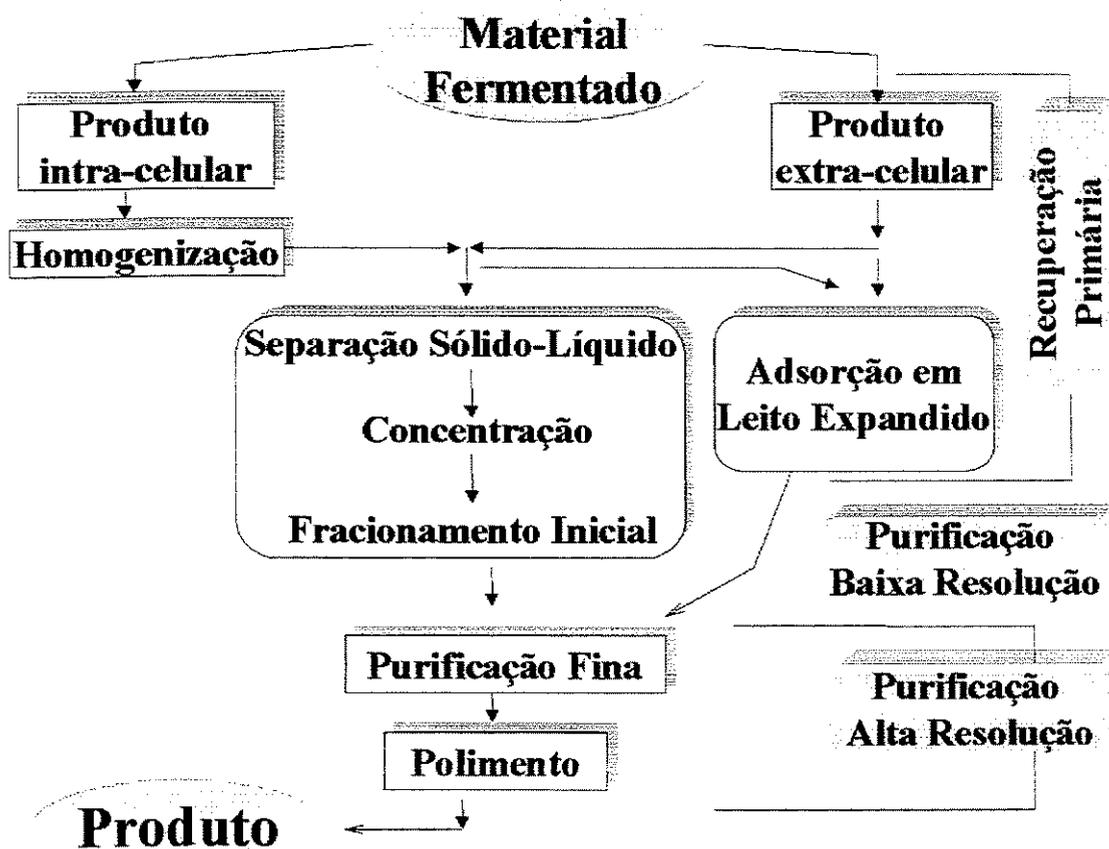
Segundo DRAEGER e CHASE (1991), a remoção das partículas presentes na fase fluida requer a inclusão de etapas adicionais de separação anteriores ao processo cromatográfico. Tais processos incluem filtração, centrifugação e sedimentação dos materiais particulados, que geralmente elevam os custos econômicos e operacionais do processo e ainda podem causar perdas na quantidade de proteínas a ser purificada.

Em contraste, tem-se a adsorção em cromatografia por leito expandido que é uma operação unitária relativamente nova, sendo baseada na fluidização do leito de adsorvente, e que é aplicada aos processos de recuperação, separação e purificação de proteínas.

A operação de fluidização é realizada em etapa única, sendo que o fluido (obtido por fermentação) e contendo material particulado é alimentado sem qualquer etapa prévia de clarificação. O princípio é baseado no percolamento do líquido através do leito de partículas, ocorrendo a expansão do leito, sem que haja formação de turbulência e

formação de canais preferenciais. Desta forma, os espaços entre as partículas aumentam, proporcionando uma porosidade superior ao de um leito fixo, o que permite aos materiais particulados presentes no fluido (células, fragmentos de células e outros contaminantes) passarem através do leito sem grandes obstáculos conforme DRAEGER e CHASE (1991) e THÖMMES (1997).

Na Figura 2.3 apresenta-se o esquema contendo os procedimentos normais e alternativo com a utilização da cromatografia por leito expandido para processos de recuperação e purificação de bioprodutos.



**Figura 2.3** – Implementação da cromatografia por adsorção em leito expandido no processo convencional para recuperação e purificação de bioprodutos (THÖMMES, 1997).

As etapas envolvidas no processo de recuperação de proteínas por adsorção em leito expandido são basicamente as mesmas da operação em leito fixo, sendo que o leito expandido possui um leito maior nas etapas de adsorção e lavagem.

A etapa de lavagem em leito expandido deve ser mais eficiente para assegurar a retirada total de material particulado retido no leito (PHARMACIA, 1991). Após a adsorção, as proteínas podem ser eluídas tanto em leito fixo ou expandido, visto que o material particulado já não se encontra presente nesta etapa (DRAEGER e CHASE, 1992).

A utilização da operação em leito expandido para adsorção de biomoléculas vem sendo largamente explorada nesta década, neste sentido podem ser citados alguns trabalhos desenvolvidos por DRAEGER e CHASE (1991b) em que avaliaram a adsorção de BSA em operação por leito expandido com o adsorvente Q-Sepharose Fast Flow. A adsorção de BSA com a presença de células de *Alcaligenes eutrophus*, também foi estudada por DRAEGER e CHASE (1992a) utilizando o mesmo adsorvente.

Em trabalhos posteriores, DRAEGER e CHASE (1992b), estudaram a operação em leito expandido em sistemas de afinidade, investigando a adsorção da imunoglobulina G em Proteína A-Sepharose CL-4B, como também a purificação de fosfofrutoquinase produzida por células de *Saccharomyces cerevisiae* em cibacron-blue Sepharose Fast Flow.

PESSOA et al. (1996) estudaram a adsorção de inulinase produzida por *Candida kefyr* em cromatografia por análise frontal em leitos expandidos em trocadores aniônicos e catiônicos, respectivamente Streamline DEAE e Streamline SP. A adsorção em leito expandido foi bastante favorável e não houve alteração na capacidade de adsorção da Streamline com a passagem do fluido contendo fragmentos de células. A recuperação obtida neste processo foi cerca de 93% com fator de enriquecimento de 5,8 vezes e fator de concentração de 2,8 vezes.

A Tabela 2.8 resume um conjunto de sistemas biológicos para os quais foi aplicada recentemente e com sucesso a cromatografia por adsorção em leito expandido na concentração e purificação de proteínas.

**Tabela 2.8** - Resumo de resultados conseguidos por cromatografia de adsorção em leito expandido na recuperação de proteínas.

Produto(Organismo)	Adsorvente	Rendimento(%)	Enriquecimento	Referência
Galactosidade (E. coli)	DEAE Sepharose	90	5,5	HANSSON et al.(1994)
M. desidrogenase (E. coli)	Blue Sepharose	80	3,4	HANSSON et al.(1994)
Proteína de fusão (E. coli)	DEAE Sepharose	90	-	HANSSON et al.(1994)
Fumarase (S.cerevisae)	Streamline DEAE	70	7,1	HANSSON et al.(1994)
G6F desidrogenase (S. cerevisae)	Streamline DEAE	75	9,4	HANSSON et al.(1994)
HSA (Plasma)	DEAE Spherodex	90	-	VOUTÉ (1992)
Anticorpo (células de animais)	Streamline SP	70-85	39	BATT et al. (1995)

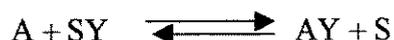
## 2.7- Isoterma de Adsorção e Capacidade do Adsorvente

O adsorvente tem características intrínsecas em que a capacidade do sólido (matriz) depende da massa molecular e concentração da proteína e também das condições favoráveis à adsorção (pH, força iônica), bem como, da forma estrutural de disposição dos sítios de adsorção, porosidade e tortuosidade. A capacidade de adsorção do adsorvente pode ser determinada em experimentos em tanques agitados ou por adsorção em leito fixo por análise frontal, conforme YAMAMOTO (1988).

O termo isoterma de equilíbrio descreve a relação entre a quantidade de adsorbato e a concentração de soluto que permanece em solução nas condições definidas para a adsorção.

A isoterma de adsorção definida por LANGMUIR (1916) foi, originalmente, desenvolvida para representar quimisorção, porém é amplamente aplicada em sistemas de adsorção de proteínas. Esta isoterma baseia-se nas seguintes suposições: (1) todos os sítios de adsorção são equivalentes, (2) há formação apenas de monocamada de solutos adsorvidos; (3) não existe interação entre sítios adjacentes de solutos adsorvidos e 4) no caso da adsorção competitiva de diversos compostos, a entalpia de adsorção é idêntica para todas moléculas.

Representando o processo de adsorção pelo esquema:



com a constante de equilíbrio:

$$K = \frac{[AY][S]}{[A][SY]} \quad (2.1)$$

Na Equação (2.1), [A] representa as moléculas do soluto, [S] as moléculas do solvente e [Y] os sítios na superfície. Embora esta expressão seja válida em termos de atividades termodinâmica, pois supõe que os sítios possuam a mesma atividade, a razão [AY]/[SY], expressa em atividade, será igual à razão de concentração [AY]/[SY] no adsorvente.

$$\frac{[AY]}{[SY]} = \frac{\theta}{1 - \theta} \quad (2.2)$$

em que  $\theta$  é a fração de superfície coberta por A e  $(1-\theta)$  é a fração coberta por S. Sendo a concentração [A] muito pequena comparada com concentração de [S], a fração molar de S na fase líquida,  $[1-A]$  é aproximadamente 1. Desta forma a Equação (2.2) pode ser escrita como:

$$K = \frac{[1-A]\theta}{[1-\theta][A]} \approx \frac{\theta}{(1-\theta)[A]} \quad (2.3)$$

Para baixas concentrações de [A] e pequenos valores de  $\theta$ , o termo  $\theta A$  é pequeno e a razão  $\theta/[A]$  torna-se quase constante. Em altas concentrações de [A] na fase líquida,  $\theta$  aproxima-se de 1 e a concentração de [A] no adsorvente torna-se constante.

Definindo [A] como C e  $\theta$  como  $q/b$ , a Equação (2.2) pode ser rearranjada para uma forma mais conhecida da equação de LANGMUIR (1916):

$$q = \frac{b \cdot K \cdot C}{1 + K \cdot C} \quad (2.4)$$

em que b é o número de moles do adsorbato adsorvido por grama de adsorvente que forma uma camada fina de moléculas na superfície e  $q=x/m$  é a quantidade adsorvida por grama de adsorvente.

Existem várias formas de equações de equilíbrio de adsorção. BEVERLOO et al. (1984) classificaram estas equações de acordo com o número de parâmetros e segundo suas validades em relação a regiões de baixa e alta concentração de soluto. A validação das equações destacam às seguintes características: (a) região de baixa concentração, aproxima-se assintoticamente de uma equação linear, (b) região de alta concentração é assintótica num valor máximo de adsorção. As equações do tipo exponencial, Langmuir,

Volmer e Toth são as que melhor representam as regiões de baixa e alta concentração sendo apresentadas na Tabela 2.9.

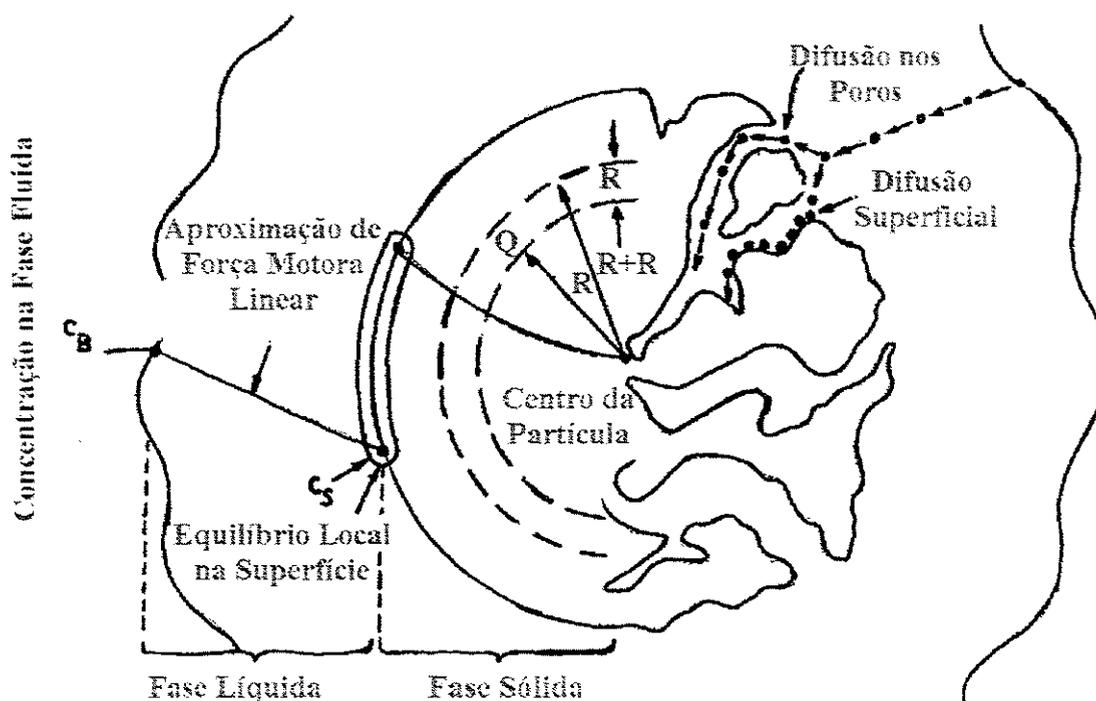
**Tabela 2.9** - Isotermas de equilíbrio de adsorção (BEVERLOO et al., 1984).

Equação	Parâmetros	Validação à baixa concentração	Validação à alta concentração
Exponencial; $q = \frac{A}{B} (1 - e^{(-Bc)})$	2	Positiva	Positiva
Langmuir ; $q = \frac{A \cdot c}{1 + B \cdot c}$	2	Positiva	Positiva
Volmer ; $c = \frac{q}{A - Bq} \cdot e^{\left(\frac{B \cdot q}{A - Bq}\right)}$	2	Positiva	Positiva
Toth; $q = \left( \frac{(Ac)^n}{1 + (Bc)^n} \right)^{1/n}$	3	Positiva	Positiva

## CAPÍTULO 3

### 3. Modelagem Matemática dos Processos de Adsorção

Nas etapas do processo de adsorção, o extrato da mistura contendo proteínas está em contato íntimo com o adsorvente (resina trocadora de íons), com o qual a proteína desejada interage reversivelmente. Alguns fatores influenciam afetando a eficiência do processo (DECHOW, 1987 e SKIDMORE et al., 1990), tais como a difusão lenta da proteína através da estrutura porosa, o efeito de tortuosidade do adsorvente e a adsorção não-específica. A natureza da adsorção pode estar relacionada ao tamanho da proteína e aos vários tipos de adsorventes com suas diferentes distribuições de tamanhos, conforme HORSTMANN et al. (1986).

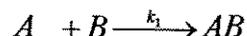


**Figura 3.1-** Mecanismos envolvidos nos processos de adsorção, DECHOW (1987).

Na adsorção por troca iônica os processos de interação e transferência de massa estão presentes independentemente ou combinados em série. A Figura 3.1 apresenta as etapas envolvidas, sendo divididas como: (1) transporte da proteína da fase fluida até a superfície externa do adsorvente; (2) transporte através do filme de líquido estagnado em torno do adsorvente; (3) difusão da proteína nos poros do adsorvente e (4) interação entre a proteína e o adsorvente.

### 3.1 - Modelo Simplificado para Cinética de Adsorção em Tanque Agitado

No modelo proposto por CHASE (1984), agrupam-se todas as resistências dentro de uma taxa constante e assume-se que apenas uma molécula de proteína será adsorvida em um grupo funcional do sítio iônico ou em um sítio de ligação bioespecífica (sítio de afinidade).



em que  $k_1$  e  $k_{-1}$  são as constantes de velocidade direta e inversa de adsorção e a razão ( $k_{-1}/k_1$ ) é definida como a constante de dissociação,  $k_d$ , que descreve a relação de equilíbrio. No sistema de tanque agitado (batelada), a taxa de transferência da fase sólida é representada por :

$$\frac{dq}{dt} = k_1 C (q_{\max} - q) - k_{-1} q \quad (3.1)$$

em que  $C$  é a concentração do soluto (adsorbato) em solução,  $q$  é a concentração na fase sólida do material adsorvido por unidade de volume do adsorvente,  $q_{\max}$  é a capacidade máxima do adsorvente. A solução analítica da Equação (3.1), apresentada por CHASE (1986), tem a seguinte forma:

$$C = C_0 - \left(\frac{v}{V}\right) \left[ \frac{(b+a) \left(1 - \exp\left(-\frac{2av}{V} k_1 t\right)\right)}{\left(\frac{b+a}{b-a}\right) - \exp\left(-\frac{2av}{V} k_1 t\right)} \right] \quad (3.2)$$

em que

$$a^2 = b^2 - \left(\frac{C_0 V}{v}\right) q_{\max} \quad (3.3)$$

e

$$b^2 = \frac{1}{2} \left( \frac{C_0 V}{v} + q_{\max} + \frac{k_{-1}}{k_1} \cdot \frac{V}{v} \right) \quad (3.4)$$

sendo que  $C_0$  é a concentração inicial do adsorbato em solução e os volumes do adsorvente e total do sistema são representados respectivamente por  $v$  e  $V$ .

### 3.2 - Modelo Completo para Cinética de Adsorção em Tanque Agitado

ARVE e LIAPIS (1987) apresentaram um modelo geral para prever o comportamento dinâmico da adsorção em tanques agitados. O modelo leva em consideração as resistências à transferência de massa por difusão nos poros do adsorvente e no filme de líquido na superfície do adsorvente. Neste modelo, a transferência de massa para a superfície do adsorvente é governada pela transferência de massa no filme de líquido, caracterizado pelo coeficiente de transferência de massa,  $k_f$  ( $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ ). A difusão das moléculas de proteínas nos poros do adsorvente é caracterizada pelo coeficiente de difusão efetivo,  $D_{ef}$  ( $\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ ). A interação na superfície do adsorvente, entre este e o adsorbato, é descrita por uma relação do tipo reversível de segunda ordem. O comportamento do equilíbrio entre o adsorvente e o adsorbato é representado pelo modelo de LANGMUIR (1916). As partículas de adsorvente são consideradas esféricas.

HORSTMANN e CHASE (1989) e CARRÈRE (1983), utilizaram um modelo similar para a adsorção de proteínas em resinas trocadoras de íons.

O balanço de massa no adsorvente é descrito por :

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ef} \left( \frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \frac{(1-\beta)}{\beta} \frac{\partial q_i}{\partial t} \quad (3.5)$$

em que  $\beta$  é a porosidade da partícula,  $C_i$  é a concentração de proteína na fase líquida no interior dos poros da partícula,  $q_i$  é a concentração de proteína na fase sólida, e  $t$  e  $r$  são as variáveis temporal e espacial (radial), respectivamente (CARRÈRE, 1993).

A condição inicial é :

$$t = 0 \quad C_i = 0 \quad 0 \leq r \leq R \quad (3.6)$$

e as condições de contorno são:

No centro da partícula:

$$r = 0 \quad \frac{\partial C_i}{\partial r} = 0 \quad t > 0 \quad (3.7)$$

Na superfície da partícula:

$$r = R \quad \beta D_{ef} \left( \frac{\partial C_i}{\partial r} \right)_{r=R} = k_f (C_b - C_i)_{r=R} \quad t > 0 \quad (3.8)$$

em que  $R$  (cm) é o raio da partícula. De acordo com a Equação (3.8), tem-se que a taxa de transferência de massa através do filme de líquido está relacionada com a concentração

global de proteína na fase líquida,  $C_b$ , e com a concentração de proteína na fase líquida na superfície da partícula,  $C_i|_{r=R}$ .

- Cinética de adsorção sobre a superfície dos poros (CARRÈRE, 1993):

A cinética de adsorção pode ser escrita como:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_1 C_i (q_{\max} - q_i) - k_{-1} q_i \quad (3.9)$$

em que  $k_1$  e  $k_{-1}$  correspondem às constantes cinéticas de adsorção e dessorção, respectivamente.

Considerando que a taxa de adsorção na superfície seja rápida, pode-se admitir que a relação entre  $q_i$  e  $C_i$  em cada instante é mantida pela relação de equilíbrio representada pela isoterma de LANGMUIR (1916), cuja expressão é:

$$q_i = \frac{q_{\max} C_i}{k_d + C_i}, \text{ em que } k_d = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (3.10)$$

Logo, pode-se expressar  $\partial q_i / \partial t$  como:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \frac{dq_i}{dC_i} \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad (3.11)$$

em que:

$$\frac{dq_i}{dC_i} = \frac{q_{\max} k_d}{(k_d + C_i)^2} \quad (3.12)$$

Logo, a Equação (3.11) é expressa por:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \frac{q_{\max} k_d}{(k_d + C_i)^2} \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad (3.13)$$

Substituindo-se a Equação (3.13) na Equação (3.5), têm-se:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ef} \left( \frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \frac{(1-\beta)}{\beta} \frac{q_{\max} k_d}{(k_d + C_i)^2} \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad (3.14)$$

ou:

$$\left[ 1 + \frac{(1-\beta)}{\beta} f'(C_i) \right] \frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ef} \left[ \frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right] \quad (3.15)$$

em que:

$$f'(C_i) = \frac{q_{\max} k_d}{(k_d + C_i)^2} \quad (3.16)$$

Adimensionalizando-se as variáveis  $t$  e  $r$  na Equação (3.15), têm-se:

$$\left[ 1 + \frac{(1-\beta)}{\beta} \frac{q_m k_d}{(k_d + C_i)^2} \right] \frac{\partial C_i}{\partial \tau} = \left[ \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} + \frac{2}{x} \frac{\partial C_i}{\partial x} \right] \quad (3.17)$$

$$0 \leq x \leq 1 \quad \tau > 0$$

em que:

$$x = \frac{r}{R} \quad \tau = \frac{D_{ef} t}{R^2} \quad (3.18)$$

Adimensionalizando-se também as variáveis  $t$  e  $r$  na condição inicial e nas condições de contorno, têm-se:

$$\tau = 0 \quad C_i = 0 \quad (3.19)$$

$$x = 0 \quad \frac{\partial C_i}{\partial x} = 0 \quad (3.20)$$

$$x = 1 \quad \frac{\partial C_i}{\partial x} = Bi_m (C_b - C_i) \quad (3.21)$$

em que:

$$Bi_m = \frac{k_f R}{\beta D_{ef}} \quad (3.22)$$

- Balanço de massa na fase líquida com concentração global de proteína (tanque agitado) (HORSTMANN e CHASE, 1989):

$$\frac{dC_b}{dt} = -\frac{3vk_f}{RV} (C_b - C_i)_{|r=R} \quad (3.23)$$

em que  $v$  é o volume de adsorvente e  $V$  é o volume de líquido.

A condição inicial da Equação (3.23) é:

$$t = 0 \quad C_b = C_o \quad (3.24)$$

Adimensionalizando-se as variáveis  $t$  e  $r$  na Equação (3.23), têm-se:

$$\frac{dC_b}{d\tau} = -\frac{3v}{V} Bi_m (C_b - C_i)_{|x=1} \quad (3.25)$$

cuja condição inicial é:

$$\tau = 0 \quad C_b = C_o \quad (3.26)$$

### 3.3 - Modelos Simplificados para Adsorção em Leito Fixo

A descrição matemática da adsorção em processos biocromatográficos foi desenvolvida em meados da década de 40, quando surgiu o modelo de equilíbrio local desenvolvido por MARTIN e SYGEN (1941), no qual o leito cromatográfico foi constituído de um número de pratos teóricos, cujos equilíbrios locais ocorriam entre as fases móvel e estacionária em cada prato. A relação de equilíbrio entre as duas fases é linear e a razão de distribuição independe da concentração dos solutos. Esta teoria tem sido largamente aplicada à cromatografia analítica para prever a largura e posição do pico cromatográfico, conforme YAMAMOTO et al (1987), mas tem aplicação limitada na cromatografia preparativa em que geralmente a interação entre as fases móvel e estacionária não é representada por um processo de adsorção linear.

CHASE (1984) adaptou a teoria das taxas aplicada à cromatografia, em vez da teoria dos pratos, para modelar o desempenho de uma coluna cromatográfica. Esta teoria consiste num conjunto de equações referentes a balanços de massa, juntamente com condições apropriadas tanto para o contorno como para o início. Neste modelo, a equação da continuidade da fase móvel é:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - u \frac{\partial C}{\partial z} - \frac{\partial q}{\partial t} \quad (3.27)$$

em que  $D_{ax}$  é o coeficiente de dispersão axial,  $C$  é a concentração na fase líquida na coluna,  $u$  é a velocidade linear ( $u_0 = u \cdot \epsilon$ ) ( $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ ),  $\partial q / \partial t$  é a taxa de transferência de massa na interface,  $z$  é a distância axial ao longo do leito, e  $t$  o tempo. Diversos modelos são apresentados na literatura, com base na teoria das taxas, para representar  $\partial q / \partial t$ , e que podem ser utilizados na Equação (3.27). Alguns destes modelos requerem conhecimento de parâmetros associados com a natureza física do adsorvente, os quais nem sempre podem ser prontamente avaliados. Algumas soluções propostas para a Equação (3.27) somente são aplicadas a sistemas representados por isothermas lineares. Dessa forma, CHASE (1984), supôs que a transferência de massa na interface sólido-líquido numa coluna cromatográfica também poderia ser descrita pela Equação (3.25):

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_1 C (q_{\max} - q) - k_{-1} q \quad (3.28)$$

Supondo que a dispersão axial na coluna é desprezível ( $D_{ax}=0$ ), e que as condições de contorno sejam que a coluna esteja sem nenhum adsorvato ligado e o fluxo de alimentação de adsorvato  $C_0$  ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) é constante. CHASE (1984) obteve uma solução analítica para as Equações (3.27) e (3.28). A solução obtida foi idêntica, na forma, àquela desenvolvida por THOMAS(1944), sendo expressa da seguinte forma:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{J(n/r, nT)}{J(n/r, nT) + [1 - J(n, nT/r) \exp(1 - r^{-1})(n - nT)]} \quad (3.29)$$

em que

$$r = 1 + \frac{C_0}{k_d} \quad (3.30)$$

$$n = (q_{\max} k_1 h) \frac{A}{f} \quad (3.31)$$

$$T = f \cdot t \cdot \left( \frac{k_d + C_0}{A q_{\max} h} \right) \quad (3.32)$$

em que a coluna cromatográfica empacotada (leito de adsorvente) possui altura  $h$  (cm),  $A$  é área da seção transversal ( $\text{cm}^2$ ), e  $f$  é vazão através da coluna ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). A função  $J(a,b)$  é expresso:

$$J(a,b) = 1 - e^{-b} \int_0^a e^{-\xi} I_0(2\sqrt{b\xi}) d\xi \quad (3.33)$$

em que  $I_0$  é a função de Bessel modificada de ordem zero. Os valores de  $q_{\max}$ ,  $k_d$  e  $k_1$  utilizados nas equações, são quantificados a partir de experimentos de adsorção em tanque agitado, realizados em pequena escala.

De acordo com THOMAS (1944), os valores de  $J(a,b)$  podem ser calculados facilmente por uma série assintótica, conforme a expressão abaixo.

$$J(a,b) \approx \frac{1}{2} \left[ 1 - \text{erf}(\sqrt{a} - \sqrt{b}) \right] + \frac{\exp \left[ 1 - (\sqrt{a} - b)^2 \right]}{2\pi^{0.5} \left( (ab)^{0.25} + b^{0.5} \right)} \quad (3.34)$$

onde o erro é menor que 1% quando  $ab > 36$ . Utilizando está aproximação tem-se facilmente o valor de  $C/C_0$  em função do tempo para uma grande faixa de adsorção em leito fixo.

### 3.4 - Modelo Completo para Adsorção em Leito Fixo

A equação do balanço de massa na coluna incorpora a transferência de massa no filme de líquido, a dispersão axial e a suposição de taxa de escoamento constante (SANTACESARIA et al., 1982).

$$\varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} = \varepsilon D_{ax} \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - u_0 \frac{\partial C}{\partial z} - \frac{3k_1}{R} (1 - \varepsilon)(C - C_i)_{r=R} \quad (3.35)$$

em que  $C$  é a concentração de adsorvato na fase externa ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ),  $C_i$  é a concentração de adsorvato na fase de líquido interna ao adsorvente ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ),  $\varepsilon$  é a porosidade do leito,  $D_{ax}$  é o coeficiente de dispersão axial ( $\text{cm}^2.\text{min}^{-1}$ ),  $u_0$  é a velocidade linear ( $\text{cm.min}^{-1}$ ),  $k_1$  é o coeficiente global de transferência de massa ( $\text{cm.min}^{-1}$ ),  $R$  é o raio da partícula, e  $z$  é a distância axial ao longo do leito empacotado de comprimento  $L$ . Aplica-se à equação (3.35) as condições de contorno de Danckwertz,

$$u_0 C_0 = u_0 C_{|z=0} - D_{ax} \left( \frac{\partial C}{\partial z} \right)_{|z=0} \quad t > 0 \quad (3.36)$$

$$\left( \frac{\partial C}{\partial z} \right)_{|z=L} = 0 \quad t > 0 \quad (3.37)$$

e a condição inicial,

$$t = 0 \quad \forall z \quad C = 0 \quad C_i = 0 \quad (3.38)$$

Adimensionalizando a Equação (3.35) e as condições de contorno (3.36) e (3.37), com as seguintes mudanças de variáveis:

$$\tau = \frac{t D_{ax}}{L^2}, \quad \text{Pe} = \frac{L u_0}{D_{ax}}, \quad u_0 = \frac{u_s}{\varepsilon}, \quad y = \frac{z}{L} \quad \text{e} \quad \lambda = \frac{3K_1 L^2}{R D_{ax}} \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad (3.39)$$

tem-se a Equação (3.35) na forma seguinte:

$$\frac{\partial C}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} - \text{Pe} \frac{\partial C}{\partial y} - \lambda (C|_y - C_i|_{r=R}) \quad (3.40)$$

as condições de contorno transformando-se em:

$$u_0 C_o = u_0 C \Big|_{y=0} - \frac{1}{Pe} \frac{\partial C}{\partial y} \Big|_{y=0} \quad (3.41)$$

$$\frac{\partial C}{\partial y} \Big|_{y=1} = 0 \quad \tau > 0 \quad (3.42)$$

e a condição inicial

$$\tau = 0 \quad \forall z \quad C = 0 \quad C_i = 0 \quad (3.43)$$

A dificuldade numérica envolvida para a solução dos sistema de equações diferenciais parciais formado pelas Equações (3.10) e (3.31) pode ser evitada pela simplificação do modelo referente à difusão nos poros, englobando-se os parâmetros envolvidos na transferência de massa.

Desta forma a dependência da concentração interna  $C_i$  com o raio da partícula de adsorvente é desprezada, e a função  $C_i(r,t)$  é substituída por uma concentração média no volume,  $\bar{C}_i(t)$ , definida como:

$$\bar{C}_i(t) = \frac{1}{V_p} \int_{V_p} C_i(r,t) dV_p \quad (3.44)$$

Aplicando-se o operador do volume médio ao modelo para a difusão nos poros da partícula, tem-se:

$$\beta \frac{d\bar{C}_i}{dt} = \frac{3k_f}{R} (C_e - \bar{C}_i) - (1 - \beta) \frac{d\bar{q}_i}{dt} \quad (3.45)$$

além disso:

$$\frac{d\bar{q}_i}{dt} = f'(\bar{C}_i) \frac{d\bar{C}_i}{dt} \quad (3.46)$$

como anteriormente utilizado na modelagem do tanque agitado. Para este modelo tem-se a seguinte condição inicial:

$$t = 0 \quad \bar{C}_i = 0 \quad (3.47)$$

Tomando com base a equação do balanço de massa na partícula.

$$\beta \frac{\partial C_i}{\partial t} = \beta D_{ef} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - (1 - \beta) \frac{dq_i}{dt} \quad (3.48)$$

e por seguinte aplicando a definição da média na Equação (3.48), tem-se:

$$\beta \frac{d\bar{C}_i}{dt} + (1 - \beta) \frac{d\bar{q}_i}{dt} = \beta D_{ef} \left[ r^2 \frac{\partial C_i}{\partial r} \right]_0^R \frac{4\pi}{4\pi R^3} \quad (3.49)$$

rearranjando a Equação (3.49) e aplicando a condição de contorno, tem-se:

$$\beta \frac{d\bar{C}_i}{dt} + (1 - \beta) \frac{d\bar{q}_i}{dt} = \frac{3}{r} k_f (C_b - C_i|_{r=R}) \quad (3.50)$$

Admitindo um perfil parabólico para concentração no interior da partícula expresso como  $C_i = a + b \cdot r + c \cdot r^2$ . E aplicando as condições de contorno e a definição de média na Equação (3.50), tem-se:

$$(C_b - C_i|_{r=R}) = \frac{(C_b - \bar{C}_i)}{\left[1 + \frac{k_f R}{5 \cdot \beta \cdot D_{ef}}\right]} \quad (3.51)$$

rearranjando a Equação (3.51), tem-se:

$$\frac{3}{R} \cdot k_f (C_b - C_i|_{r=R}) = \frac{3}{R} \cdot \frac{(C_b - \bar{C}_i)}{\left[\frac{1}{k_f} + \frac{R}{5 \cdot \beta \cdot D_{ef}}\right]} \quad (3.52)$$

Então :

$$\frac{1}{k_i} = \frac{1}{k_e} + \frac{1}{\beta k_i} \quad (3.53)$$

em que  $k_e$  e  $k_i$  são os coeficientes de transferência de massa na fase de líquido externa e interna (nos poros), respectivamente, e  $k_i = (D_{ef} 5/R)$ .

Na obtenção do modelo global foram introduzidas duas aproximações. A primeira, para a cinética de adsorção:

$$\frac{1}{V_p} \int_{V_p} \frac{f'(C_i)}{dC_i} \frac{\partial C_i}{\partial t} dV_p \cong \frac{f'(\bar{C}_i)}{d\bar{C}_i} \frac{d\bar{C}_i}{dt} \quad (3.54)$$

e a segunda para avaliar o coeficiente global de transferência de massa,  $k_i$ . Em particular, no lado direito da Equação (3.47) em que aparece o coeficiente de transferência de massa  $k_i$ , cuja definição é:

$$k_i = \frac{D_{ef} \left( \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) |_{r=R}}{(C_e - \bar{C}_i)} \quad (3.55)$$

o valor exato de  $k_i$  é , então, função do tempo, e somente poderá ser avaliado através do modelo completo.

## CAPÍTULO 4

### 4 - Materiais e Métodos

Será abordada, neste capítulo, uma descrição da metodologia e das técnicas de análises utilizadas para caracterização dos processos de adsorção de inulinases. Os experimentos foram basicamente realizados em adsorção em batelada e em colunas de adsorção em operações envolvendo leitos fixos e expandidos.

#### 4.1 - Reagentes

Fructozyme<sup>®</sup>, mistura de inulinases obtida de uma cultura de *Aspergillus niger* contendo cerca de 2000 UA.g<sup>-1</sup> e 1,2 g mL<sup>-1</sup>, foi gentilmente doada pela Novo Nordisk (Araucária-PR). Inulina (Fluka) de tubérculos de Dália e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sigma). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico tais como reagentes (sais) específicos para composição de soluções tampões.

#### 4.2 - Adsorventes Utilizados no Processo de Concentração de Inulinases

Neste trabalho, utilizou-se dois tipos de trocadores iônicos comerciais macroporosos. O adsorvente catiônico de moderada capacidade de adsorção CM-Sepharose CL-6B e outro aniônico de alta capacidade Accell Plus QMA, obtidos respectivamente da Pharmacia e Waters. O adsorvente catiônico, CM-Sepharose CL-6B, tem como matriz a agarose derivatizada e reticulada por ligações cruzadas. Esta estrutura é obtida por reação entre as cadeias do polissacarídeo (agarose) e 2,3-dibromopropanol (PHARMACIA, 1998). A partir desta nova configuração estrutural a agarose tem suas propriedades alteradas, aumentando as resistências químicas e físicas da matriz. E nesta nova estrutura, o grupo

funcional carboximetil acopla-se por ligações covalentes à superfície, conferindo o poder de troca de íons.

O adsorvente Accell Plus QMA é fabricado por um processo de copolimerização encapsulado numa base rígida de sílica. E a superfície do adsorvente tem seus grupos funcionais (aminometil quaternário) ligados por camadas cruzadas por forças hidrofóbicas proporcionando alta estabilidade (WATERS, 1987). A estrutura do adsorvente, rígida e incompreensível, é adequada para purificação e isolamento de proteínas, enzimas e imunoglobulinas, sendo empregado na concentração de proteínas em escala preparativa.

Os adsorventes têm características e propriedades distintas que estão apresentadas de forma resumida na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** - Características e propriedades físico-químicas dos adsorventes CM-Sepharose CL-6B e Accell Plus QMA.

Informações técnicas	CM- Sepharose CL-6B	Accell Plus QMA
Tipo de trocador	Catiônico	Aniônico
Estrutura	Agarose reticulada a 6%	Sílica
Grupo funcional	Carboximetil	Aminometil Quaternário
Forma esféricas	45-165 $\mu\text{m}$	-
Capacidade de adsorção <sup>(a)</sup>	75 <sup>(a1)</sup>	110 <sup>(a2)</sup>
Faixa de pH	3-12	2-9
Velocidade recomendada	130 $\text{cm h}^{-1}$	>300 $\text{cm h}^{-1}$

(a) capacidade de adsorção (a1) relativa ribonuclease ( $\text{mg.ml}^{-1}$ ) (PHARMACIA, 1998) e (a2) albumina do soro bovino ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) (BOCHETTI, 1994).

## 4.3 - Métodos de Análises

### 4.3.1 - Análise de Proteínas

Na literatura, existem várias metodologias para quantificar proteína que são baseadas na formação de complexos corante-aminoácidos, apresentando uma quantificação

de proteína total. Os vários métodos operam com faixa de sensibilidade e na maioria são destrutivos como demonstrado na Tabela 4.2. A escolha do método de análise é geralmente baseado na sensibilidade, rapidez de análise e também na relação custo/benefício.

**Tabela 4.2** – Métodos utilizados para quantificar proteína total (DEUTSCHER, 1990).

Métodos	Análise	Sensibilidade ( $\mu\text{g}$ )	Formação de complexo
Bradford	Destrutiva	0.2 a 20	Coomassie Blue G-R R=arginina $\text{Cu}^+\text{R}$
Lowry	Destrutiva	2.0 a 100	R=tirosina, triptano e cisteína $\text{Cu}^+\text{R}$
BCA	Destrutiva	0.2 a 50	R=tirosina, triptano e cisteína

A proteína total, presente na solução enzimática, foi monitorada continuamente por sistema de detecção por absorvância UV, no comprimento de onda a 280 nm, nos experimentos cromatográficos de adsorção em leito fixo e expandido. E também, quantificada descontinuamente pelo método de LOWRY (1951). No primeiro caso, o acompanhamento é necessário para apenas identificar as possíveis frações de interesse, que poderão conter a enzima em estudo. No segundo caso, a quantificação foi realizada através de uma curva de calibração utilizando albumina do soro bovino como proteína padrão, conforme Anexo A.

### 4.3.2 - Análise de Atividade Enzimática

A purificação da proteína será caracterizada pela razão de atividade específica antes e após cada etapa. Deste modo, recorre-se ao método de Miller para o teste de atividade enzimática total (MILLER, 1959), que é baseado na medida de produção de açúcares redutores a partir da hidrólise do substrato (polissacarídeo), através da ação das enzimas.

### **4.3.2.1 - Reação de Hidrólise Enzimática**

A reação de hidrólise enzimática é realizada por incubação de uma mistura composta de 200  $\mu$ L de inulina (2%), 200  $\mu$ L de solução tampão e 100  $\mu$ L de solução enzimática, após 10 min à temperatura de 50° C.

### **4.3.2.2 - Método do Açúcar Redutor Total ( Método do DNS )**

É baseado na reação entre o ácido dinitrosalicílico e as amostras hidrolizadas. A reação ocorre em 3 min e logo em seguida é interrompida por rápido resfriamento, através da imersão das amostras em banho de gelo. As medidas são realizadas à temperatura ambiente por leitura espectrofotométrica no comprimento de onda 540 nm, sendo comparadas a uma curva padrão de frutose, construída a partir das mesmas condições do ensaio apresentada no Anexo A. Define-se que uma unidade de atividade enzimática (UA) como sendo a quantidade de enzima que catalisa a formação de um  $\mu$ mol de frutose por minuto de reação sob as condições do ensaio.

### **4.3.3 - Diálise**

Em todos os experimentos as soluções enzimáticas foram previamente dialisadas contra solução tampão definida (pH e força iônica) para condicionar a solução enzimática e remover substâncias com massas moleculares inferiores a 10 kDa. As operações de diálise foram realizadas sob agitação e na temperatura de 4°C.

### **4.3.4 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE**

A eletroforese em gel de poliacrilamida, homogêneo ou em gradiente, é um método bastante utilizado na identificação de proteínas por estimativa da massa molecular. As proteínas são desnaturadas a quente, após adição dos reagentes dodecil sulfato de sódio

(SDS) e  $\beta$ -mercaptoetanol. Esses reagentes atuam sobre as proteínas conferindo à mesma densidade de cargas e desentralizando a estrutura protéica por rompimento das pontes de sulfetos, através do agente  $\beta$ -mercaptoetanol. Desta forma, as proteínas com mesma densidade de carga por unidade de comprimento migrarão no gel e a separação dependerá exclusivamente do tamanho das proteínas.

As análises de eletroforese em gel de poliacrilamida foram realizadas de acordo com o protocolo convencional descrito por LAEMMLI (1970). O gel de poliacrilamida foi preparado na concentração de 12,5 % em acrilamida e com a espessura de 0,75 mm. As amostras e os marcadores padrões de baixa e alta massa molecular (PHARMACIA, 1998), foram preparados em tampão contendo dodecil sulfato de sódio e  $\beta$ -mercaptoetanol, sendo aquecidos por período de 07 (sete) minutos à fervura. A separação das proteínas, foi conduzida numa célula de eletroforese do tipo Mini-Protean II (Bio-Rad), submetida à tensão constante de 200 V. O procedimento de coloração do gel foi realizado com solução de nitrato de prata segundo o protocolo descrito por MORRISSEY (1981).

#### **4.3.5- Reação de Hidrólise Enzimática das Amostras Purificadas**

O protocolo para reação de hidrólise enzimática com amostras purificadas foi composto por 2 mL de inulina (4%) em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0) e 1 mL da solução enzimática. Sendo que, a reação ocorreu após 1 hora, em banho maria, submetida à temperatura de 50 °C e interrompida por precipitação utilizando 150  $\mu$ L de hidróxido de bário (0,33 N) e seguido de 150  $\mu$ L de sulfato de zinco(5%). O precipitado formado foi separado por centrifugação a 10000 rpm por 15 min. O sobrenadante, contendo os açúcares formados, foi coletado e analisado por cromatografia líquida.

##### **4.3.5.1 - Análise Cromatográfica dos Açúcares**

Utilizou-se da análise cromatográfica em HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) em coluna Phenomenex Rezex RSO Oligosaccharide para identificação

dos produtos formados através da hidrólise enzimática. A coluna Rezex RSO Oligosaccharide utilizada possui as características com dimensões 200 x 10 mm, fase estacionária à base de sílica, operada no fluxo volumétrico de 0,4 mL com a fase móvel água e temperatura de 85 °C.

A identificação dos açúcares formados foi comparado com a mistura do padrão NeoSugar S, sacarose e frutose (32,04 - 39,76 - 28,20 %). O padrão NeoSugar S, contém glicose (0,10 %), frutose (0,10%), sacarose (3,6 %), kestose (43,05 %), nistose (45,44 %) e frutossil nistose (7,68%).

#### **4.3.6 - Determinação da Distribuição do Tamanho de Poros e Área dos Adsorventes**

Os adsorventes, utilizados nos processos de adsorção, foram liofilizados previamente para remoção de toda umidade e submetidos ao processo de fisioquimiosorção por adsorção de nitrogênio líquido a 77 K. Utilizando o equipamento Micromeritics ASAP 2000, foi caracterizada a textura dos sólidos, quantificando-se a área total do sólido pelo método de BET (1938) e a distribuição de tamanhos dos poros pelo método BJH descrito em LE PAGE (1987).

#### **4.3.7 - Determinação da Distribuição do Tamanho de Partículas**

A análise de distribuição dos tamanhos das partículas foi possível com a colaboração do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP. Utilizando-se do equipamento modelo Mastersizer S (Malvern), que é baseado no método estático do espalhamento de um feixe luz coerente (laser) sob amostra de partículas, relaciona-se as diversas imagens coletadas aos tamanhos de partículas. O Mastersizer S, opera com recirculação de amostra continuamente perpendicular ao feixe de laser 240 cm de comprimento e faixa operacional entre 0,05 até 3500 µm. As análises polidispersas das partículas dos adsorventes, Accell Plus QMA e CM-Sepharose CL-6B, foram realizadas

numa faixa de concentração (diluição) variando entre 12 a 18% (m/v) e obscuridade aproximada de 20%.

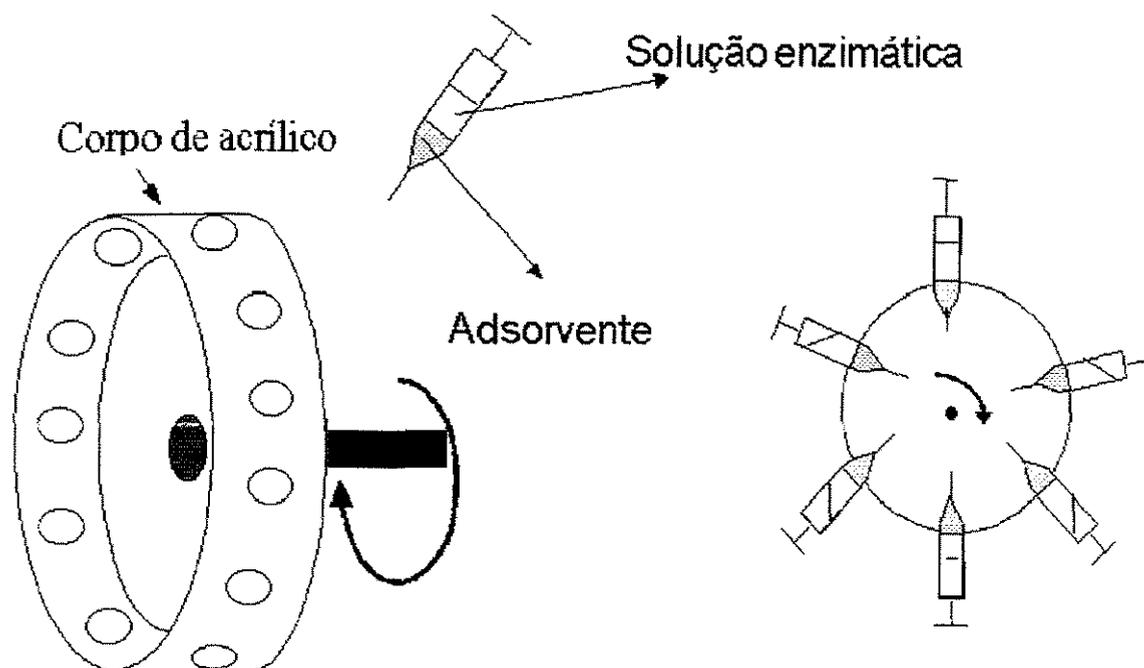
#### 4.4 - Experimentos de Adsorção em Tanques Agitados

Os experimentos de adsorção em tanques agitados são, geralmente, realizados num aparato experimental composto por um sistema de bomba e detetor de ultra-violeta, no qual coloca-se uma solução protéica pura (concentração e volume conhecidos), sob agitação em contato com uma quantidade de adsorvente. A solução circula no sistema e o sinal de absorbância é monitorado ao longo do tempo até que se atinja o equilíbrio de adsorção, como descrito em HORSTMANN e CHASE (1989). Esse sistema tem limitações, pois geralmente necessita de um volume considerável de solução e razoável quantidade de adsorvente. Sendo limitado aos processos que envolvem proteína pura e nos casos das misturas protéicas, a quantificação por absorbância a 280 nm subestima a proteína de interesse. E, também nos processos de adsorção que envolvem enzimas, sempre há necessidade de quantificar a atividade enzimática, que geralmente ocorre através de reações específicas.

Neste sentido, foi desenvolvido um equipamento conforme mostrado na Figura 4.1, composto por corpo cilíndrico em acrílico com orifícios radiais, os quais permitem acoplamento de mini-colunas (seringas) especiais de capacidade máxima de 3 mL e com filtros (inertes) na base, para retenção do adsorvente no interior da mini-coluna. O movimento giratório do sistema promove a agitação entre a solução enzimática (concentração e volume conhecidos) e a massa de adsorvente. A capacidade de adsorção do sólido, é calculada pelo balanço de massa expresso por :

$$q = \frac{(C_0 - C^*)V}{m} \quad (4.1)$$

em que  $q$  é a capacidade de adsorção do adsorvente ( $\text{UA.g}^{-1}$  de resina),  $C_0$  é a concentração inicial da solução enzimática ( $\text{UA.mL}^{-1}$ ),  $C^*$  é a concentração de equilíbrio da solução após adsorção ( $\text{UA.mL}^{-1}$ ),  $V$  volume da solução (mL) e  $m$  é a massa do adsorvente (g). Os experimentos de adsorção foram sempre realizados à temperatura ambiente de  $25\text{ }^\circ\text{C}$  e sob agitação constante de 25 rpm.



**Figura 4.1** – Equipamento giratório utilizado em processo de adsorção em batelada.

#### **4.4.1 - Determinação das Curvas Cinéticas de Adsorção das Inulinases em Experimentos em Tanques Agitados**

O equipamento apresentado na Figura 4.1 foi utilizado na determinação das curvas cinéticas de adsorção nos sistemas enzimas-adsorventes (Inulinases-CM-Sepharose CL-6B e Inulinases-Accel Plus QMA). O procedimento adotado no estudo cinético foi o prévio condicionamento das matrizes sólidas em mini-colunas em condições favoráveis de adsorção (tampão, força iônica e pH).

Os experimentos de cinética de adsorção foram realizados seguindo os passos: (1) Distribui-se quantidades idênticas de adsorventes em várias mini-colunas e adiciona-se o

volume de 2 mL de solução tampão, deixando um certo volume de ar na mini-coluna; (2) Acopla-se as mini-colunas e aciona-se o equipamento; este executará um movimento giratório homogenizando as duas fases (adsorvente e solução tampão); (3) Deixa-se o sistema girando por um tempo determinado (1h), e após este intervalo, coleta-se a solução tampão da mini-coluna e mede-se o pH; caso haja variação na medida do pH, adiciona-se nova solução tamponante e retorna-se o condicionamento; (4) A etapa anterior é repetida quantas vezes necessárias até que não haja variação do pH na solução tamponante; (5) Retira-se a solução tampão e adiciona-se 1 mL de solução enzimática de concentração definida (em unidade de atividade inicial e concentração protéica) em cada mini-coluna; (6) Acopla-se as mini-colunas e aciona-se o equipamento; após intervalos definidos coleta-se as soluções enzimáticas remanescentes não adsorvidas em tubos do tipo Eppendorff®; (7) Faz-se as análises de proteína total e atividade enzimática nas amostras coletadas.

No sistema Inulinases-Accell Plus QMA, trabalhou-se com solução tampão de Tris-HCl distribuídos nas várias mini-colunas e massa constante do adsorvente igual a 25 mg, enquanto que no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B, o condicionamento foi realizado em solução tamponante de acetato de sódio e massa de adsorvente de 100 mg distribuídas nas mini-colunas.

#### **4.4.2 – Determinação de Isotermas de Equilíbrio de Adsorção**

As isotermas de equilíbrio de adsorção dos adsorventes, tanto de atividade das inulinases como de proteína total na solução, foram obtidas através de ensaios do tipo batelada nas condições ótimas de adsorção (tampão, força iônica e pH). Para o sistema inulinases-Accell Plus QMA, utilizou-se uma massa de 25mg de adsorvente nas mini-colunas equilibradas com solução tampão de Tris-HCl e para o sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B, utilizou-se uma massa de 100 mg na coluna de 3 mL e equilibrada com solução tampão de acetato de sódio. O condicionamento dos adsorventes foi similar ao procedimento realizado nos experimentos cinéticos nos passos (1) a (4). Após o condicionamento os seguintes passos foram realizados: (5A) retira-se a solução tamponante e distribui nas mini-colunas 1 ml de solução enzimática de diferentes concentrações iniciais

(unidade de atividade e proteína), suficientes para que se tenha concentrações finais diferentes após atingir o equilíbrio; (6A) Acopla-se as mini-colunas e aciona-se o equipamento, e após o intervalo de equilíbrio (avaliado no estudo cinético), coleta-se as soluções enzimáticas remanescentes não adsorvidas em tubos do tipo Eppendorff®; (7A) Faz-se as análises de atividade enzimática e proteína total nas amostras coletadas.

## 4.5 - Caracterização das Porosidades do Leito de Adsorção e das Partículas dos Adsorventes

A caracterização das porosidades foi possível através da utilização da teoria dos momentos aplicados a distribuição do tempo de residência (DTR) em leito fixo. Os experimentos foram realizados utilizando-se da coluna comercial Pharmacia do tipo HR 5/2 ( $\phi = 0,5$  cm e altura máxima 3 cm) adaptada com dois êmbolos móveis. Os elementos traçadores, acetona (1%) e dextrana 'blue'(0,4%) em solução tampão com 1 M de NaCl, foram detetados nos comprimentos de onda 262 nm (acetona) e 632 nm (dextrana 'blue').

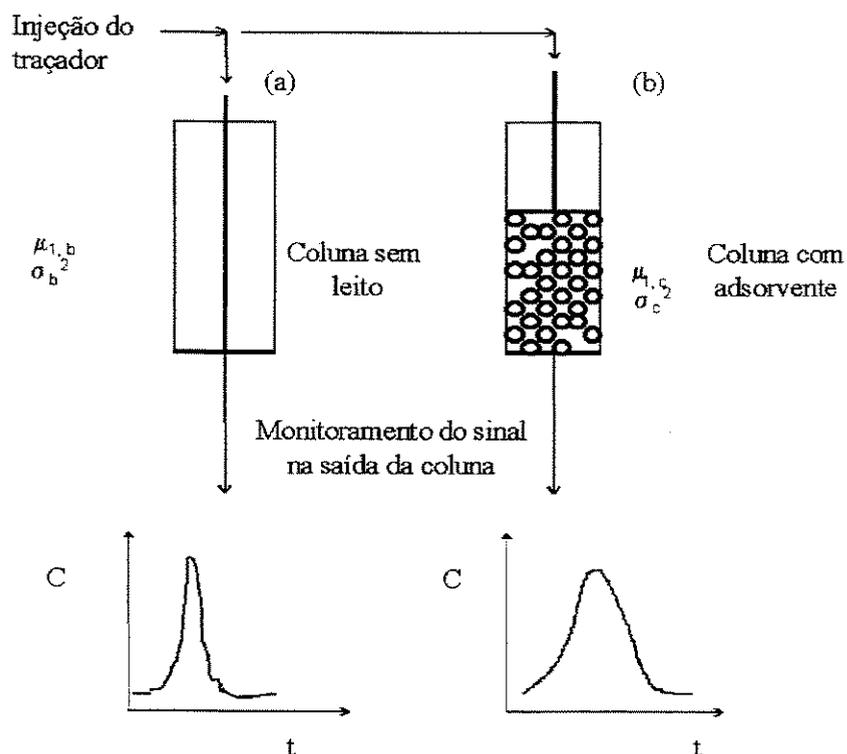
O procedimento para obtenção da distribuição de tempo de residência do traçador, que percola o leito de partículas, foi baseado na aplicação da técnica das duas medidas apresentado na Figura 4.2.

Obtém-se inicialmente a curva de distribuição de tempo de residência do traçador no sistema com a coluna sem o leito de partículas e depois faz-se o experimento contendo o leito de adsorventes. Este procedimento é adotado para excluir todos efeitos que possam trazer um valor incorreto da DTR do traçador, tais como, circuito muito longo, efeitos de parede nas tubulações e o efeito do distribuidor da coluna.

A diferença entre os momentos de 1ª ordem ( $\mu_1$ ) e de 2ª ordem central ( $\sigma^2$ ) obtidos na coluna sem leito e com leito, fornecem o tempo de residência  $t_R$  e a dispersão do traçador ( $\sigma^2_L$ ) no leito.

$$\mu_{1L} = t_R = \mu_{1,c} - \mu_{1,b} \quad (4.2)$$

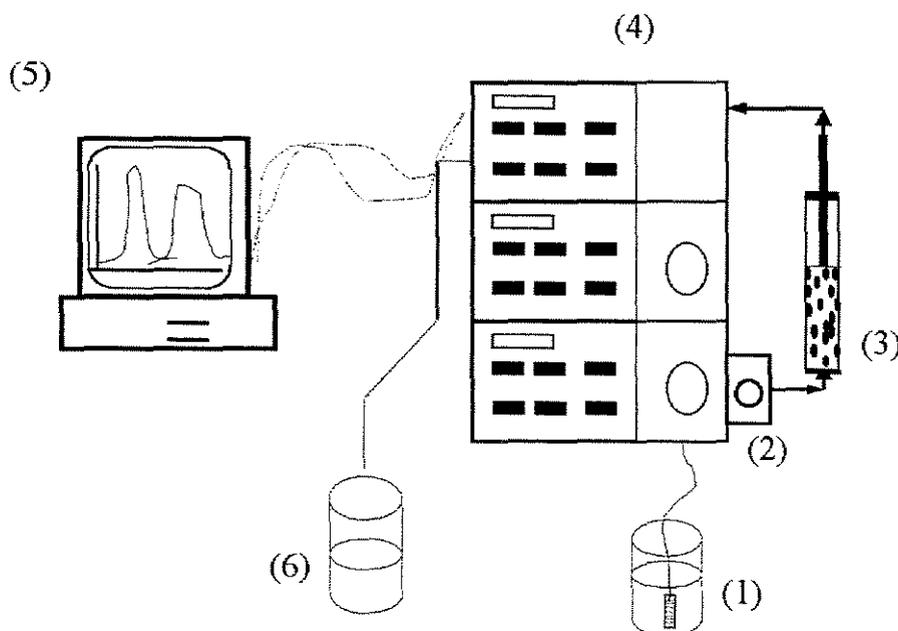
$$\sigma_L^2 = \sigma_{1,c}^2 - \sigma_{1,b}^2 \quad (4.3)$$



**Figura 4.2** - Modo de operação : (a) coluna sem leito, e (b) coluna empacotada com adsorvente.

Os procedimentos experimentais utilizados nas caracterizações das porosidades dos leitos e partículas, foram realizados conforme representado na Figura 4.3. Inicialmente, utiliza-se a coluna no sistema sem leito de partículas e com os pistões encostados (sem nenhum volume morto na coluna). Faz-se fluir pelo sistema um fluxo contínuo de solução tampão com 1 M de NaCl (1), através do bombeamento (4a), com os sistemas de detecção (4c) e registro do microcomputador acionados (5). Injeta-se os traçadores através do

sistema (2) (válvula e “loop” de injeção 200  $\mu$ L) em vazões definidas. Os experimentos são realizados em triplicatas. A injeção da amostra é sincronizada com acionamento para aquisição de dados no microcomputador (5), que registra em arquivo o sinal (mV). O sinal (mV) do pulso traçador, foi monitorado pelo detetor UV-visível (4c), após efluído da coluna (3). Este mesmo procedimento é realizado para os dois traçadores acetona e dextrana “blue” e repetido na coluna com leito de partículas de 2,5 cm para os adsorventes de CM-Sepharose e Accell Plus QMA.



**Figura 4.3** – Esquema utilizado na determinação das porosidades do leito e partículas (1) fase móvel (solução tampão); (2) sistema de injeção (válvula e “loop” de 200 $\mu$ L); (3) coluna de leito fixo; (4) cromatógrafo composto por bombas (4 a,b) e detetor UV-visível (4c); (5) microcomputador com placa aquisitora de sinal e (6) recipiente para descarte de efluente.

Os valores de absorvâncias detetados em (4c) e registrados (mV) no microcomputador, são proporcionais à concentração das amostras injetadas. Assim, o momento de 1ª ordem é expresso da forma abaixo:

$$\mu_1 = \frac{\int_0^{\infty} tC(t)dt}{\int_0^{\infty} C(t)dt} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i C_i}{\sum_{i=1}^n t_i V_i} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i V_i}{\sum_{i=1}^n t_i V_i} \quad (4.4)$$

em que  $\mu_1$  é o momento de 1ª ordem,  $C(t)$  é a concentração de traçador na saída da coluna, no tempo  $t_i$ (s) e o sinal coletado  $V_i$ (mV) medido no detetor UV-vísivel.

Com a aplicação do método das duas medidas, o momento de 1ª ordem no leito é obtido pela Equação (4.2) e, conforme o modelo cromatográfico de ARNOLD et al. (1985) apresentado no Anexo B, tem-se que o momento de 1ª ordem será :

$$\mu_{1L} = \frac{\varepsilon L}{u_0} \left( 1 + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \beta \left( 1 + \frac{\rho_p}{\beta} K_A \right) \right) + \frac{t_0}{2} \quad (4.5)$$

A porosidade do leito de resina é obtida a partir dos dados coletados com pulso do traçador dextrana 'blue' que, por ser uma molécula grande (2000 kDa) não penetra nos poros das partículas, e não é adsorvida devido à condição imposta pela solução tampão 1 M NaCl. Logo, a constante de adsorção  $K_A = 0$  e, devido ao tamanho da molécula, a porosidade da partícula é virtualmente nula ( $\beta=0$ ). Desta forma, a expressão para o momento de 1ª ordem do leito na Equação (4.5), é reduzida para :

$$\mu_{1L} - \frac{t_0}{2} = \frac{L}{u_0} \varepsilon \quad (4.6)$$

A Equação (4.6), representa uma equação linear, cuja inclinação é a própria porosidade do leito ( $\varepsilon$ ). A porosidade da partícula é obtida com a utilização de outro traçador (acetona), que é uma molécula menor e assim penetra pelos poros da partícula. A aplicando as novas condições do traçador, a Equação (4.5) é formulada como:

$$\mu_{1L} - \frac{t_0}{2} = \frac{L}{u_0} (\varepsilon + (1 - \varepsilon)\beta) \quad (4.7)$$

A Equação (4.7) representa uma equação linear com inclinação  $(\varepsilon + (1 - \varepsilon)\beta)$ , sendo que a porosidade da partícula ( $\beta$ ) é obtida com o valor da porosidade do leito ( $\varepsilon$ ) conhecido da Equação (4.6).

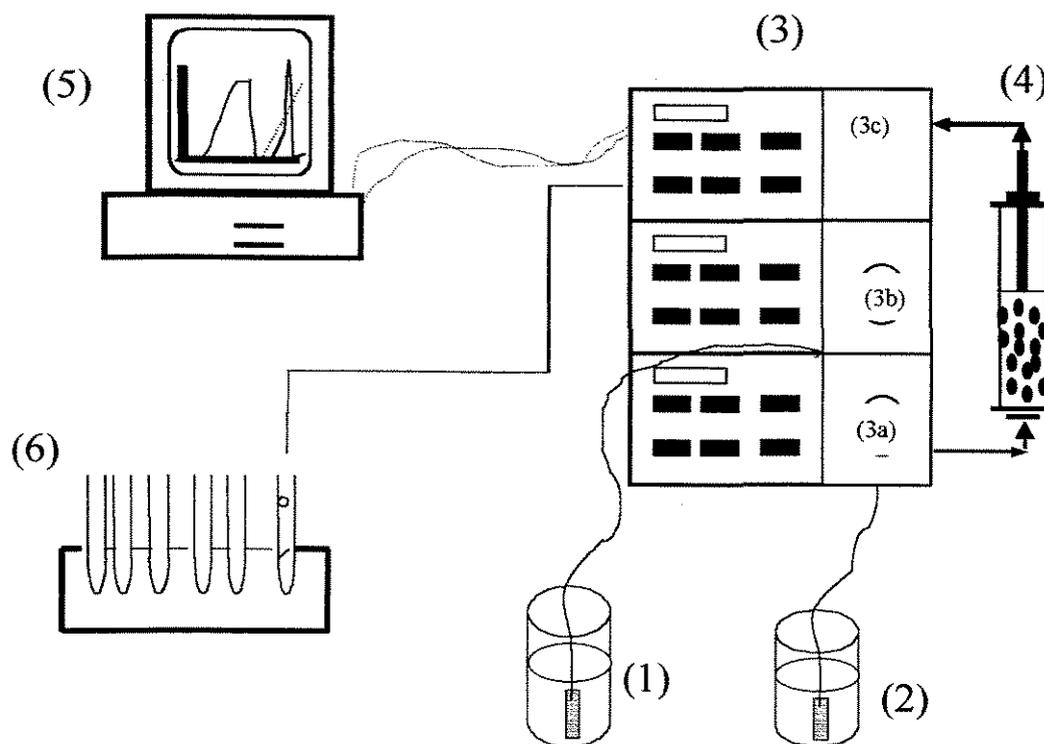
## 4.6 - Experimentos de Adsorção em Leito Fixo

Os experimentos de adsorção por cromatografia em leito fixo foram realizados em colunas comerciais da Pharmacia dos tipos HR 5/2, 5/10 e C 10/20 construídas em vidro de alta resistência. Os ensaios que envolveram o sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B foram realizados nas colunas HR 5/10, C 10/20 e no sistema Inulinases-Accell Plus QMA utilizou-se a coluna HR 5/2.

Condicionam-se os adsorventes nas colunas com solução tampão e recomenda-se a lavagem do adsorvente até que não haja variação no pH do efluente. Geralmente, os catálogos dos adsorventes fornecem informações sobre o procedimento. Neste trabalho o equilíbrio foi realizado com cerca de 10 a 15 volumes do leito com solução tampão.

A operação de adsorção foi realizada através da alimentação contínua de solução enzimática de concentração definida (unidades de atividade inicial e proteína total), pelo procedimento de operação em leito fixo, representado na Figura 4.4.

Na Figura 4.4, o índice (1) representa o recipiente contendo a solução enzimática, que é transportada por bomba tipo pistão (3a). A bomba faz a solução percolar pela coluna (4), a qual contém a resina trocadora de íons. A saída da coluna é monitorada por um detetor de luz ultravioleta (3c) no comprimento de onda 280 nm, que está acoplado a um microcomputador com uma placa aquisitora de sinal (5) e descarta o efluente coletando continuamente amostras no coletor de frações (6).



**Figura 4.4** – Esquema experimental para operação de adsorção por cromatografia frontal: (1) e (2) recipientes; (3) conjunto de bombas (3a), (3b) e detector de luz visível-ultravioleta (3c); (4) coluna cromatográfica; (5) microcomputador com placa aquisitora de sinais e (6) coletor de frações.

Após atingida a saturação do leito de adsorventes, executa-se o procedimento de lavagem com objetivo de remoção das proteínas que foram fracamente adsorvidas e estão presentes na solução enzimática. Faz-se percolar pela coluna o fluxo constante e idêntico ao processo da solução tamponante até que o sinal monitorado pelo detector retorne à linha de base.

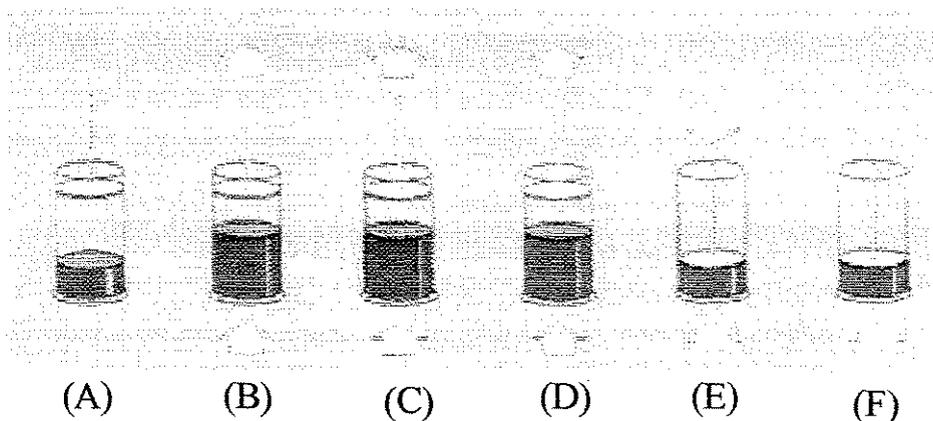
Em seguida, a eluição é feita por gradiente linear salino (0-1M NaCl), misturando as soluções contidas nos recipientes (1) e (2). O processo é realizado admitindo continuamente a solução tamponante no recipiente (1) e a solução tamponante com 1 M NaCl através da bombas (3a e 3b), de acordo com a Figura 4.4, que são homogêneas e seguem percolando o leito de adsorvente. Devido à crescente força iônica imposta pelo gradiente linear, os contra-íons são trocados e a enzima adsorvida é eluída pela coluna (4) e

detetada em (3c), sendo registrada pelo microcomputador (5). As amostras, contendo a(s) enzima(s) eluída(s), são coletadas em (6).

As amostras coletadas nos procedimentos de adsorção, lavagem e eluição, são quantificadas por análise de proteína total (método Lowry) e atividade enzimática (método de açúcar redutor com DNS).

## 4.7 - Adsorção em Leito Expandido

A adsorção por cromatografia em leito expandido foi realizada para o sistema Inulinases-Accell-Plus QMA na coluna modelo C 10/20. As diversas etapas envolvidas na operação de expansão do leito são apresentadas conforme Figura 4.5.



**Figura 4.5-** Etapas envolvidas em operações de adsorção em leito expandido (A) adsorvente sedimentado; (B) equilíbrio (leito expandido); (C) aplicação da amostra; (D) lavagem (leito expandido); (E) eluição e (F) regeneração em leito fixo (Pharmacia 1998).

Utilizando-se do esquema apresentado na Figura 4.4, obtém-se os perfis cromatográficos de adsorção, lavagem e eluição em unidades de atividade enzimática e proteína total no sistema inulinases-Accell Plus QMA.

O procedimento de adsorção, lavagem, eluição e regeneração ocorre conforme as etapas apresentadas na Figura 4.5. (A) o adsorvente está sedimentado no interior da coluna, após prévio condicionamento nas condições favoráveis da solução tampão (pH e força iônica); (B) atinge-se a expansão desejada através do bombeamento contínuo de solução tamponante (ver esquema da Figura 4.4) e por fim desloca-se o pistão da coluna até a altura estabelecida; (C) aplica-se continuamente a solução enzimática, que percola o leito expandido, conforme o procedimento descrito no item 4.6 e apresentado na Figura 4.4, sendo monitorada pelo detetor (3c) e o perfil de adsorção é registrado no microcomputador (5), com as diversas frações coletadas no coletor (6); (D) A lavagem é realizada por aplicação da solução tampão com o leito expandido; (E) processo de eluição em gradiente linear é realizado em leito fixo. Na etapa (F) tem-se a regeneração do leito de partículas.

## CAPÍTULO 5

### 5. - Resultados e Discussões: Adsorção e Modelagem Matemática

A modelagem matemática é de grande importância no desenvolvimento de técnicas que representem os processos de adsorção em tanques agitados (batelada) ou em colunas. A Figura 5.1 apresenta o fluxograma de informações necessárias na predição do comportamento dos processos de adsorção.

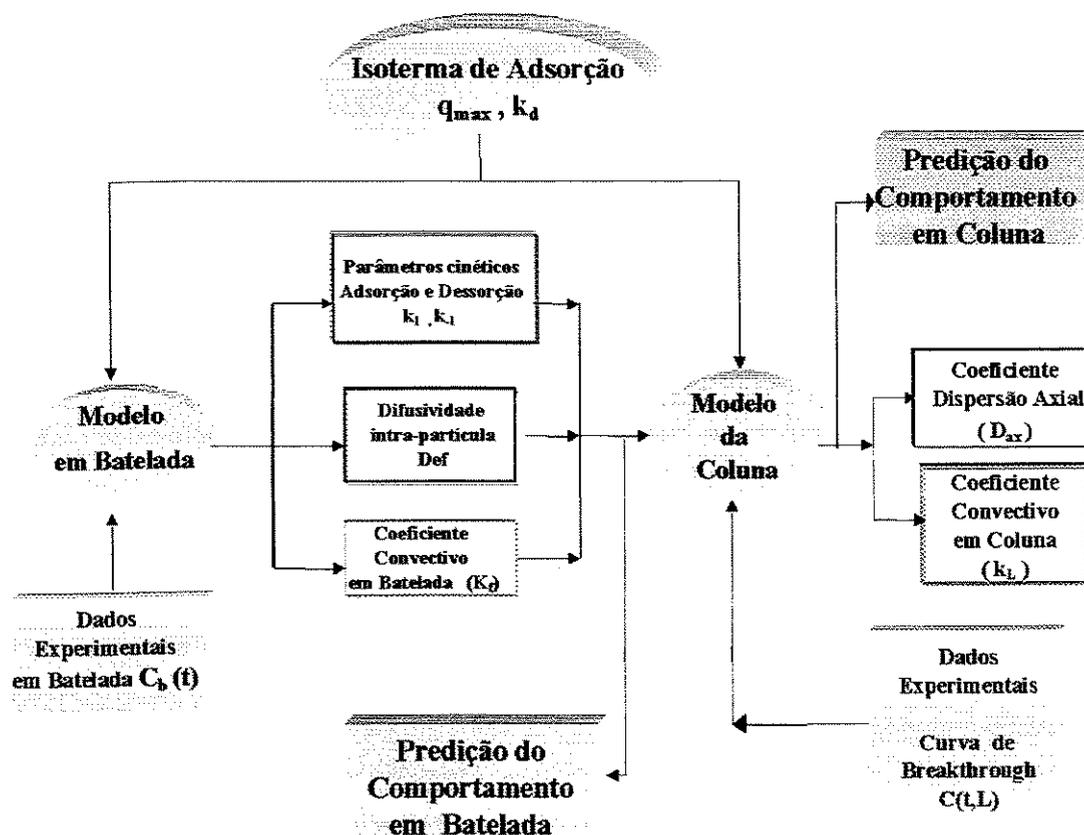


Figura 5.1 - Fluxograma de informações dos processos de adsorção em tanque agitados e colunas de adsorção.

Os dados experimentais dos processos de adsorção em tanques agitados, isoterma de equilíbrio e curvas cinéticas interagem para formulação do modelo simplificado que avalia os parâmetros cinéticos de adsorção e dessorção. Como também o modelo completo, que avalia os parâmetros de transferência de massa, representados pelos coeficientes de difusividade efetiva nos poros e convectivo de massa no filme de líquido. A predição do comportamento em colunas de adsorção em leitos fixo ou expandido é obtida através do conhecimento da isoterma de equilíbrio, dados experimentais das curvas de saturação e as informações provenientes do modelo de adsorção em tanques agitados (batelada). Apresenta-se no fluxograma da Figura 5.1 as diversas interações entre os dados experimentais obtidos e os modelos matemáticos aplicados aos processos de adsorção.

## **5.1. – Caracterização dos Adsorventes**

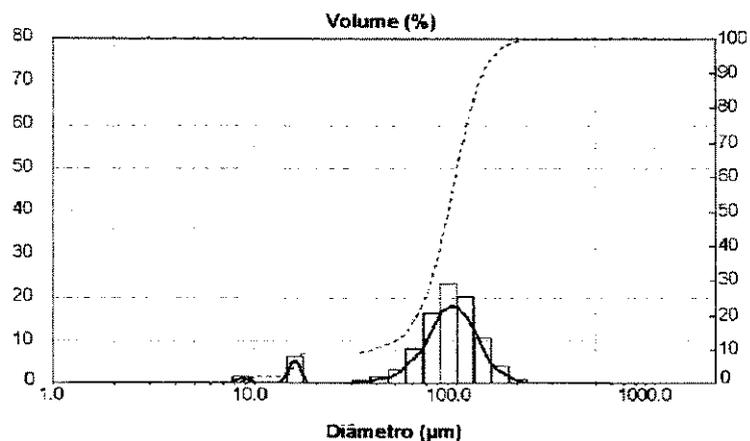
### **5.1.1 - Propriedades Físicas: Área Superficial e Distribuição de Tamanhos de Poros**

Os adsorventes CM-Sepharose CL-6B e Accell Plus QMA foram submetidos a secagem por liofilização para remoção da água presente nos sólidos. O adsorvente CM-Sepharose CL-6B não resistiu ao processo de liofilização, tendo a estrutura colapsada neste processo, e quando submetido aos ensaios de caracterização por fisio-quimissorção apresentou valores não consistentes. Quanto ao adsorvente Accell Plus QMA, que possui uma estrutura mais rígida, com base de sílica, suportou o pré-tratamento por liofilização.

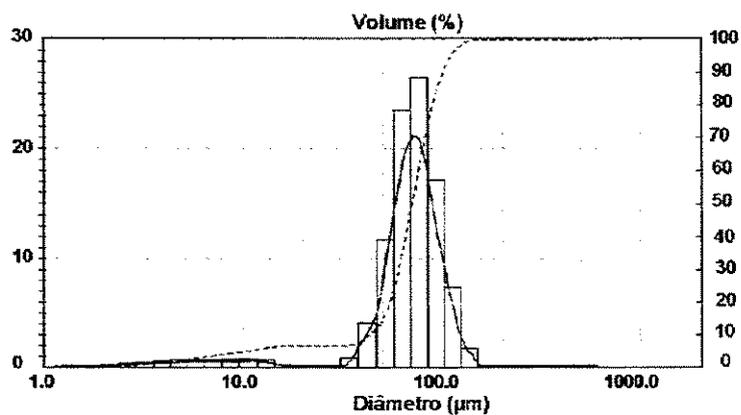
O adsorvente Accell Plus QMA apresentou uma área total em torno de  $67 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  calculado pelo método de BET (1938) e a curva de distribuição de poros apresentou o diâmetro médio de 35 nm, sendo avaliado pelo método de BJH, descrito em Le PAGE (1987) e apresentado no Anexo C.

Os adsorventes CM-Sepharose CL-6B e Accell Plus QMA também foram caracterizados quanto ao tamanho de partículas. As curvas de distribuição do tamanho de partículas foram obtidas pela técnica de espalhamento de luz (laser) no equipamento Mastersizer S (Malvern). Ambos os ensaios apresentaram uma distribuição polidispersa,

cujos diâmetros médios foram de 90  $\mu\text{m}$  para o adsorvente CM-Sepharose CL-6B e de 100  $\mu\text{m}$  para o Accell Plus QMA. As curvas de distribuição de tamanhos, Figuras 5.2 e 5.3, apresentam valores médios concordantes aos obtidos pelos fabricantes.



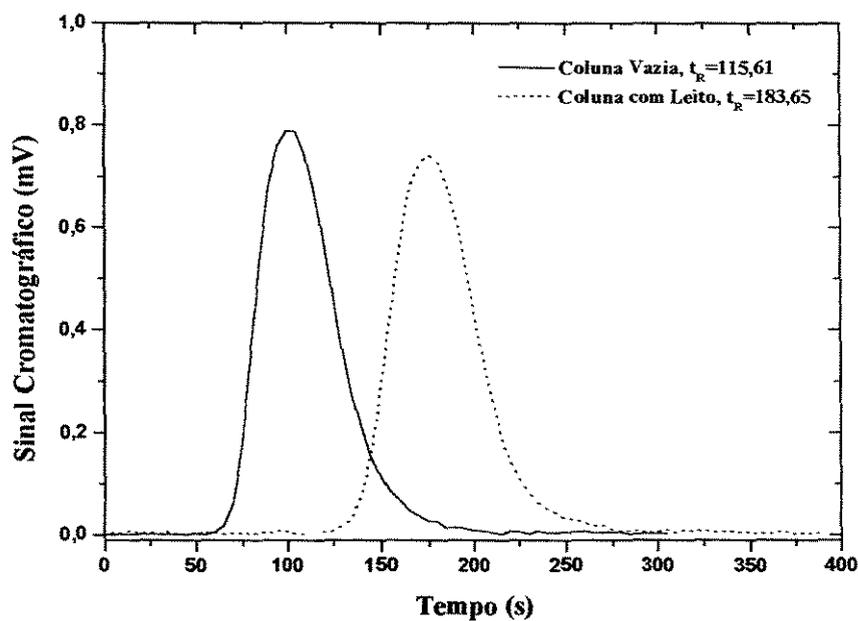
**Figura 5.2-** Curva de distribuição do tamanho de partículas, CM-Sepharose CL-6B.



**Figura 5.3-** Curva de distribuição de tamanho de partículas, Accell Plus QMA.

### 5.1.2 - Caracterização das Porosidades do Adsorvente e dos Leitos por Análise da Distribuição do Tempo de Residência

Os valores das porosidades das partículas e de um leito de partícula nos adsorventes CM-Sepharose CL-6B e Accell Plus QMA foram obtidos através da análise dos momentos da distribuição do tempo de residência (DTR), utilizando-se da técnica de análise pulso-resposta por injeção dos traçadores acetona e dextrana 'blue'. Os experimentos foram realizados na coluna HR 5/2( $\phi = 0,5$  cm) com o leito de partículas de altura  $h=2,5$  cm. A metodologia experimental adotada na análise da distribuição do tempo de residência foi baseada na utilização da técnica das duas medidas. O procedimento experimental encontra-se descrito no Capítulo 4 (item 4.5), o sinal (mV) foi monitorado pelo detetor UV-visível, após injeção de um traçador como exemplificado na Figura 5.4.

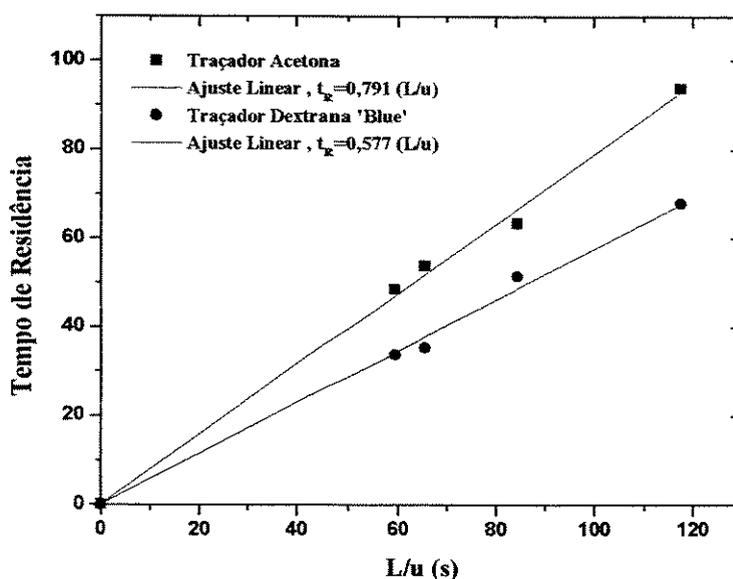


**Figura 5.4** - Curvas de distribuição do tempo de residência (DTR), usando traçador acetona no leito de  $h = 2,5$  cm com adsorvente Accell Plus QMA e fluxo volumétrico de  $0,35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

O modelo matemático, apresentado no Anexo B, foi utilizado para correlacionar os dados experimentais de distribuição do tempo de residência no leito de partículas com

a utilização dos traçadores acetona e dextrana ‘blue’, contendo 1M de NaCl. Esta condição é necessária para garantir que não haja adsorção irreversível dos traçadores no leito das partículas e que sejam totalmente eluídos na saída da coluna.

Na Figura 5.5 foram plotados os dados experimentais obtidos para o momento de 1ª ordem (tempo de residência) relativo ao leito do adsorvente CM-Sepharose CL-6B para os dois traçadores, bem como o ajuste do modelo.



**Figura 5.5** - Dados experimentais e ajuste linear da equação do modelo aplicada a distribuição do tempo de residência (DTR), utilizando-se os traçadores acetona e dextrana ‘blue’ no leito de CM-Sepharose CL-6B.

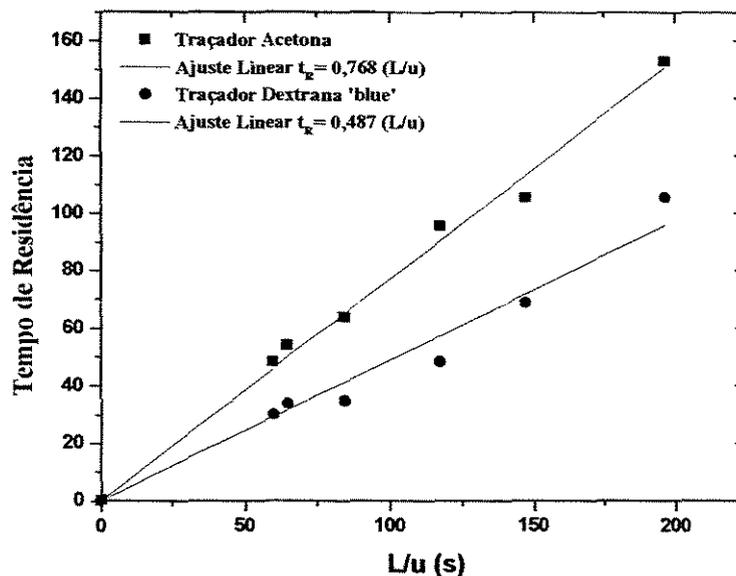
Os modelos ajustados aos dados experimentais para os tempos de residência no leito dos adsorventes com os traçadores acetona e dextrana ‘blue’ foram os seguintes:

$$t_R = 0,557 \cdot \left( \frac{L}{u} \right) \quad (5.1)$$

$$t_R = 0,791 \cdot \left( \frac{L}{u} \right) \quad (5.2)$$

Na Equação (5.1), tem-se o ajuste aos dados referentes ao traçador dextrana 'blue', onde a inclinação da reta representa a porosidade do leito,  $\varepsilon=0,557$ . Na Equação (5.2) a inclinação da reta é representada pela relação  $(\varepsilon + (1 - \varepsilon)\beta)$  nos experimentos com traçador acetona, logo por substituição do valor da porosidade do leito ( $\varepsilon=0,557$ ), tem-se a porosidade da partícula  $\beta=0,501$ .

Na Figura 5.6 estão plotados os dados experimentais dos tempos de residência dos dois traçadores, bem como o ajuste do modelo, para o adsorvente Accell Plus QMA.



**Figura 5.6** - Dados experimentais e ajuste linear da equação do modelo aplicada a distribuição do tempo de residência (DTR), utilizando-se os traçadores acetona e dextrana 'blue' no leito de Accell Plus QMA.

O ajuste obtido com os dados experimentais dos tempos de residência no leito do adsorvente Accell Plus QMA, com o traçador dextrana 'blue', é apresentado na Equação (5.4), cuja a inclinação representa a porosidade do leito,  $\varepsilon=0,487$ .

$$t_R = 0,487 \cdot \left( \frac{L}{u} \right) \quad (5.4)$$

$$t_R = 0,768 \cdot \left( \frac{L}{u} \right) \quad (5.5)$$

No traçador acetona, tem-se a expressão dada pela Equação (5.5), em que a inclinação  $(\varepsilon + (1 - \varepsilon)\beta) = 0,768$  e por conseguinte a porosidade da partícula  $\beta = 0,53$ .

### 5.1.3 - Estudo do Fator de Fluidização (Expansão) no Adsorvente Accell Plus QMA

O estudo da fluidização (expansão) no leito de partículas, com o adsorvente Accell Plus QMA, foi realizado utilizando-se a coluna da Pharmacia® modelo C10/20 ( $\phi = 1,0$  cm) a partir de uma altura inicial de 20,0 mm de leito. Na Figura 5.7, estão plotados os dados experimentais obtidos na expansão e o modelo linear ajustado aos mesmos.

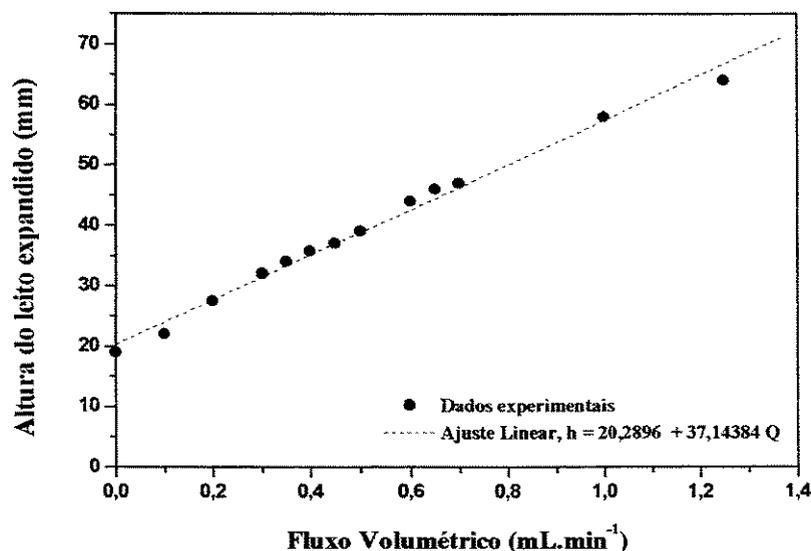


Figura 5.7 - Curva de expansão do leito para o adsorvente Accell Plus QMA.

Observa-se, no gráfico apresentado na Figura 5.7, que a altura do leito de resina varia linearmente com fluxo volumétrico e o valor máximo na expansão do leito é cerca

de 3,4 vezes em relação a altura inicial ( $h=20,0$  mm), correspondendo ao fluxo volumétrico de  $1,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

No processo que envolve a operação de expansão, as partículas fluidizam de forma que a porosidade do leito aumenta. Esta porosidade pode ser relacionada pela Equação (5.6), com a porosidade do leito sedimentado através do grau de expansão entre as alturas inicial (leito sedimentado) e final do leito expandido.

$$\frac{H_F}{H_o} = \frac{1 - \epsilon_o}{1 - \epsilon_{ex}} \quad (5.6)$$

em que  $H_F$  é altura do leito expandido,  $H_o$  é altura inicial do leito sedimentado,  $\epsilon_o$  é a porosidade do leito sedimentado e  $\epsilon_{ex}$  é a porosidade do leito após a expansão.

Como a porosidade da partícula é conhecida para o adsorvente Accell Plus QMA, através da aplicação da análise de distribuição do tempo de residência na coluna HR 5/2, a porosidade de qualquer leito com este adsorvente pode ser obtida através da análise dos momentos utilizando o traçador acetona (contendo 1M de NaCl) e conjunto com o modelo apresentado no Anexo B.

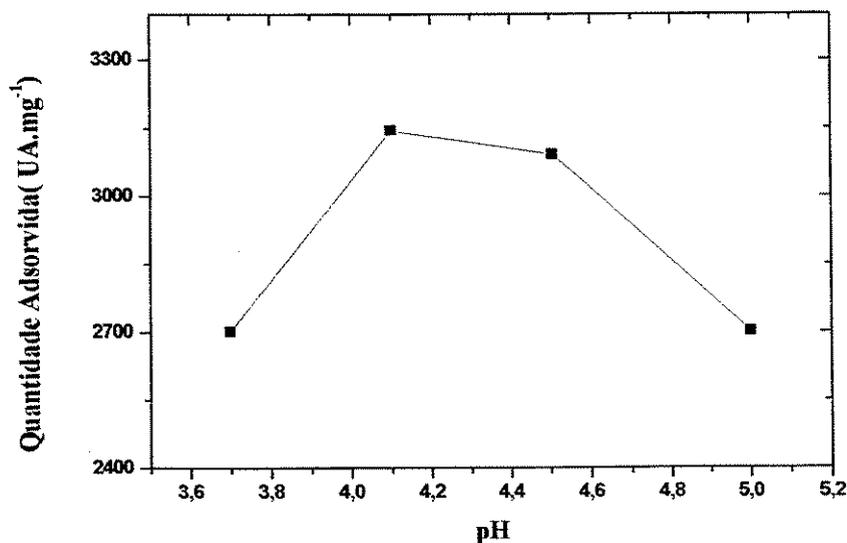
## 5.2. - Experimentos de Adsorção em Tanques Agitados

### 5.2.1 – Estudo do Efeito do pH na Adsorção de Inulinasas

Foi realizado inicialmente o estudo do efeito do pH, para verificar em que condição ocorre a máxima capacidade de adsorção, nos sistemas Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B e Inulinasas-Accell Plus QMA. Os experimentos foram realizados no dispositivo giratório com mini-colunas à temperatura ambiente de  $25^\circ\text{C}$  e rotação em torno 25 rpm. Nos sistemas estudados, foram utilizados as quantidades de 100 mg do adsorvente e concentração enzimática de  $83 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$  em tampão acetato de sódio 10mM no adsorvente CM-Sepharose CL-6B. Já as condições para o adsorvente Accell Plus

QMA, foram a massa de 30 mg e concentração enzimática de  $40 \text{ UA. mL}^{-1}$  em solução tampão Tris-HCl 30 mM.

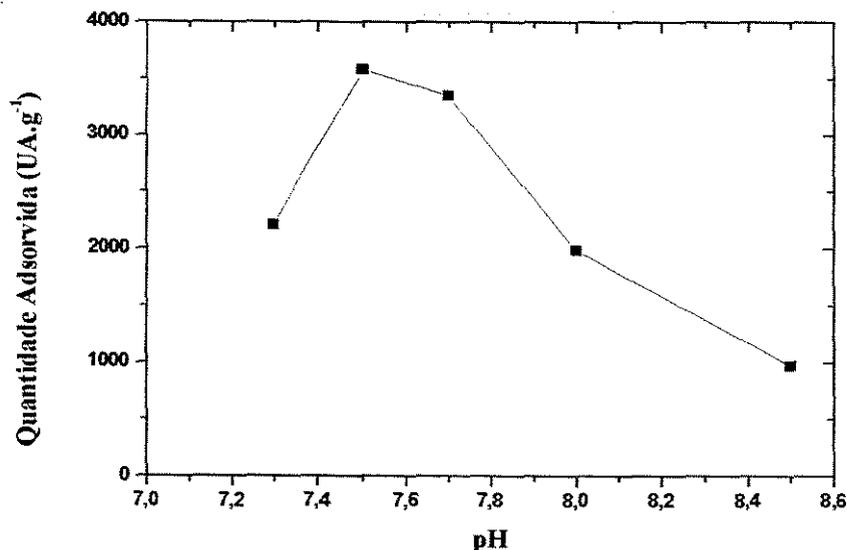
Os valores da capacidade de adsorção em unidades de atividade enzimática no adsorvente CM-Sepharose CL-6B, operando na faixa do tampão pH (3,7-5,0), são apresentadas na Figura 5.8.



**Figura 5.8** - Capacidade de adsorção do adsorvente CM-Sepharose CL-6B.

A Figura 5.8 apresentou o ponto de máxima capacidade de adsorção em torno do  $\text{pH} = 4,1$  no adsorvente CM-Sepharose CL-6B, nas condições de temperatura e força iônica utilizadas.

Apresenta-se na Figura 5.9, os dados de capacidade de adsorção em unidades de atividade enzimática por massa de adsorvente para Accell Plus QMA na faixa de pH do tampão Tris-HCl (7,0 a 8,5). O valor máximo da capacidade de adsorção foi obtido em torno do  $\text{pH} = 7,5$ .



**Figura 5.9** - Capacidade de adsorção do adsorvente Accell Plus QMA.

Desta forma, os experimentos de adsorção em tanques agitados, cinéticos e de equilíbrio, e como também nas operações que envolvem a adsorção em colunas de leito fixo e fluidizado foram executadas nas condições favoráveis de adsorção para os sistemas: Inulinases-CM-Sepharose CL-6B em solução tampão acetato de sódio (10mM, pH = 4,1) e Inulinases-Accell Plus QMA em tampão Tris-HCl (30 mM, pH = 7,5).

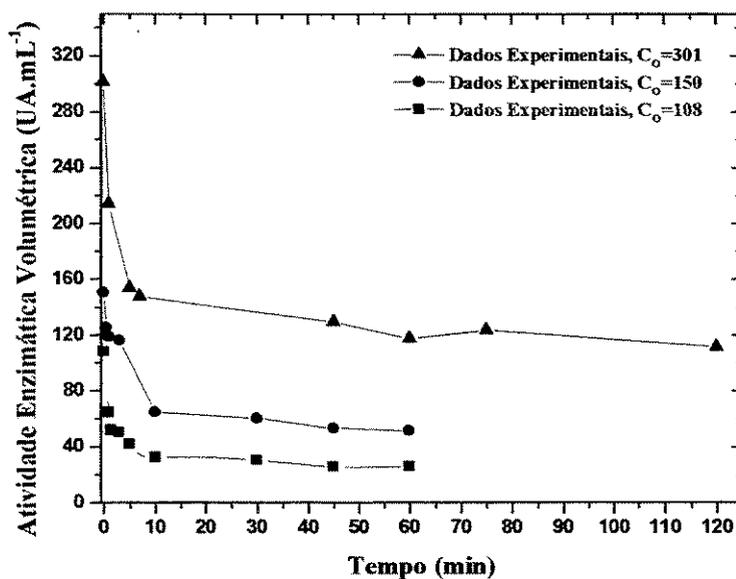
## 5.2.2 - Determinação das Curvas Cinéticas de Adsorção para Inulinases

O comportamento cinético da adsorção nos sistemas Inulinases-CM-Sepharose CL-6B e Inulinases-Accell Plus QMA foram realizados através da metodologia experimental em tanques agitados, descrito no Capítulo 4 (item 4.4.1).

As curvas cinéticas de adsorção no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B foram realizadas para três valores iniciais: 301, 150 e 108 UA.mL<sup>-1</sup> de atividade enzimática volumétrica de Fructozyme<sup>®</sup>, sendo as soluções enzimáticas condicionadas em solução tampão de acetato de sódio (10 mM, pH 4,1) com a utilização das mini-

colunas com as quantidades de 100 mg do adsorvente submetidas à agitação constante de 25 rpm e a 25 °C .

O comportamento das curvas cinéticas de adsorção em tanques agitados é apresentado na Figura 5.10. Observou-se um decaimento acentuado na atividade enzimática nos primeiros instantes e, após cerca de 10 minutos, a variação na atividade enzimática diminui suavemente até atingir um valor constante após 60 minutos.



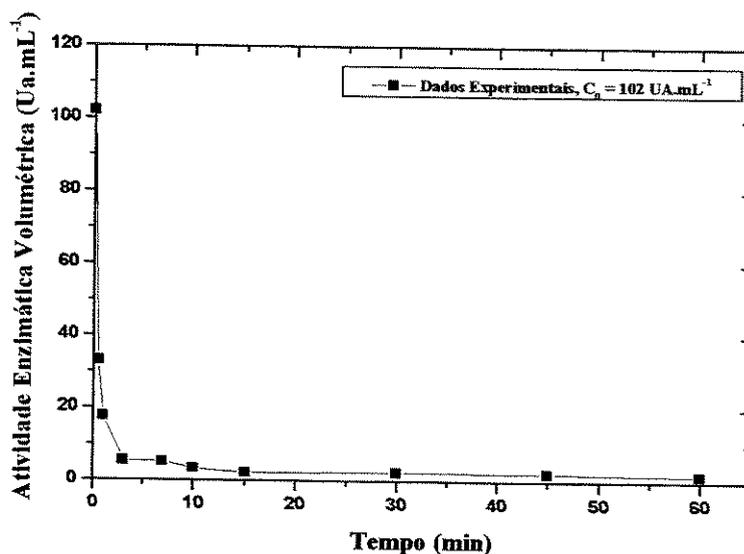
**Figura 5.10** - Curvas cinéticas de adsorção no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B.

Encontrou-se na literatura o mesmo tipo de comportamento cinético de adsorção em tanque agitado. Os autores utilizaram substâncias puras (proteínas), como na adsorção de imunoglobulina G em Superose C, no trabalho descrito por HORSTMANN e CHASE (1989), e a adsorção de cefalosporina C em resinas poliméricas de fase reversa por FIROUTZTALE (1994).

No sistema Inulinases-Accell Plus QMA, os estudos cinéticos de adsorção em tanques agitados foi realizado com soluções enzimáticas de Fructozyme® em solução tampão de Tris-HCl (30 mM, pH 7,5) distribuídas em mini-colunas contendo uma massa constante de 25 mg do adsorvente à temperatura ambiente de 25°C e agitação de 25 rpm.

A quantidade de adsorvente foi definida após prévios testes de adsorção em batelada, pois a capacidade de adsorção da Accell Plus QMA é bem superior comparada ao adsorvente catiônico CM-sepharose CL-6B.

Os comportamentos das curvas cinéticas de adsorção em tanques agitados no sistema Inulinases-Accell Plus QMA estão apresentadas nas Figuras 5.11, 5.12 e 5.13.



**Figura 5.11** - Curva cinética de adsorção no sistema Inulinases-Accell Plus QMA em atividade enzimática volumétrica,  $C_0 = 102 \text{ UA. mL}^{-1}$ .

É observado pelo comportamento da curva que o poder de adsorção da resina Accell Plus é bem superior ao do adsorvente catiônico CM-Sephrose CL-6B, isto é, em alguns instantes (segundos) ocorre a redução da atividade enzimática volumétrica no valor superior a 50%, e o equilíbrio cinético de adsorção é atingido a partir de 10 minutos.

Comportamento semelhante também foi observado em experimentos com substâncias puras dissolvidas em solução tampão, como na adsorção de BSA em ARAÚJO (1996) e na adsorção de solução de Insulina em CRUZ (1997), utilizando o mesmo adsorvente.

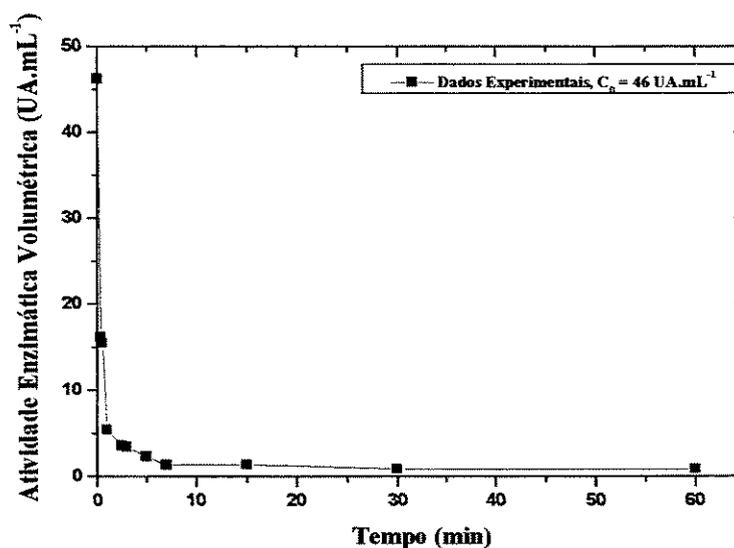


Figura 5.12 - Curva cinética de adsorção no sistema Inulinases-Accell Plus QMA em atividade enzimática volumétrica  $C_0 = 46 \text{ UA. mL}^{-1}$ .

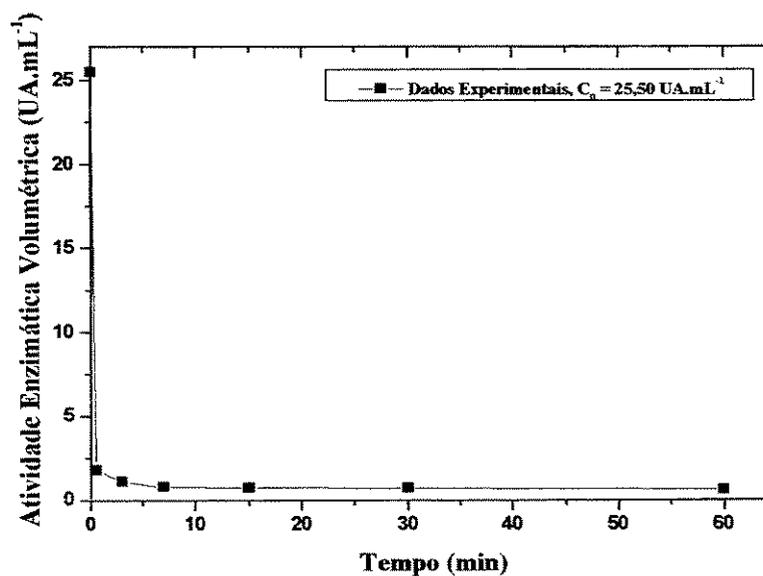
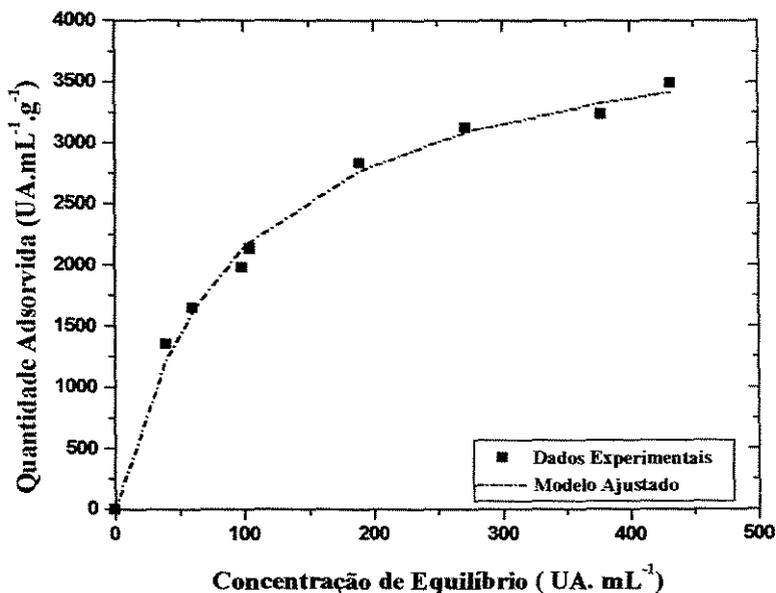


Figura 5.13 - Curva cinética de adsorção no sistema Inulinases-Accell Plus QMA em atividade enzimática volumétrica  $C_0 = 25,50 \text{ UA. mL}^{-1}$ .

### 5.2.3 - Determinação das Isotermas de Equilíbrio de Adsorção

Os sistemas Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B e Inulinasas-Accell Plus QMA foram submetidos aos ensaios de adsorção em batelada para obtenção das isotermas de equilíbrio, conforme procedimento descrito no Capítulo 4 (item 4.4.2). Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente de 25 °C e rotação em torno 25 rpm. O sistema Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B foi composto por diversas concentrações de soluções enzimáticas de Fructozyme® em solução tampão de acetato de sódio (10 mM, pH 4,1) e distribuídas em mini-colunas contendo 100 mg do adsorvente. As atividades enzimáticas iniciais foram suficientes para que ainda restasse solução enzimática não adsorvida. A concentração de equilíbrio de adsorção foi atingida após 1h de experimentos. A Figura 5.14 apresenta a isoterma de adsorção para o sistema Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B, sendo que os dados experimentais foram ajustados ao modelo de LANGMUIR (1916).



**Figura 5.14** - Isoterma de equilíbrio de adsorção em atividade enzimática no sistema Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B, à temperatura de 25°C e 25 rpm.

Os dados experimentais apresentados na Figura 5.14 foram ajustados ao modelo de isoterma não-linear proposto por LANGMUIR (1916):

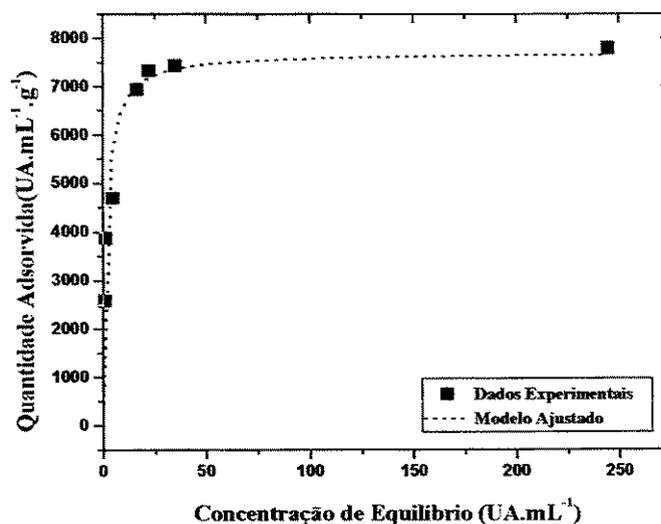
$$q = \frac{q_{\max} C^*}{k_d + C^*} \quad (5.7)$$

em que  $q$  é a quantidade de enzima adsorvida no adsorvente ( $\text{UA} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ),  $C^*$  é a concentração enzimática em solução ( $\text{UA} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $q_{\max}$  é a capacidade máxima do adsorvente ( $\text{UA} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) e  $k_d$  é a constante de dissociação ( $\text{UA} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

O modelo de LANGMUIR (1916) se ajustou bem aos dados experimentais para o sistema Inulinase-CM Sepharose CL-6B, sendo que os valores dos parâmetros foram obtidos por ajuste não-linear e correlação  $R^2=0,96$ . Os parâmetros da isoterma de equilíbrio foram: capacidade máxima do adsorvente  $q_{\max}= 4165,69 \text{ UA mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  e constante de dissociação  $k_d=94,80 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Nos experimentos de equilíbrio de adsorção para o sistema Inulinas-Accell Plus QMA, as soluções enzimáticas de Fructozyme<sup>®</sup> foram condicionadas em solução tampão de Tris-HCl (30 mM, pH 7,5) e distribuídas em mini-colunas contendo no máximo 25 mg do adsorvente.

A isoterma de adsorção para Accell Plus QMA é apresentada na Figura 5.15.



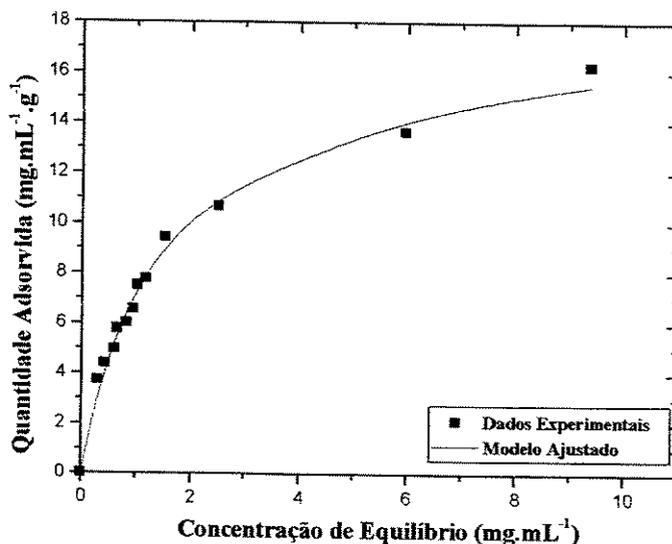
**Figura 5.15** - Isoterma de equilíbrio de adsorção em atividade enzimática no sistema Inulinas-Accell Plus QMA, à temperatura de 25 °C e 25 rpm.

O perfil da isoterma obtido no sistema Inulinases-CM-Sepharose foi semelhante ao perfil da isoterma de inulinase produzida por *Candida kefyr* em Streamline DEAE e Streamline SP, obtido por PESSOA et al. (1996). Diferenciando dos valores nos parâmetros da isoterma na Streamline DEAE ( $q_{\max} = 4,5 \cdot 10^{-6} \text{ UA mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $k_d = 3,5 \cdot 10^{-8} \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e Streamline SP ( $q_{\max} = 5,3 \cdot 10^{-6} \text{ UA mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $k_d = 14,0 \cdot 10^{-8} \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

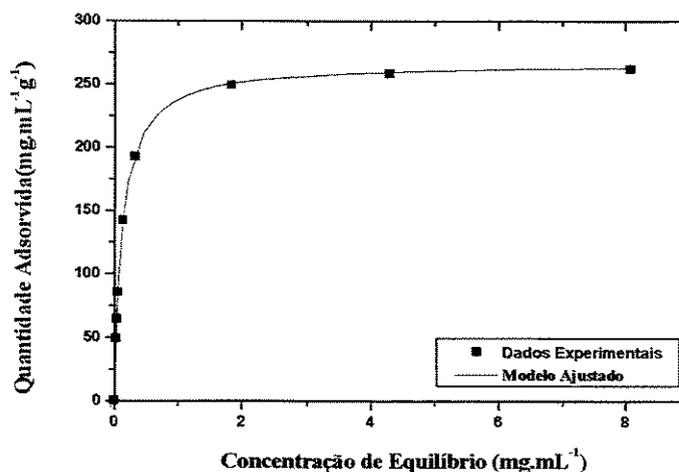
Os dados experimentais, na isoterma de adsorção de equilíbrio, apresentaram um comportamento quase retangular, caracterizado pela grande capacidade de adsorção da Accell Plus QMA. Este comportamento também foi evidenciado na adsorção de substâncias puras diluídas em tampão, como na adsorção de BSA por ARAÚJO (1996) e na adsorção de solução de Insulina por CRUZ (1997), utilizando este adsorvente.

O modelo de Langmuir ajustou-se bem aos dados experimentais para o sistema Inulinase-Accell Plus QMA. Os valores dos parâmetros obtidos através do ajuste não-linear foram  $q_{\max} = 7783,25 \text{ UA mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $k_d = 1,611 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

As isotermas de equilíbrio de adsorção expressas por quantidade de proteína total adsorvida nos sistemas Inulinases-CM-Sepharose CL-6B e Inulinases-Accell Plus QMA são apresentadas nas Figuras 5.16 e 5.17.



**Figura 5.16** - Isoterma de equilíbrio de adsorção em proteína total no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B, à temperatura de 25 °C e 25 rpm.



**Figura 5.17** - Isotherma de equilíbrio de adsorção em proteína total no sistema Inulinases-Accell Plus QMA, à temperatura de 25 °C e 25 rpm.

O modelo de Langmuir ajustou-se bem aos dados experimentais para os sistemas Inulinases-CM-Sepharose CL-6B e Inulinase-Accell Plus QMA. Os parâmetros obtidos através do ajuste não-linear foram para o adsorvente CM-Sepharose CL-6B:  $q_{\max} = 17,95 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $k_d = 1,50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , e para Accell Plus QMA:  $q_{\max} = 263,41 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $k_d = 0,119 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , e correlação  $R^2 = 0,97$ .

### 5.3. - Modelagem Matemática da Adsorção em Tanques Agitados

#### 5.3.1 – Resultados do Ajuste do Modelo Simplificado: Obtenção das Constantes de Adsorção e Dessorção

A análise dos resultados experimentais obtidos com as curvas cinéticas de adsorção dos sistemas Inulinases-CM-Sepharose CL-6B e Inulinases-Accell Plus QMA, foram utilizadas para quantificar os valores das constantes de velocidade das taxas de adsorção,  $k_1$ , e de dessorção,  $k_{-1}$ .

A solução do modelo foi baseado na expressão analítica desenvolvida por CHASE (1984), onde contêm apenas um parâmetro desconhecido, que é a constante de velocidade de adsorção,  $k_1$ , conforme a Equação (5.8):

$$C = C_0 - \left(\frac{v}{V}\right) \left[ \frac{(b+a) \left(1 - \exp\left(-\frac{2av}{V} k_1 t\right)\right)}{\left(\frac{b+a}{b-a}\right) - \exp\left(-\frac{2av}{V} k_1 t\right)} \right] \quad (5.8)$$

em que

$$a^2 = b^2 - \left(\frac{C_0 V}{v}\right) q_{\max} \quad (5.9)$$

e

$$b^2 = \frac{1}{2} \left( \frac{C_0 V}{v} + q_{\max} + \frac{k_{-1}}{k_1} \cdot \frac{V}{v} \right) \quad (5.10)$$

em que  $C_0$  é a concentração inicial de Fructozyme<sup>®</sup> em solução (UA. mL<sup>-1</sup>) e  $v$  o volume do adsorvente e  $V$  o volume total do sistema.

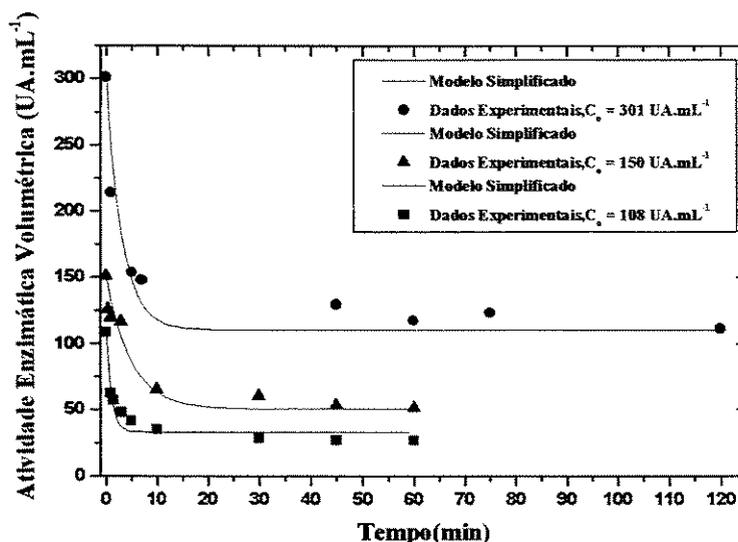
A solução numérica é obtida por otimização, através de um algoritmo computacional baseado no método de ROSENBROCK (1960), que é um método de pesquisa seqüencial sem restrição adequado para uma função do tipo unimodal e não-linear.

Desta forma, é realizada a pesquisa seqüencial do valor ótimo de  $k_1$ , comparando os dados experimentais com os dados teóricos (gerados analiticamente), através da minimização de uma função objetivo do tipo somatório quadrático dos desvios, conforme abaixo:

$$FO = \sum_{i=1}^N (C_{\text{exp}}(i) - C_{\text{cal}}(i))^2 \quad (5.11)$$

Inicializa-se o algoritmo de procura seqüencial para o sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B, a partir do valor encontrado (ordem de grandeza) por CHASE (1984). Partindo desta estimativa obtêm-se o valor otimizado da constante de adsorção  $k_1$  por minimização da FO e através da relação, ( $k_d = k_{-1}/k_1$ ), têm-se a taxa de dessorção,  $k_{-1}$ .

A Figura 5.18 apresenta os dados das curvas cinéticas e o ajuste ao modelo simplificado no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B.



**Figura 5.18** - Curvas cinéticas de adsorção e ajuste do modelo simplificado no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B.

Os valores das constantes de adsorção  $k_1$  e dessorção  $k_{-1}$  estão apresentados na Tabela 5.1 para o sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B. Observa-se que existe um comportamento decrescente nos valores das taxas de adsorção e dessorção, sendo dependente das concentrações enzimáticas no sistema.

**Tabela 5.1** - Valores das constantes de adsorção  $k_1$  e dessorção  $k_{-1}$  no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B otimizados que minimizam a função objetivo.

C <sub>0</sub> (UA.mL <sup>-1</sup> )	k <sub>1</sub> × 10 <sup>3</sup> (mL.UA <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	k <sub>-1</sub> (min <sup>-1</sup> )
301	1,247	0,1182
150	0,734	0,0696
108	0,316	0,0305

As Figuras 5.19, 5.20 e 5.21 apresentam os dados experimentais para o sistema Inulinases-Accell Plus QMA, bem como o ajuste ao modelo simplificado.

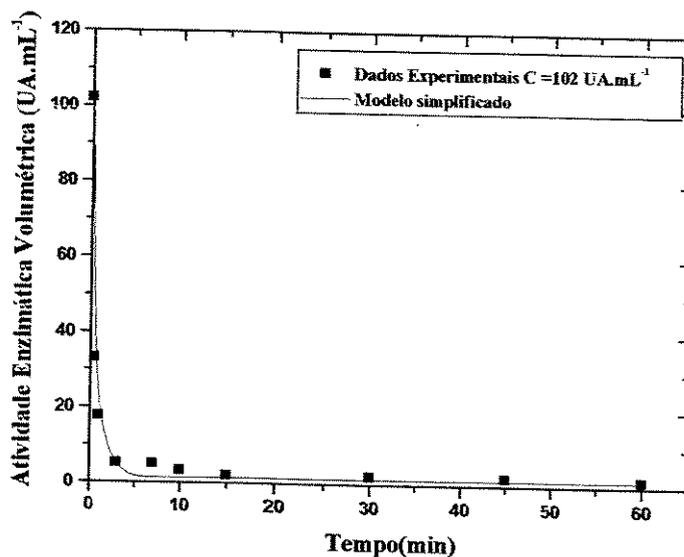


Figura 5.19 - Curva cinética de adsorção e ajuste do modelo simplificado no sistema Inulinases-Accell Plus QMA,  $C_0 = 102 \text{ UA.mL}^{-1}$ .

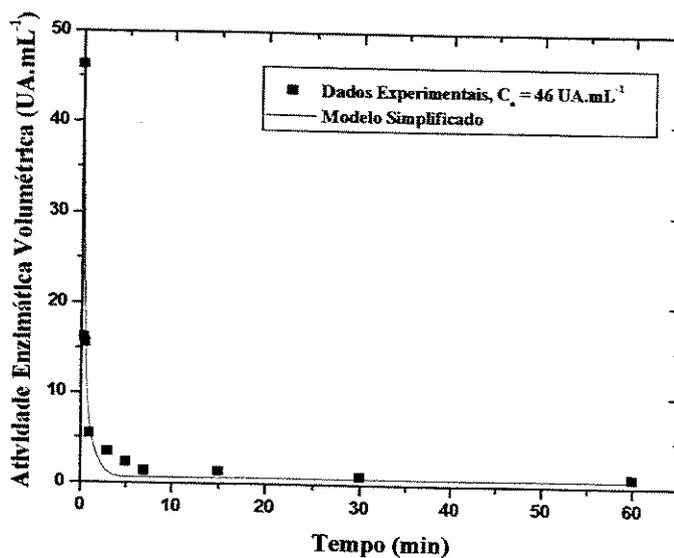
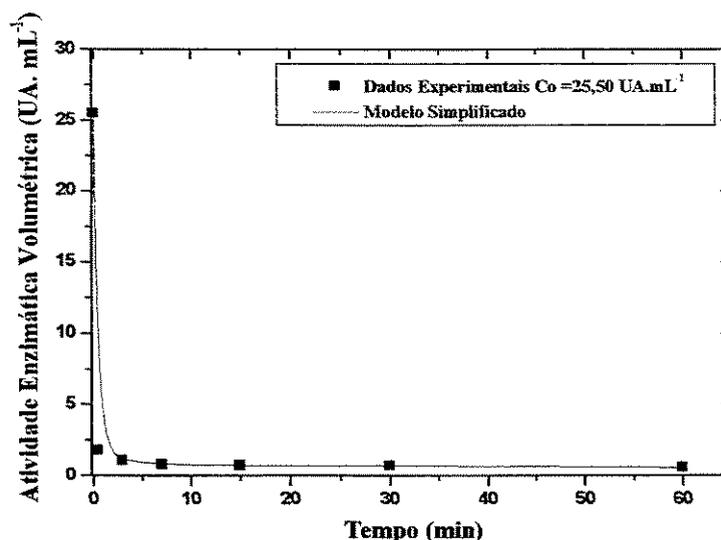


Figura 5.20 - Curva cinética de adsorção e ajuste do modelo simplificado no sistema Inulinases-Accell Plus QMA,  $C_0 = 46 \text{ UA.mL}^{-1}$ .



**Figura 5.21** - Curva cinética de adsorção e ajuste do modelo simplificado do sistema no Inulinases-Accell Plus QMA,  $C_0 = 25,50 \text{ UA. mL}^{-1}$ .

O programa computacional (algoritmo de otimização), foi inicializado com valores (ordem de grandeza) obtidos e descritos por CRUZ (1997), utilizando a adsorção de substância pura (insulina) no adsorvente Accell Plus QMA. Os valores ótimos,  $k_1$  e  $k_{-1}$ , são apresentados na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2** - Valores das constantes de adsorção  $k_1$  e dessorção  $k_{-1}$  para os sistemas Inulinases-Accell Plus QMA.

$C_0$ (UA.mL <sup>-1</sup> )	$k_1$ (mL.UA <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$k_{-1}$ (min <sup>-1</sup> )
102	0,016	0,0259
46	0,0223	0,0359
25,50	0,0315	0,0507

Os valores obtidos das constantes de dessorção,  $k_{-1}$ , nos sistemas de adsorção por afinidade da lisozima e da BSA em Cibacron Blue-Sepharose CL-6B, bem como  $\beta$ -

galactosidase em Anti- $\beta$ -galactosidase-Sepharose 4B, descritos por CHASE (1984), são da ordem de grandeza 10 vezes inferior ao sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B.

### 5.3.2 - Solução Numérica do Modelo Completo

A solução do modelo completo para adsorção em tanques agitados descrito no Capítulo 3 (item 3.2), no qual considera-se os efeitos de transferência de massa do filme no líquido em torno da partícula (adsorvente) e a difusão nos poros da partícula, permitem a obtenção dos valores dos coeficientes,  $k_f$  e  $D_{ef}$ , que estão representados nas Equações (3.19) e (3.27).

De modo a analisar os resultados experimentais obtidos com as curvas cinéticas e os dados de equilíbrio de adsorção, encontra-se o modelo partindo das Equações (3.11), (3.15), (3.16), (3.17) e (3.19) e definindo as seguintes variáveis adimensionais:

$$x = \frac{r}{R} \quad \psi_i = \frac{C_i}{C_0} \quad \theta_b = \frac{C_b}{C_0} \quad \tau = \frac{D_{ef} t}{R^2} \quad Bi_m = \frac{k_f R}{\beta D_{ef}} \quad (5.12)$$

o balanço de massa na partícula será expresso por:

$$\left[ 1 + \frac{(1-\beta) q_{max} k_d}{\beta (k_d + C_0 \psi_i)^2} \right] \frac{\partial \psi_i}{\partial \tau} = \left[ \frac{\partial^2 \psi_i}{\partial x^2} + \frac{2}{x} \frac{\partial \psi_i}{\partial x} \right] \quad (5.13)$$

condição inicial

$$\tau = 0, \quad \psi_i = 0 \quad \forall x \quad (5.14)$$

e condições de contorno na superfície e na partícula

$$x = 0, \quad \frac{\partial \psi_i}{\partial x} = 0 \quad (5.15)$$

$$x = 1, \quad \frac{\partial \psi_i}{\partial x} = \text{Bi}_m (\theta_b - \psi_i)_{|_{x=1}} \quad (5.16)$$

e o balanço de massa no tanque agitado, expresso por:

$$\frac{\partial \theta_b}{\partial \tau} = \frac{3v\text{Bi}_m}{V} (\theta_b - \psi_i)_{|_{x=1}} \quad (5.17)$$

$$\tau = 0 \quad \theta_b = 0 \quad (5.18)$$

As equações apresentadas anteriormente formam um sistema de equações diferenciais ordinárias e algébricas, designadas DAE. A solução deste sistema é possível utilizando-se do método de colocação ortogonal global, descrito em VILLADSEN (1978), FINLAYSON (1980) e YAO e TIEN (1992).

Utilizando-se de uma transformação de variáveis  $u = x^2$ , nas Equações (5.13) e (5.16) e discretizando a variável espacial pelo método da colocação ortogonal, tem-se:

$$\left[ 1 + \frac{(1-\beta)}{\beta} \frac{q_{\max} k_d}{(k_d + C_0 \psi_i)^2} \right] \frac{\partial \psi_i}{\partial \tau} = 4u_j \sum_{k=1}^{N+1} B_{jk} \psi_{ik} + 6 \sum_{k=1}^{N+1} A_{jk} \psi_{jk} \quad j = 1 \dots N \quad (5.19)$$

e com as condições

$$\tau = 0, \quad \psi_{ik} = 0 \quad k = 1 \dots N+1 \quad (5.20)$$

$$u = 1, \quad \sum_{k=1}^{N+1} A_{N+1,k} \psi_{ik} = \frac{\text{Bi}_m}{2} (\theta_b - \psi_{iN+1})_{|_{u=1}} \quad (5.21)$$

Nas Equações acima,  $A_{jk}$  e  $B_{jk}$ , representam as matrizes dos pontos de colocação ortogonal. Conforme a discretização, existem  $N$  pontos de colocação distribuídos no intervalo compreendido  $0 < u < 1$  e um ponto em  $u_{N+1} = 1$ .

O sistema das equações ordinárias e algébricas formados pelas Equações (5.19), (5.20) e (5.21), foram resolvidas simultaneamente através da implementação de um algoritmo computacional com a rotina de domínio público DASSL (Differential Algebraic System Solver), desenvolvido por PETZOLD (1982) e associado com a rotina de otimização multivariável não-linear, método do complexo, elaborado por BOX (1965).

Esse algoritmo computacional permite obter os valores otimizados dos coeficientes de filme no líquido,  $k_f$ , e o coeficiente de difusão nos poros  $D_{ef}$ , que minimiza a função objetivo definida como o somatório dos quadrados dos desvios entre os valores experimentais e calculados na Equação (5.11).

A modelagem matemática implementada em um programa computacional foi utilizada para ajustar o modelo às curvas cinéticas experimentais dos sistemas Inulinases-CM-Sepharose CL-6B no tampão Acetato de Sódio 10 mM (pH 4,1) e Inulinases-Accell Plus QMA, supondo-se que a transferência de massa na película e a difusão intrapartícula são as maiores resistências à transferência de massa. O propósito a ser alcançado com o referido ajuste foi a obtenção dos coeficientes de transferência de massa,  $k_f$  e  $D_{ef}$  para os sistemas inulinases-adsorventes em estudo.

O algoritmo computacional para otimização dos coeficientes,  $k_f$  e  $D_{ef}$ , operam no campo limitado pelas restrições para o tempo adimensional  $\tau$  e número de Biot mássico. Estes parâmetros foram inicializados através de correlações experimentais para o coeficiente de transferência de massa no filme líquido,  $k_f$ , que no caso foi avaliado pela expressão apresentada em GEANKOPLIS (1993). A expressão é aplicada nos sistemas que envolvem a transferência de massa de soluções agitadas com pequenas partículas suspensas, cujos diâmetros das partículas inferiores a 0,6 mm :

$$k_f = \frac{2 \cdot D}{d_p} + 0,31 \cdot Sc^{(-2/3)} \left[ \frac{(\rho_p - \rho_L) \mu g}{\rho_L^2} \right]^{(1/3)} \quad (5.22)$$

em que  $k_f$  é o coeficiente de transferência de massa no filme líquido ( $m \cdot s^{-1}$ ),  $D$  coeficiente de difusão ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ),  $d_p$  é o diâmetro das partículas (m),  $Sc$  é o número adimensional de Schmidt ( $\frac{\mu}{\rho_L D}$ ),  $\rho_p$  e  $\rho_L$  é a densidade da partícula e no líquido ( $kg \cdot m^{-3}$ ),  $\mu$  é a viscosidade do líquido ( $kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$ ) e  $g$  é a aceleração da gravidade ( $9,8 m \cdot s^{-2}$ ).

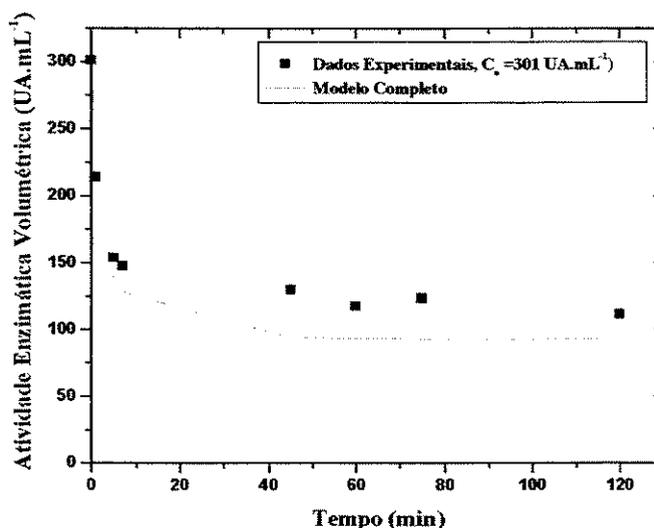
O coeficiente de difusividade nos poros dos adsorventes é avaliado segundo POLSON (1950), admitindo que a mistura de inulinasas na solução Fructozyme<sup>®</sup> tem uma massa molecular em torno de 70 kDa:

$$D = 9,40 \cdot 10^{-15} \left[ \frac{T}{\mu M^{1/3}} \right] \quad (5.23)$$

em que T é a temperatura absoluta ( 298 K),  $\mu$  é a viscosidade da solução enzimática que contém o adsorbato ( $\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) e M é a massa molecular da solução enzimática.

### 5.3.2.1. - Ajuste do Modelo Completo aos Dados cinéticos: Obtenção dos Parâmetros de Transferência de Massa

Nas Figuras 5.22 a 5.24 são apresentadas as curvas cinéticas experimentais e ajustadas para o sistema Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B, através do modelo matemático completo e discretizado pelo método da colocação ortogonal com 17 pontos.



**Figura 5.22** - Curva cinética de adsorção experimental e ajuste do modelo completo sistema Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B para  $C_0 = 301 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

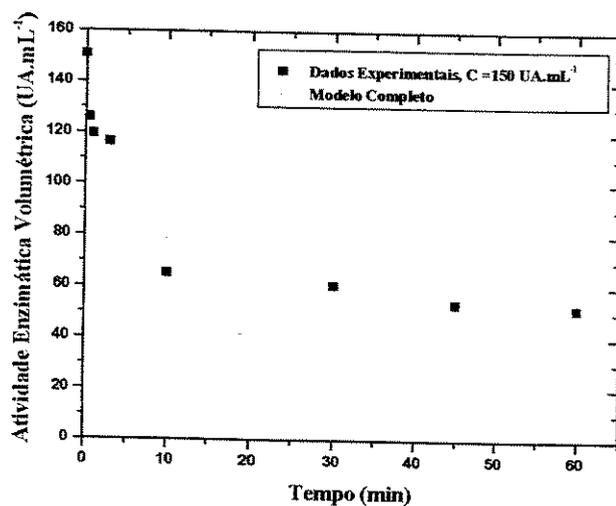


Figura 5.23 - Curva cinética de adsorção experimental e ajuste do modelo completo no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B para  $C_0 = 150 \text{ UA.mL}^{-1}$ .

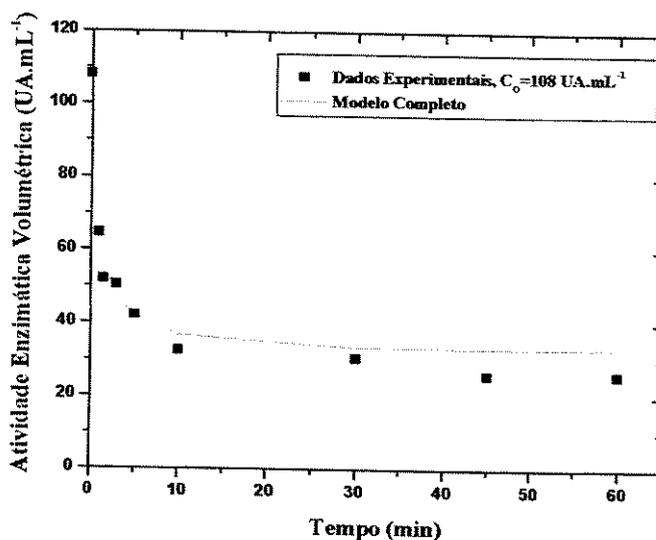
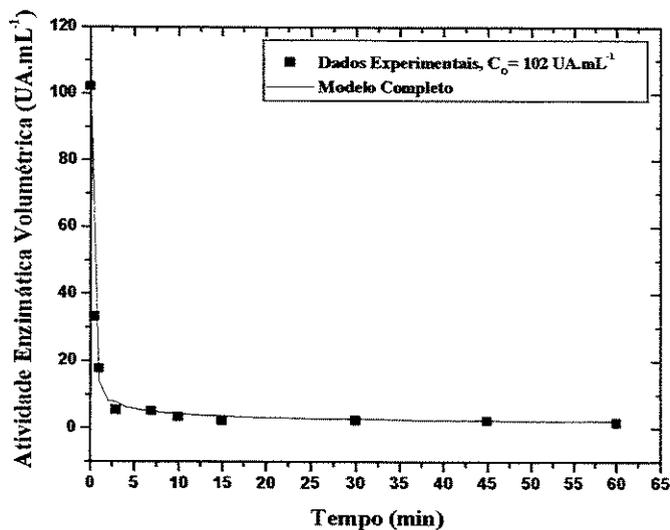
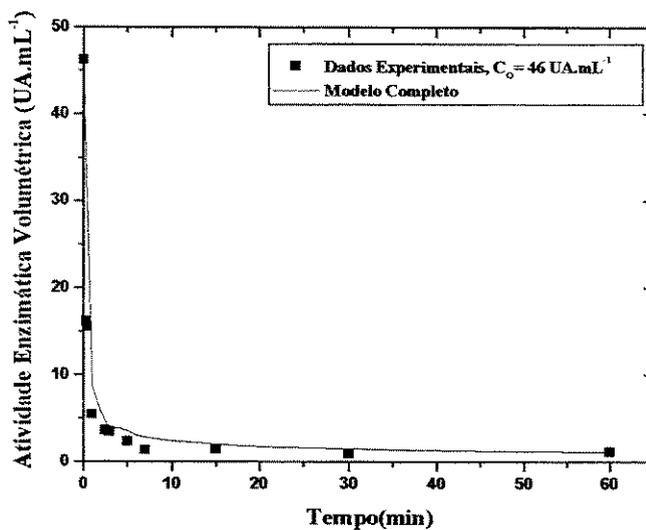


Figura 5.24 - Curva cinética de adsorção experimental e ajuste do modelo completo no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B para  $C_0 = 108 \text{ UA.mL}^{-1}$ .

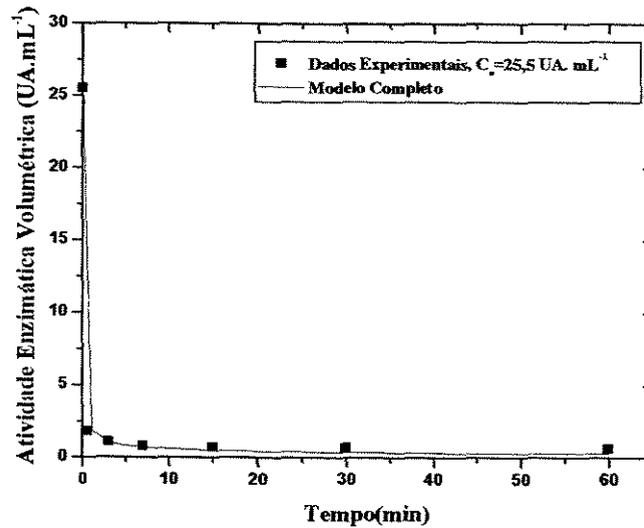
Nas Figuras 5.25 a 5.27 estão apresentadas as curvas cinéticas experimentais e o ajuste com o modelo completo no sistema Inulinases-Accell Plus QMA.



**Figura 5.25** - Curva cinética de adsorção experimental e ajuste do modelo completo no sistema Inulinases-Accell Plus QMA para  $C_0 = 102 \text{ UA.mL}^{-1}$ .



**Figura 5.26** - Curva cinética de adsorção experimental e ajuste do modelo completo sistema Inulinases-Accell Plus QMA para  $C_0 = 46 \text{ UA.mL}^{-1}$ .



**Figura 5.27** - Curva cinética de adsorção experimental e ajuste do modelo completo no sistema Inulinases-Accell Plus QMA para  $C_0 = 25,50 \text{ UA.mL}^{-1}$ .

O modelo completo, proposto por HORSTMANN e CHASE (1989) e por CARRÈRE (1993), ajustou-se aos dados cinéticos experimentais de atividade enzimática permitindo a otimização dos parâmetros que descrevem a transferência de massa no processo de adsorção em tanques agitados.

Os valores obtidos dos parâmetros para os sistemas Inulinases-CM-Sepharose CL-6B e Inulinases-Accell Plus QMA estão apresentados na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3** - Valores calculados para os coeficientes de transferência de massa no filme de líquido ( $k_f$ ) e difusão nos poros do adsorvente ( $D_{ef}$ ).

Adsorvente CM-Sepharose CL-6B			Adsorvente Accell Plus QMA		
$C_0$ (UA.mL <sup>-1</sup> )	$k_f \times 10^3$ (m.s <sup>-1</sup> )	$D_{ef} \times 10^{11}$ (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	$C_0$ (UA.mL <sup>-1</sup> )	$k_f \times 10^2$ (m.s <sup>-1</sup> )	$D_{ef} \times 10^8$ (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )
301	0,84	0,94	102	0,51	0,353
150	0,23	0,28	46	0,93	0,264
108	0,15	0,19	25,50	0,434	0,164

Pode ser verificado através dos resultados apresentados, que a difusividade efetiva varia com a concentração inicial de inulinase. Esse tipo de comportamento foi verificado também no estudo de outros sistemas de adsorção utilizando esse mesmo modelo (CARRÈRE, 1993).

Não existe na literatura dados que possam ser comparados com os sistemas Inulinasas-CM-Sepharose CL-6B e Inulinasas-Accell Plus QMA. Apenas como referência, o trabalho de DRAEGER e CHASE (1990), no qual se determinou no sistema BSA-Q-Sepharose Fast Flow um valor médio de  $1,0 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ .

Os valores dos coeficientes de transferência de massa no líquido,  $k_f$ , obtidos através do ajuste, também variam com os valores de atividade enzimática inicial.

## **5.4. – Operações de Adsorção em Colunas Cromatográficas**

### **5.4.1 – Etapas de Adsorção, Lavagem e Eluição em Colunas Cromatográficas em Leito Fixo**

Os processos de adsorção de inulinasas em leito fixo com os adsorventes CM-Sepharose CL-6B e Accell Plus QMA foram realizados com objetivo de obter-se curvas de saturação do leito (curva de breakthrough). A solução comercial de Fructozyme<sup>®</sup> foi condicionada em solução tampão de acetato de sódio (10 mM, pH 4,1) para o adsorvente CM-Sepharose CL-6B e solução tampão de Tris-HCl (30mM, pH 7,5) para Accell Plus QMA. Os vários experimentos de adsorção em leito fixo foram realizados com soluções diluídas do produto comercial Fructozyme<sup>®</sup> após diálise. O objetivo do processo de diálise foi o condicionamento da solução enzimática nos referidos tampões e a remoção de substâncias com massa molecular inferior a 10kDa e outras que possam interferir no processo competindo pelos sítios de adsorção.

As operações cromatográficas foram executadas através da técnica de análise frontal utilizando colunas de vidro de alta resistência desenvolvidas pela Pharmacia<sup>®</sup>, cujos modelos foram HR 5/10, C10/20 e HR 5/2.

Os experimentos de adsorção no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B, foram realizados com as colunas HR 5/10; C10/20 e no sistema Inulinases-Accell Plus QMA utilizou-se coluna HR 5/2. Os ensaios foram executados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando o cromatógrafo Shimadzu, composto pelo conjunto de bombas e sistema de detecção UV-vísivel. Os experimentos de adsorção ocorreram à temperatura ambiente de 25 °C .

A saturação do leito de adsorvente, curva de “breakthrough”, obtida no processo teve monitoramento do efluente da coluna de leito fixo por detecção UV a 280 nm, conforme descrito no Capítulo 4 (item 4.6), e as frações coletadas no decorrer da etapa de adsorção.

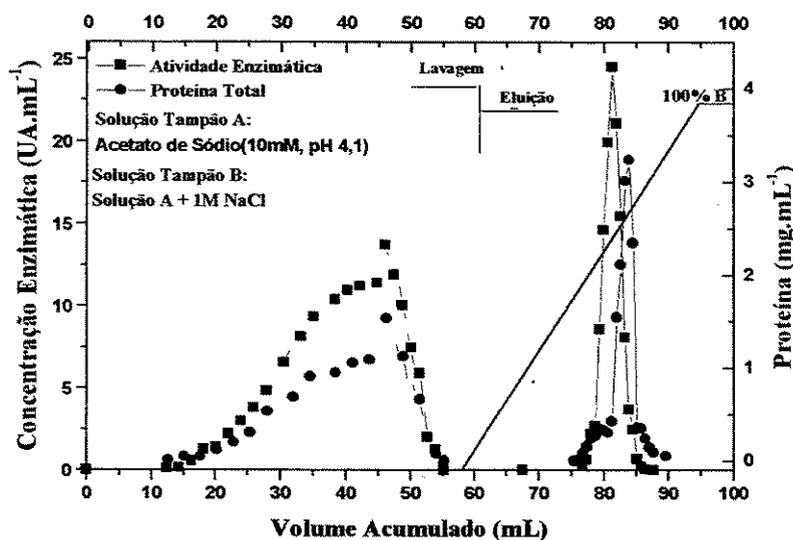
O procedimento de lavagem foi realizado com a utilização das soluções tampões de condicionamento dos adsorventes acetato de sódio (10 mM, pH 4,1) e tris-HCl (30 mM, pH 7,5), sendo o período de lavagem avaliado para garantir que as enzimas fracamente adsorvidas fossem totalmente excluídas da coluna, acompanhando-se por monitoramento do sistema de detecção UV (280nm) até a estabilização e retorno à linha de base do sinal. A etapa de eluição permitiu a dessorção da enzima fortemente adsorvida ao sólido, sendo realizada através do gradiente linear (0-1 M de NaCl) por período determinado de 100 min ou 35 min. Este procedimento de eluição em gradiente foi adotado nos experimentos de adsorção em leito fixo nos sistemas Inulinases-CM-Sepharose CL-6B e e Inulinases Accell Plus QMA.

As frações das enzimas, nas diversas etapas de adsorção, lavagem e eluição, foram coletadas em tubos do tipo Eppendorff® e posteriormente analisadas a atividade enzimática pelo método do DNS (MILLER, 1951) e proteína total (LOWRY, 1959).

#### **5.4.1.1 – Experimentos de Adsorção no Sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B**

A Figura 5.28 apresenta o cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B no leito de 8 cm e contendo 300 mg de

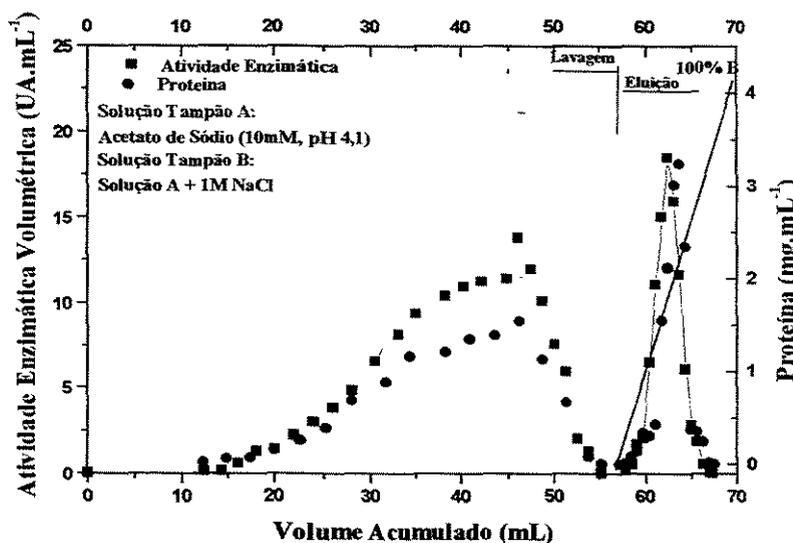
adsorvente na coluna HR 5/10. A solução enzimática com  $11,5 \text{ UA.mL}^{-1}$  e  $1,45 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína total, foi injetada na coluna e o processo de eluição realizado por gradiente salino (0-1M de NaCl) por duração de 100 min.



**Figura 5.28** - Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema inulinases-CM-Sephrose CL-6B. Ensaio realizado na coluna HR 5/10 com leito de 8 cm, fluxo volumétrico de  $0,35 \text{ mL.min}^{-1}$ , solução enzimática de  $11,5 \text{ UA.mL}^{-1}$  e  $1,45 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína total. Eluição por gradiente linear (0-1M NaCl), duração de 100 min.

Observa-se na Figura 5.28, que após a injeção de 20 mL de solução enzimática (cerca de 12% do volume da coluna), a enzima não adsorvida eflue pela coluna e sua atividade é quantificada pelo método de açúcares redutores totais. A lavagem é iniciada e após, atingir a concentração de alimentação, sendo necessário cerca de 10 mL de solução tampão acetato de sódio (10mM, pH 4,1) para retornar à linha de base. O processo de eluição em gradiente linear, apresentou como resultado um pico de enzima eluído em torno de 85 mL, apresentando atividade enzimática em torno de  $25 \text{ UA.mL}^{-1}$ . Neste processo o fator de concentração foi em torno de 2,1 vezes a concentração inicial e a recuperação de 14%.

A Figura 5.29 apresenta o cromatograma de adsorção, lavagem e eluição para uma amostra de atividade enzimática volumétrica de  $11,50 \text{ UA.mL}^{-1}$  e  $1,45 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína total, e eluição através de gradiente salino ( $0\text{-}1\text{M}$  de  $\text{NaCl}$ ) por duração de 35 min. As condições operacionais foram as seguintes concentração enzimática, fluxo volumétrico e altura do leito, foram mantidas conforme o experimento apresentado na Figura 5.28, porém o processo de eluição foi modificado para uma duração de 35 min.

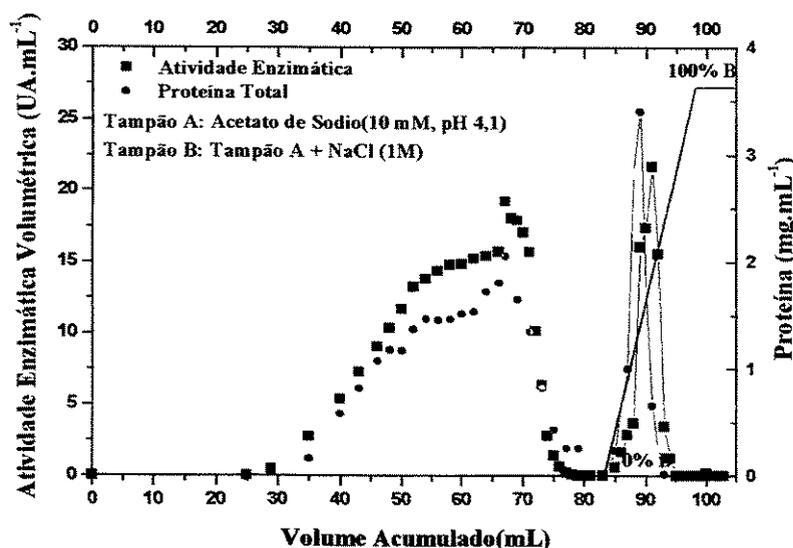


**Figura 5.29** - Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema inulinases-CM-Sepharose CL-6B. Ensaio realizado na coluna HR 5/10 com leito de 8 cm, fluxo volumétrico de  $0,35 \text{ mL.min}^{-1}$ , solução enzimática de  $11,5 \text{ UA.mL}^{-1}$  e  $1,45 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína total. Eluição por gradiente linear ( $0\text{-}1\text{M}$   $\text{NaCl}$ ), duração de 35 min.

Em decorrência do baixo número de pratos teóricos (NPT) não é possível a separação das enzimas endo e exo-inulinasas, apresentando a formação de um único pico contendo a mistura enzimática. Neste sentido procurou-se minimizar o tempo de eluição no sistema para 35 min. O pico eluído apresentou fator de concentração em torno 1,6 vezes a concentração inicial e recuperação de 14 %.

A Figura 5.30 apresenta o cromatograma de adsorção, lavagem e eluição para uma amostra de concentração enzimática de  $15,6 \text{ UA.mL}^{-1}$  e  $1,96 \text{ mg.mL}^{-1}$  de proteína

total. O processo de eluição foi executado por gradiente salino (0-1M de NaCl) com tampão acetato de sódio (10 mM, pH 4,1) e duração de 35 min. O fluxo volumétrico foi mantido em  $0,25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e leito de 8 cm.

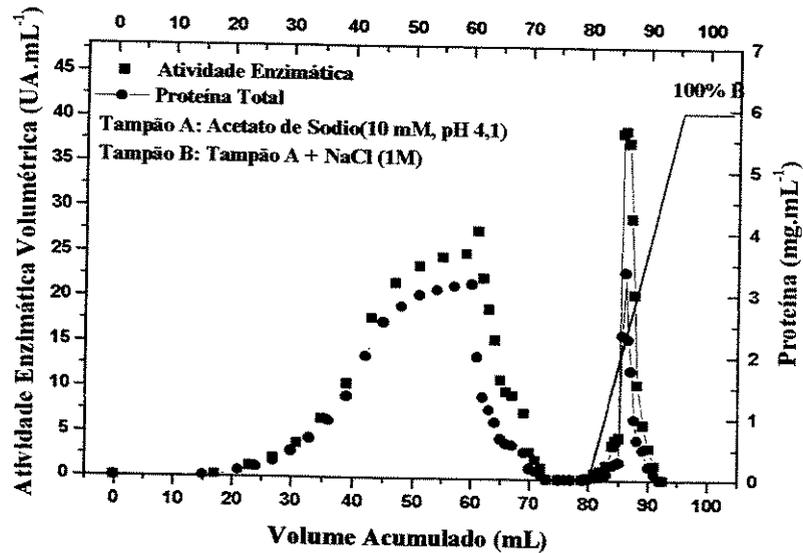


**Figura 5.30** - Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição de inulinasas em CM-Sepharose CL-6B, Condições operacionais na coluna HR 5/10: concentração enzimática  $15,6 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$ , fluxo volumétrico  $0,25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Eluição em gradiente linear (0-1 M NaCl) por 35 min.

No ensaio apresentado na Figura 5.30 obteve-se os seguintes resultados após eluição: fator de concentração em torno 1,3 vezes à concentração inicial e recuperação de 10 %.

Os experimentos seguintes foram executados numa coluna C 10/20 ( $\varnothing = 1 \text{ cm}$  e altura de leito 3 cm) e leito de partículas composto por 3,2 g de CM-Sepharose CL-6B.

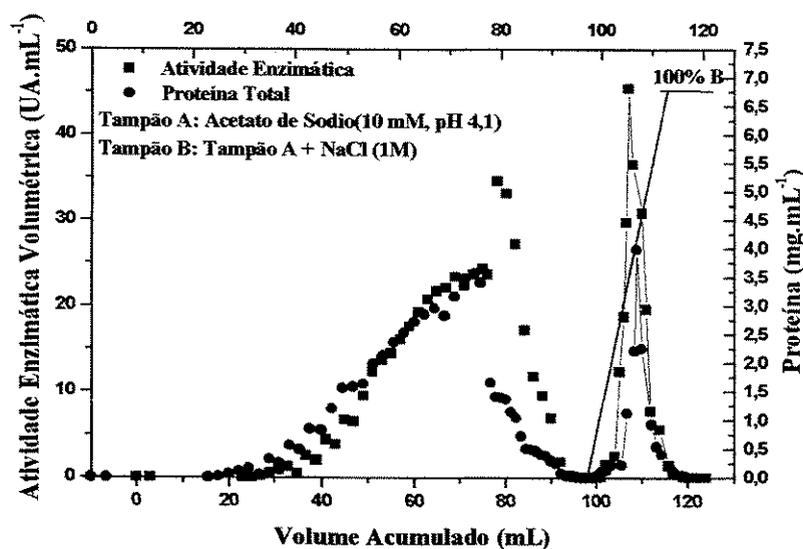
Apresenta-se na Figura 5.31 o cromatograma do ciclo de adsorção/eluição da solução de Fructozyme<sup>®</sup> com  $25 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$  e  $3,15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de proteína total. O processo de eluição foi executado por gradiente salino (0-1M de NaCl) com tampão acetato de sódio (10 mM, pH 4,1) e por duração de 35 min.



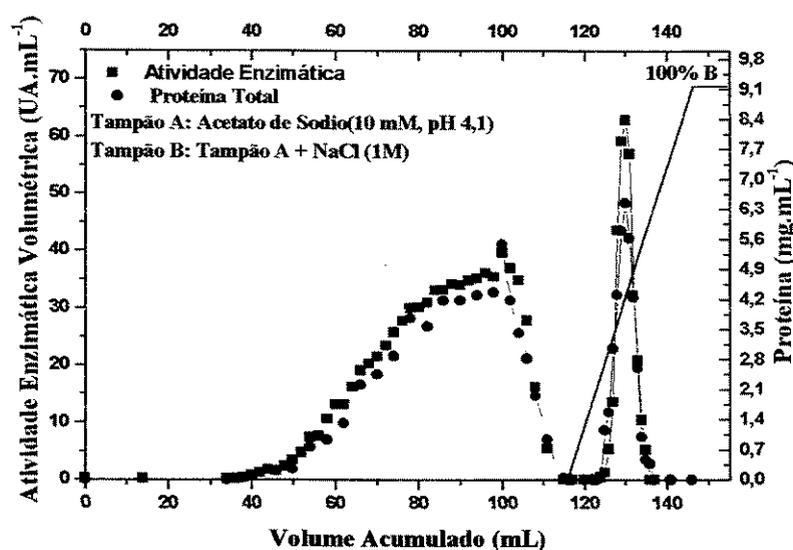
**Figura 5.31** - Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais na coluna C 10/20: concentração enzimática  $25,0 \text{ UA.mL}^{-1}$  e  $1,96 \text{ mg.mL}^{-1}$  proteína total, altura do leito de 3 cm e fluxo volumétrico de  $0,65 \text{ mL.min}^{-1}$ . Eluição em gradiente linear (0-1M NaCl) por duração de 35 min.

Na Figura 5.31 observa-se que o comportamento é semelhante aos obtidos em ensaios anteriores no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B em coluna HR 5/10. O processo de eluição, também apresentou um pico eluído contendo a mistura das enzimas e os resultados para o fator de concentração 1,55 vezes e 10 % de recuperação.

Nas Figuras 5.32 e 5.33 estão apresentados os cromatogramas das soluções enzimáticas  $27,6$  e  $35,9 \text{ UA.mL}^{-1}$  nos fluxos volumétricos de  $0,75$  e  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ , conservadas as condições de eluição por gradiente linear.



**Figura 5.32** - Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B em coluna C 10/20, concentração enzimática  $27,6 \text{ UA.mL}^{-1}$ , fluxo volumétrico  $0,75 \text{ mL.min}^{-1}$  e eluição em gradiente linear (0-1 M NaCl) em 35 min.



**Figura 5.33** - Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B em coluna C 10/20, concentração inicial  $35,9 \text{ UA.mL}^{-1}$ , fluxo volumétrico  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$  e eluição em gradiente linear (0-1 M NaCl) em 35 min.

Os fatores de concentração obtidos nos experimentos apresentados nas Figuras 5.32 e 5.33 foram iguais a 1,75 e a recuperação foi de 16 e 13 %.

### 5.4.1.2 – Experimentos de Adsorção no Sistema Inulinases-Accell Plus QMA

Os experimentos de adsorção em leito fixo para o sistema Inulinases-Accell Plus QMA foram realizados numa coluna HR 5/2 através do leito de partículas de 3 cm, contendo 100 mg de Accell Plus QMA.

As Figuras 5.34, 5.35 e 5.36 apresentam os perfis de adsorção, lavagem e eluição para concentrações de Fructozyme<sup>®</sup>, correspondente aos fluxos volumétricos de 0,45, 0,55 e 0,65 mL.min<sup>-1</sup>.

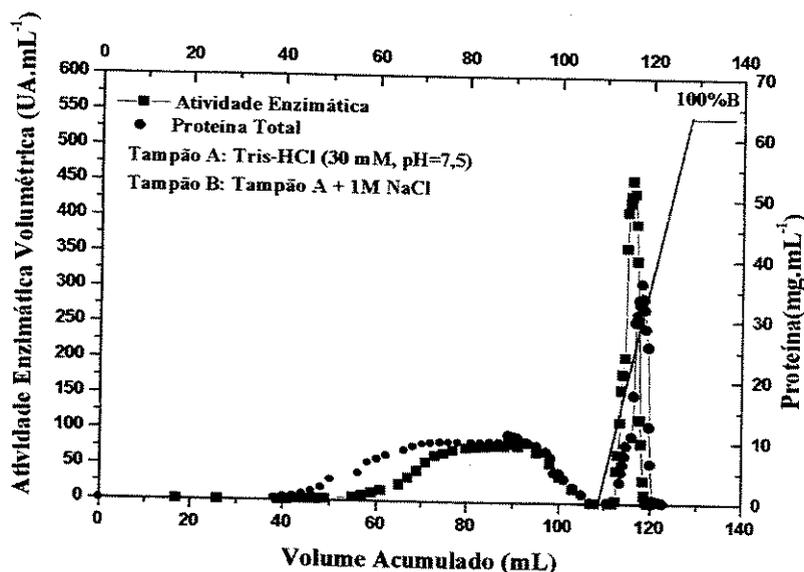
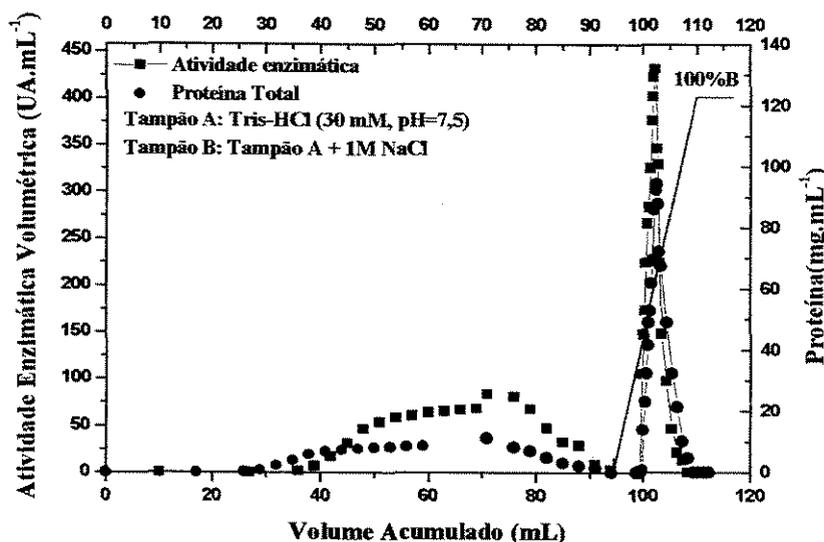


Figura 5.34 - Cromatograma de adsorção de Inulinases-Accell Plus QMA em leito fixo, coluna HR 5/2 com 100 mg de adsorvente e leito de 3 cm,  $C_o = 78,9 \text{ UA mL}^{-1}$  e proteína total  $9,95 \text{ mg.mL}^{-1}$  sob fluxo de  $0,45 \text{ mL min}^{-1}$ .

O cromatograma apresentado na Figura 5.34 possui comportamento idêntico aos apresentados nos sistemas Inulinases-CM-Sepharose CL-6B, sendo a etapa a eluição composta por um único pico eluído no processo por gradiente salino. O fator de concentração obtido no ensaio é bem superior, cerca de 5,7 vezes relativo à concentração inicial e a recuperação do processo de 33 %.

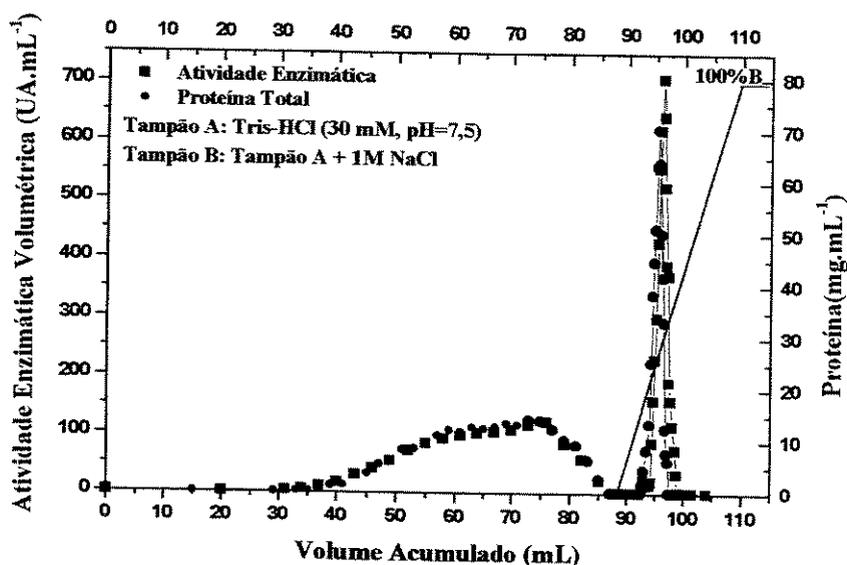
Processo de adsorção da amostra contendo  $68,6 \text{ UA.mL}^{-1}$  e  $8,65 \text{ mg.mL}^{-1}$  é apresentado no cromatograma abaixo.



**Figura 5.35** - Cromatograma de adsorção de Inulinases-Accell Plus QMA em leito fixo, coluna HR 5/2 com 100 mg de adsorvente e leito de 3 cm,  $C_0 = 68,6 \text{ UA mL}^{-1}$  e proteína total de  $8,65 \text{ mg.mL}^{-1}$  sob fluxo volumétrico de  $0,55 \text{ mL min}^{-1}$ .

É observado na Figura 5.35 que após a injeção de 69 mL de solução enzimática contendo a mistura de inulinases, a atividade de saída no topo da coluna é igual àquela da solução injetada. Interrompeu-se o processo de adsorção e iniciou-se a lavagem, as enzimas fracamente adsorvidas foram deslocadas. A etapa de eluição foi iniciada a 14 % da solução B, ou seja, concentração de 0,14 M de NaCl da mistura entre as soluções A e B. E cerca de 25 % da solução B, tem-se a eluição de total da mistura enzimática. Cujo, fator de concentração é da ordem de 5,4 e a recuperação de 34 %.

Fez-se um outro ensaio de adsorção da solução diluída de Fructozyme<sup>®</sup> contendo cerca de 105 UA.mL<sup>-1</sup> e 13,2 mg.mL<sup>-1</sup> proteína total no fluxo de 0,65 mL.min<sup>-1</sup>, sendo injetados 73 mL da amostra e encerrada adsorção ao atingir a concentração inicial no topo da coluna. O cromatograma obtido está apresentado na Figura 5.36.



**Figura 5.36** - Cromatograma de adsorção de Inulinases-Accell Plus QMA em leito fixo, coluna HR 5/2 com 100 mg de adsorvente e leito de 3 cm,  $C_o = 105 \text{ UA mL}^{-1}$  e proteína total  $13,2 \text{ mg.mL}^{-1}$  sob fluxo volumétrico de  $0,65 \text{ mL min}^{-1}$ .

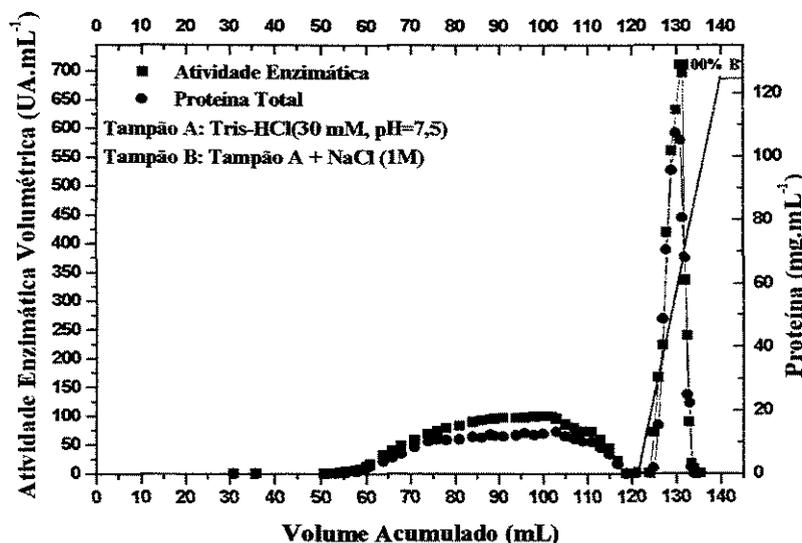
Os processos de lavagem e eluição foram semelhantes aos ensaios realizados anteriormente, e o valor conseguido do fator de concentração neste processo foi 6,73 vezes à concentração inicial e tendo recuperação de 25 %.

#### 5.4.2 – Etapas de Adsorção, Lavagem e Eluição em Colunas Cromatográficas em Leito Expandido

Os experimentos de adsorção das inulinases em leito fluidizado (expandido) foram realizados no sistema Inulinases-Accell Plus QMA. Este adsorvente permitiu à realização do processo de expansão do leito de partículas e obtenção das curvas de

saturação do leito expandido “curva de breakthrough”. A solução comercial de Fructozyme<sup>®</sup> dialisada e condicionada em solução tampão de tris-HCl (30mM, pH 7,5), foi submetida a operação cromatográfica de injeção por análise frontal em coluna C10/20 ( $\phi = 1$  cm, H=20 cm) da Pharmacia. Os processos de adsorção, lavagem e eluição, seguiram as etapas descritas no Capítulo 4 (item 4.7), sendo realizadas à temperatura de 25 °C.

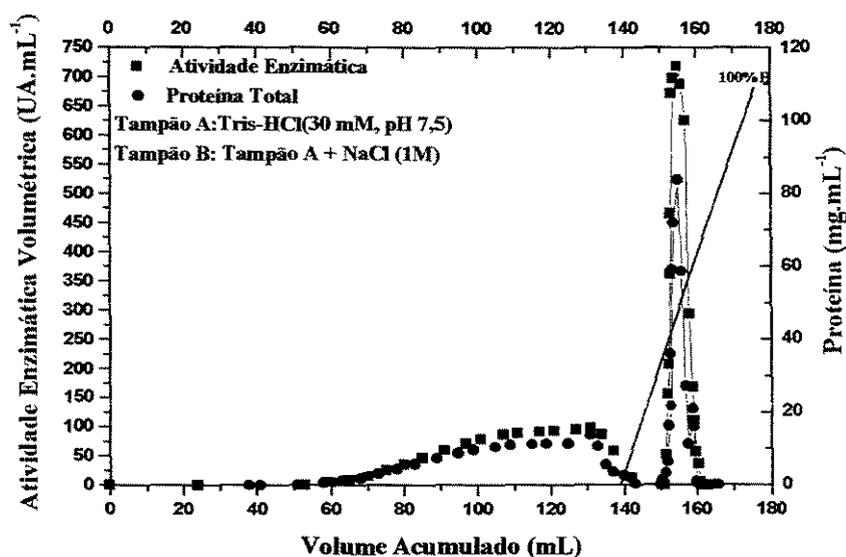
A Figura 5.37 apresenta o ciclo de adsorção, lavagem e eluição no fluxo volumétrico de 0,65 mL.min<sup>-1</sup> da injeção de 80 mL de solução diluída Fructozyme<sup>®</sup> de 98,8 UA. mL<sup>-1</sup> e 12,4 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína total. Sendo, o leito de partículas composto por cerca de 700 mg de adsorvente e expandido à altura de 4,4 cm, a porosidade do leito obtida através da distribuição do tempo de residência por injeção de pulso traçador (acetona com 1M de NaCl),  $\varepsilon = 0,79$ .



**Figura 5.37** - Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinas-Accell Plus QMA em solução Tris-HCl(30 mM, pH 7,5). Ensaio de adsorção realizado na coluna C 10/20 nas condições operacionais: massa do adsorvente 700 mg, altura do leito expandido  $H_{ex} = 4,4$  cm, fluxo volumétrico de 0,65 mL.min<sup>-1</sup>,  $C_o = 98,8$  UA.mL<sup>-1</sup> e proteína total de 12,4 mg.mL<sup>-1</sup>. Eluição em gradiente linear (0-1 M NaCl) em 35 min.

Observa-se na Figura 5.37 que o leito é inicia saturação a partir de 57 mL injetados de solução enzimática, e atinge o valor de máxima capacidade de adsorção após injeção de 100 mL e concentração inicial  $93,8 \text{ UA.mL}^{-1}$  no topo da coluna. A lavagem, foi realizada no leito expandido com injeção de 20 mL da solução de tris-HCl (30 mM, pH 7,5), as enzimas fracamente adsorvidas foram removidas do leito após lavagem. No processo de eluição por gradiente salino obtido com leito em repouso(sedimentado), ou seja, idêntico aos processos de eluição em coluna de leito fixo, apresentou no decorrer do processo a existência de um pico eluído após 35 min do processo. Atingiu-se o fator de concentração de 7,2 vezes o valor inicial da mistura enzimática e recuperação de 52 %.

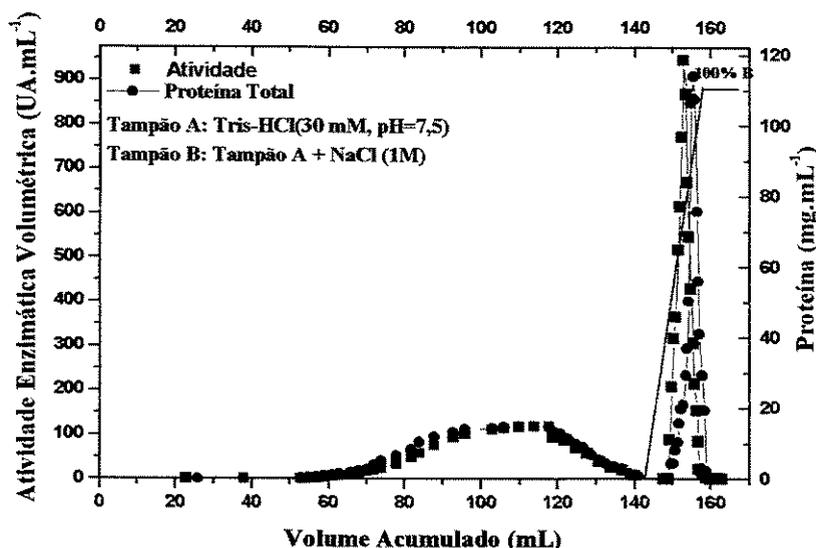
Na Figura 5.38 apresenta-se o cromatograma do processo de adsorção com leito expandido à altura de 4,7 cm e sob fluxo volumétrico de  $0,75 \text{ mL.min}^{-1}$  para amostra contendo  $93,8 \text{ UA.mL}^{-1}$  e  $11,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  de Fructozyme<sup>®</sup> e porosidade do leito  $\epsilon = 0,81$ .



**Figura 5.38** - Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinas-Accell Plus QMA em solução Tris-HCl(30 mM, pH 7,5). Ensaio de adsorção realizado na coluna C 10/20 nas condições operacionais: massa do adsorvente 700 mg, altura do leito expandido  $H_{ex} = 4,7 \text{ cm}$ , fluxo volumétrico de  $0,75 \text{ mL.min}^{-1}$ ,  $C_0 = 93,75 \text{ UA.mL}^{-1}$  e proteína total de  $11,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Eluição em gradiente linear (0-1 M NaCl) em 35 min.

O ciclo de adsorção, lavagem e eluição para o sistema Inulinas-Accell Plus QMA expandido à altura de 4,7 cm é semelhante ao obtido para expansão de 4,4 cm, e o processo de eluição obteve resultado de 7,6 vezes no fator de concentração e recuperação de 45 %.

Na Figura 5.39 apresenta-se a adsorção das inulinas no leito expandido na altura de 5,7 cm após injetados 81 mL de solução enzimática  $117,7 \text{ UA.mL}^{-1}$  e proteína total  $14,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  sob fluxo constante de  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$  e porosidade  $\epsilon = 0,84$ .



**Figura 5.39** - Cromatograma de adsorção, lavagem e eluição no sistema Inulinas-Accell Plus QMA em solução Tris-HCl(30 mM, pH 7,5). Ensaio de adsorção realizado na coluna C 10/20 nas condições operacionais: massa do adsorvente 700 mg, altura do leito expandido  $H_{ex} = 5,7 \text{ cm}$ , fluxo volumétrico de  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ ,  $C_0 = 89 \text{ UA.mL}^{-1}$  e proteína total de  $11,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Eluição em gradiente linear (0-1 M NaCl) em 35 min.

O processo de eluição é iniciado em cerca de 12 % da solução B (0,14M NaCl) resultante da mistura entre as soluções A e B. E após cerca de 20% da solução B (0,27 M NaCl) praticamente toda a mistura enzimática havia sido eluída no processo. O fator de concentração de 8,0 vezes do valor inicial e recuperado cerca de 51 %.

## 5.5. - Modelagem Matemática Aplicada na Adsorção em Colunas Cromatográficas

### 5.5.1 - Ajuste das Curvas de Saturação da Coluna de Leito Fixo ao Modelo de Adsorção Simplificado

O modelo simplificado aplicado a uma coluna de adsorção em leito fixo foi baseado na solução teórica proposta por THOMAS (1944), sendo utilizado na predição do comportamento da adsorção nos leitos fixos dos sistemas Inulinases-CM-Sepharose CL-6B e Inulinases-Accell Plus QMA.

As Figuras 5.40, 5.41 e 5.42 apresentam as curvas do modelo e os dados experimentais. Observa-se que devido à simplificação no modelo, negligência do efeito de dispersão axial, este não apresenta um ajuste satisfatório conforme curvas apresentadas.

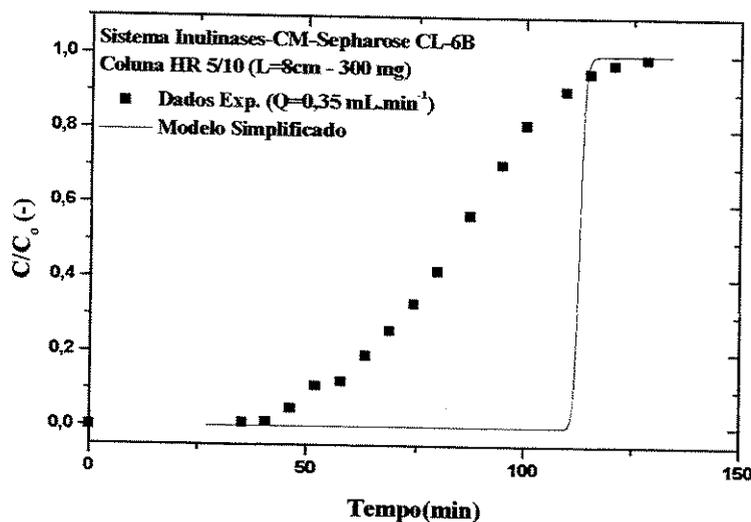
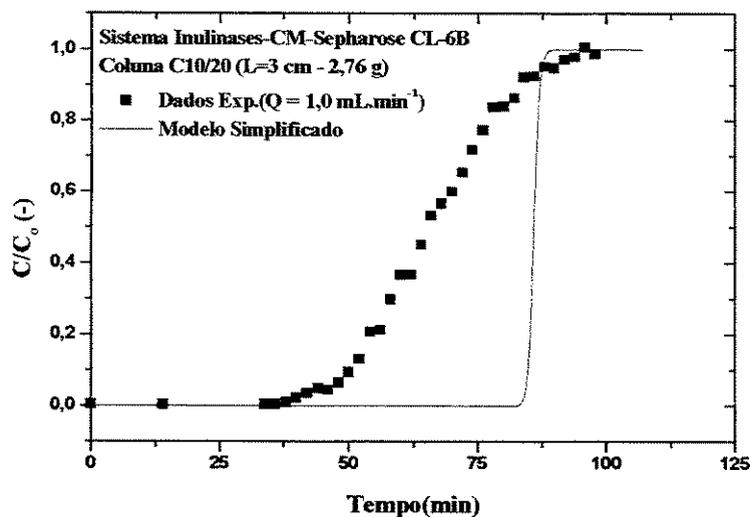
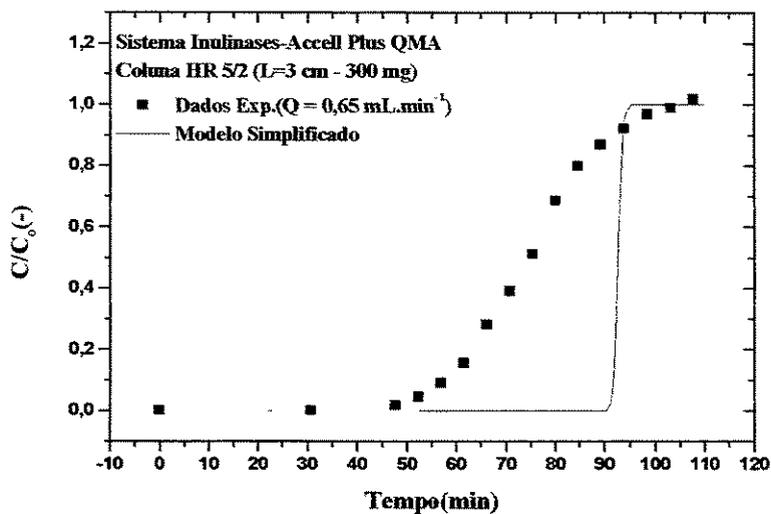


Figura 5.40 - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo simplificado no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais coluna HR 5/10: solução enzimática de  $11,5 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $0,35 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .



**Figura 5.41** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo simplificado no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais coluna HR 5/10: concentração de 35,9 UA.mL<sup>-1</sup> e fluxo volumétrico de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.



**Figura 5.42** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo simplificado no sistema Inulinases-Accell Plus QMA. Condições operacionais coluna HR 5/2: concentração de 105 UA mL, fluxo volumétrico de 0,65 mL.min<sup>-1</sup>.

### 5.5.2. - Ajuste das Curvas de Saturação do Modelo Completo de Adsorção de Leito Fixo

O balanço material na coluna é representado por uma equação diferencial parcial Equação (3.34) e na forma adimensionalizada na Equação (3.37). Essa equação foi reduzida a um conjunto de equações diferenciais ordinárias, usando-se o método de colocação ortogonal (SANTACESARIA, 1982 e NEVES, 1995) juntamente com a equação de transferência de massa para a partícula.

Inserindo novas variáveis adimensionais na Equação (3.37), tais como,  $\xi$  e  $\psi$ , tem-se :

$$\xi = \frac{C}{C_0}, \psi = \frac{\bar{C}_i}{C_0}, \tau = \frac{tu_0}{Z^2}, Pe = \frac{Zu_0}{D_{ax}}, u_0 = \frac{u_s}{\varepsilon}, y = \frac{z}{Z} \text{ e } \lambda = \frac{3k_1 Z^2}{R D_{ax}} \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad (5.23)$$

balanço de massa no leito fixo de adsorção, será expresso por:

$$\frac{\partial \xi}{\partial \tau} - \frac{\partial^2 \xi}{\partial y^2} + Pe \frac{\partial \xi}{\partial y} - \lambda(\xi - \psi) = 0 \quad (5.24)$$

as condições de contorno

$$\frac{1}{Pe} \left( \frac{\partial \xi}{\partial y} \right) \Big|_{y=0} = \xi - 1 \quad (5.25)$$

$$\left( \frac{\partial \xi}{\partial y} \right) \Big|_{y=1} = 0, \quad \tau > 0 \quad (5.26)$$

e a condição inicial

$$\tau = 0, \quad \xi = 0, \quad \psi = 0, \quad \forall y \quad (5.27)$$

e o balanço de massa na partícula

$$\frac{d\psi}{d\tau} = - \frac{\lambda C_0^2 \left( \frac{\beta}{1-\beta} \right)}{\left( \beta + \frac{q_m k_d}{(k_d + C_0 \psi)^2} \right)} (\xi - \psi) \quad (5.28)$$

e condição inicial

$$\tau = 0, \quad \psi = 0 \quad (5.29)$$

O conjunto de Equações (5.23) e condições (5.24), (5.25) e (5.26), juntamente com as Equações (5.27) e condição inicial (5.28), depois de discretizadas em  $y$  formam um conjunto de equações diferenciais ordinárias e algébricas do tipo DAE utilizando-se do método de colocação ortogonal global descrito em VILLADSEN(1978) e FINLAYSON(1980).

Aplicando-se a discretização da variável  $y$  nas equações do sistema DAE, através do método de colocação ortogonal na Equação (5.23), tem-se:

$$\frac{d\xi_j}{d\tau} = \sum_{k=1}^{N+2} B_{jk} \xi_k - Pe \sum_{k=1}^{N+2} A_{jk} \xi_k + \lambda (\xi_j - \psi_j) \quad j = 2 \dots N \quad (5.30)$$

nas condições de contorno

$$\sum_{k=1}^{N+2} A_{jk} \xi_k = Pe (\xi_j - 1) \quad j = 1 \quad (5.31)$$

e

$$\sum_{k=1}^{N+2} A_{jk} \xi_k = 0 \quad j = N + 2 \quad (5.32)$$

e na condição inicial

$$\tau = 0, \quad \xi_j = 0, \quad \psi_j = 0 \quad j = 1 \dots N + 2 \quad (5.33)$$

na partícula, tem-se:

$$\frac{d\psi_j}{d\tau} = - \frac{\lambda C_0^2 \left( \frac{\beta}{1-\beta} \right)}{\left( \beta + \frac{q_m k_d}{(k_d + C_0 \psi_j)^2} \right)} (\xi_j - \psi_j) \quad (5.34)$$

e condição inicial

$$\tau = 0, \quad \psi = 0 \quad (5.35)$$

Nas equações acima,  $A_{jk}$  e  $B_{jk}$ , representam as matrizes dos pontos de colocação ortogonal e estes pontos distribuídos no domínio  $0 \leq y \leq 1$ .

A solução do sistema de equação diferenciais ordinárias e algébricas constituídos pelas equações acima foram resolvidas simultaneamente, sendo que as equações diferenciais ordinárias foram resolvidas pelo método numérico de Runge Kutta de 4ª ordem. O algoritmo computacional foi composto das rotinas para solução das equações diferenciais e associado à rotina de otimização multivariável não-linear, método do complexo, elaborado por BOX (1965). Desta forma obteve-se os valores otimizados dos coeficientes de filme no líquido,  $k_l$ , e coeficiente de dispersão axial,  $D_{ax}$ , que minimizasse a função objetivo definida como somatório dos quadros dos desvios entre os valores

experimentais e calculados no modelo  $\{FO = \sum_{i=1}^N (C_{exp}(i) - C_{Cal}(i))^2\}$ .

O algoritmo computacional, composto pela subrotina de otimização, é inicializado através de correlações para o coeficiente global de transferência de massa,  $k_1$ , avaliado pela expressão de DWIVEDI e UPADHYAY (1977). Esta correlação é recomendada nas operações de leitos fixos ou leitos expandidos para operações com  $Re < 10$ .

$$k_1 = \frac{1,1068 \cdot u}{\varepsilon} Re^{-0,72} Sc^{(2/3)} \quad (5.36)$$

em que  $k_1$  é o coeficiente global de transferência de massa ( $m \cdot s^{-1}$ ),  $\varepsilon$  é a porosidade do leito de partículas,  $u$  é a velocidade linear ( $m \cdot s^{-1}$ ),  $Re$  é o número adimensional de Reynolds ( $\frac{\rho u d_p}{\mu}$ ) e  $Sc$  é o número Schmidt ( $\frac{\mu}{\rho u d_p}$ ).

A dispersão axial é obtida por análise do momento de 2ª ordem central, através de experimentos com aplicação de um pulso traçador de dextrana 'blue' contendo 1M de NaCl, conforme descrito no Capítulo 4 (item 4.5). A expressão que relaciona a variância reduzida,  $\sigma^2$ , é demonstrada no Anexo B (Equação B.21), utilizando um traçador em condições que não seja adsorvido no leito de partículas. Tem-se:

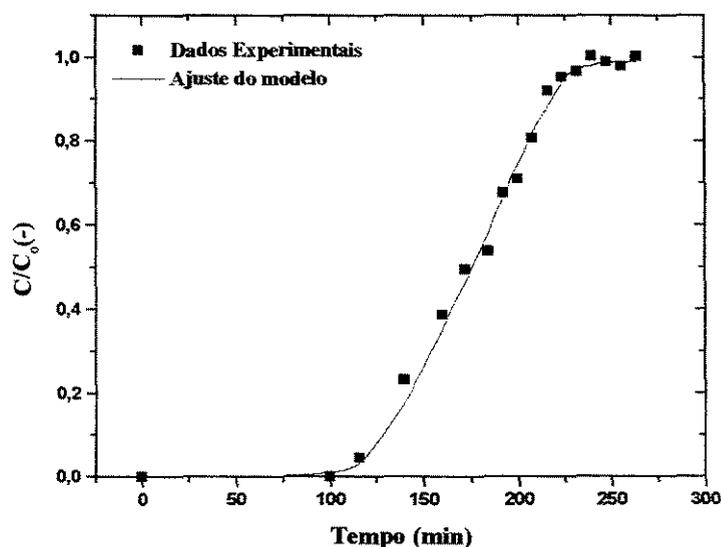
$$\frac{\sigma^2 - \left(\frac{t_0^2}{12}\right)}{2 \left(\frac{L\varepsilon}{u_0}\right)} = \frac{D_{ax}}{\varepsilon} \frac{1}{u_0^2} \quad (5.37)$$

A modelagem matemática, implementada em um programa computacional, foi usada para ajustar o modelo às curvas "breakthrough" experimentais dos sistemas Inulinases-CM-Sepharose-CL-6B e Inulinases-Accell Plus QMA. O objetivo a ser alcançado com o referido ajuste foi a obtenção dos coeficientes de transferência de massa,  $k_1$  e  $D_{ax}$  para os sistemas em estudo.

### 5.5.2.1. - Ajuste do Modelo Completo de Adsorção de Leito Fixo no Sistema Inulinases-CM-Sepharose

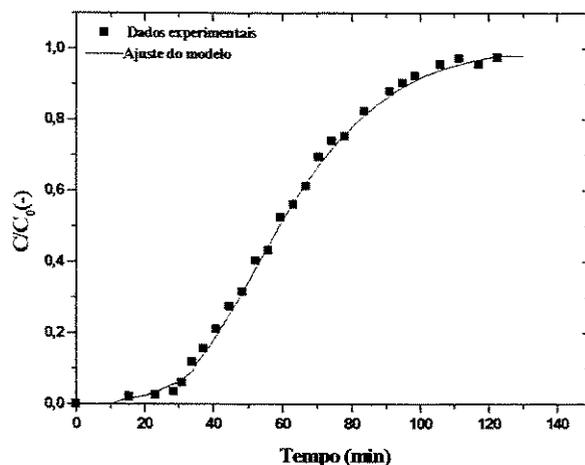
O ajuste matemático implementado pelos algoritmos computacionais foi usado para adequar o modelo às curvas “breakthrough” experimentais do sistema Inulinases-CM-Sepharose-CL-6B no tampão acetato de sódio (10 mM, pH 4,1). Através da utilização dos parâmetros: isoterma de equilíbrio ( $q_m = 4165,94 \text{ UA.mL}^{-1}.\text{g}^{-1}$  e  $k_d = 94,80 \text{ UA.mL}^{-1}$ ), porosidades do leito e das partículas ( $\varepsilon$ ,  $\beta$ ) e a difusividade efetiva ( $D_{ef}$ ).

Os dados experimentais apresentados na Figura 5.43 foram ajustados pelo modelo completo através da colocação ortogonal, sendo necessários 07(sete) pontos de colocação internos e os coeficientes do polinômio  $\alpha = 0$  e  $\beta = 0$ . Os valores dos parâmetros de transferência de massa obtidos pelo processo de otimização dos dados experimentais para a dispersão axial,  $D_{ax} = 0,455 \cdot 10^{-07} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$  e  $k_L = 0,104 \cdot 10^{-08} \text{ m.s}^{-1}$ . Esses valores apresentaram ordem de grandeza inferiores àqueles estimados inicialmente através das Equações (5.36) e (5.37).

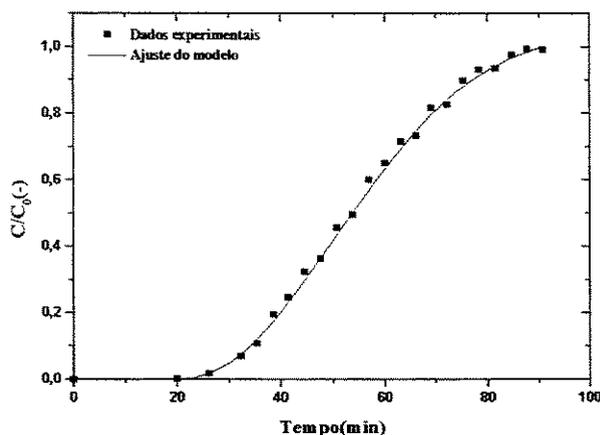


**Figura 5.43** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais coluna HR 5/10: leito de 8 cm e 300 mg,  $C_0 = 15,6 \text{ UA mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ .

As Figura 5.44 e 5.45 apresentam os ajustes do modelo completo aos dados experimentais do processo de adsorção no fluxo de  $0,35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e  $0,65 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .



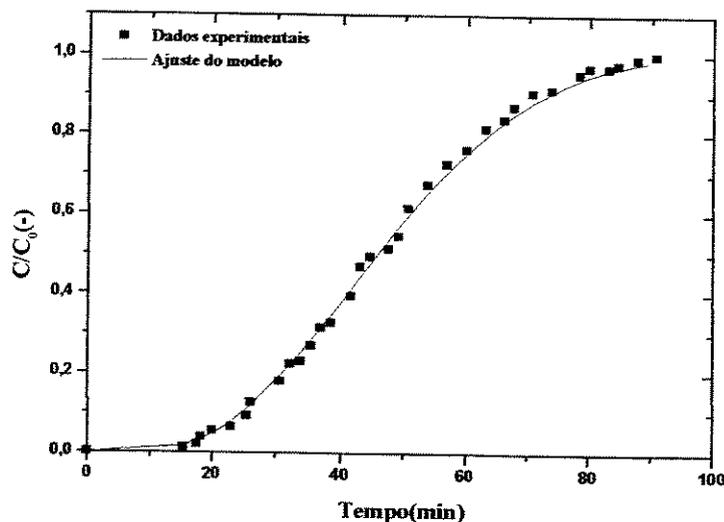
**Figura 5.44** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinas-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais coluna HR 5/10: leito de 8 cm e 300 mg,  $C_0 = 11,5 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $0,35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .



**Figura 5.45** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinas-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais coluna C 10/20: leito de 3 cm e 3,2 g,  $C_0 = 25 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $0,65 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

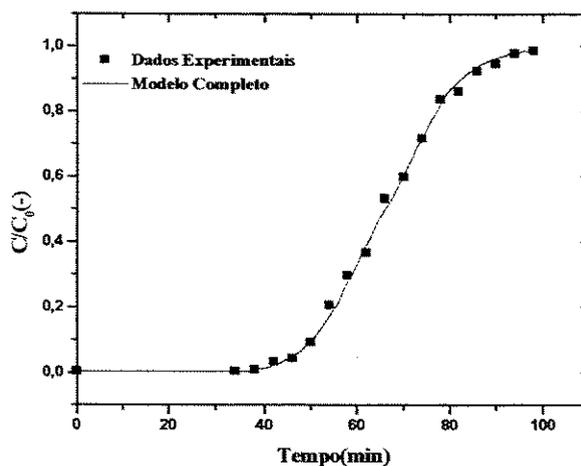
Os dados experimentais apresentados nas Figuras 5.44 e 5.45 foram ajustados pelo modelo através da colocação ortogonal, sendo necessários 13 (treze) pontos de colocação internos, utilizando o mesmo polinômio. Os valores dos parâmetros de transferência de massa obtidos no processo de otimização dos dados experimentais para dispersão axial, foram  $0,51 \cdot 10^{-07}$  e  $0,685 \cdot 10^{-07} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  e  $k_L = 0,154 \cdot 10^{-08}$  e  $0,707 \cdot 10^{-09} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ .

A Figura 5.46 apresenta o ensaio de adsorção do sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B realizado na coluna C10/20 com leito fixo de 3 cm e 3,2 g de adsorvente.



**Figura 5.46** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais coluna C 10/20: leito de 3 cm e 3,2 g,  $C_0 = 27,6 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $0,75 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Os dados experimentais da Figura 5.46 foram ajustados pelo modelo completo através de 09(nove) pontos de colocação internos. Os parâmetros de transferência de massa:  $D_{ax} = 0,713 \cdot 10^{-07} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  e  $k_L = 0,87 \cdot 10^{-09} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ .



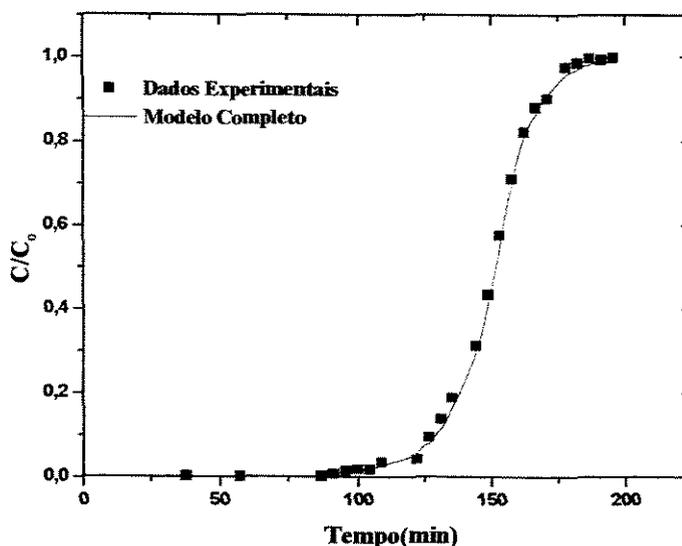
**Figura 5.47** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinases-CM-Sepharose CL-6B. Condições operacionais na coluna C 10/20: leito de 3 cm e 3,2 g,  $C_0 = 35,9 \text{ UA.mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ .

Os dados experimentais da Figura 5.47 foram ajustados pelo modelo completo através 11(onze) pontos de colocação internos e polinômio idêntico. Assim, obteve-se por otimização, os parâmetros de transferência de massa  $0,885 \cdot 10^{-07} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$  e  $0,91 \cdot 10^{-09} \text{ m}.\text{s}^{-1}$ .

### 5.5.2.2. - Ajuste do Modelo de Completo de Adsorção de Leito Fixo no Sistema Inulinases-Accell Plus QMA

O ajuste matemático implementado pelos algoritmos computacionais foi usado para adequar o modelo às curvas “breakthrough” experimentais do sistema Inulinases-Accell Plus QMA no tampão tris-HCl (30 mM, pH 7,5). Através da utilização dos parâmetros: isoterma de equilíbrio ( $q_m = 7783,25 \text{ UA.mL}^{-1}.\text{g}^{-1}$  e  $k_d = 1,61 \text{ UA.mL}^{-1}$ ), porosidades do leito e das partículas ( $\epsilon$ ,  $\beta$ ) e a difusividade efetiva ( $D_{ef}$ ).

Na Figura 5.48 é apresentado o ajuste do modelo completo no ensaio de adsorção executado na coluna HR 5/2 e fluxo volumétrico mantido  $0,45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .



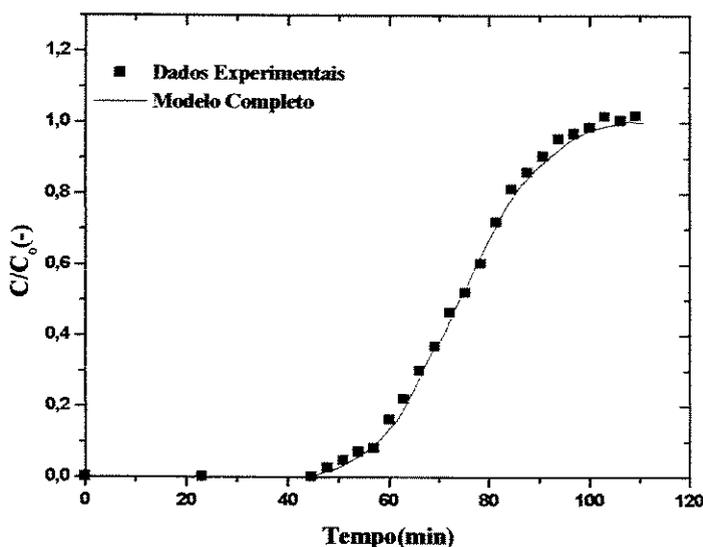
**Figura 5.48** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no Inulinases-Accell Plus QMA. Condições operacionais coluna HR 5/2: leito de 3 cm e 100 mg,  $C_0 = 78,9 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $0,45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Os dados experimentais da Figura 5.48 foram ajustados pelo modelo completo através 15 (quinze) pontos de colocação internos e utilizando polinômio com coeficientes  $\alpha = \beta = 0$ . Os parâmetros de transferência de massa obtidos foram  $D_{ax} = 0,513 \cdot 10^{-07} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  e  $k_L = 0,201 \cdot 10^{-09} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ .

A Figura 5.49 apresenta a curva do modelo completo ajustada aos dados da curva de “breakthrough” experimental obtida no processo de adsorção da solução enzimática de  $68,6 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$  no leito fixo de 3 cm na coluna HR 5/2 e fluxo de  $0,65 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Os dados experimentais da Figura 5.49 permitiram através da utilização do método da colocação ortogonal um ajuste satisfatório com 09 (nove) pontos de colocação internos. Sendo utilizado o mesmo polinômio de coeficientes  $\alpha = \beta = 0$  e os parâmetros de

transferência de massa otimizados foram numericamente iguais  $0,617 \cdot 10^{-07} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  e  $0,37 \cdot 10^{-09} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ .

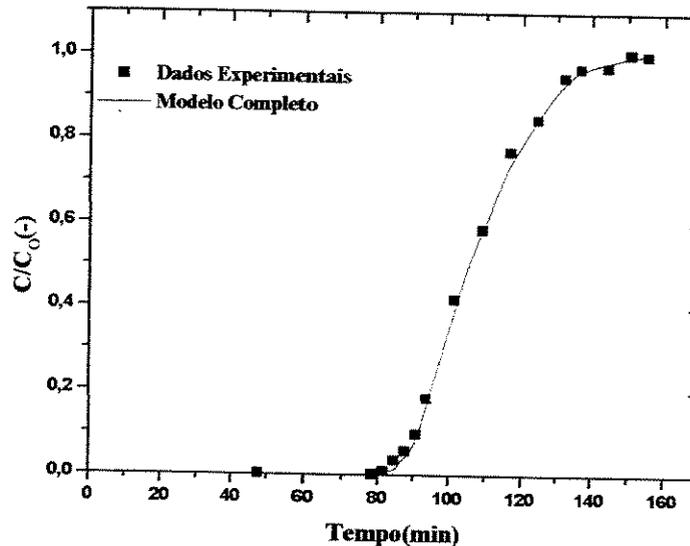


**Figura 5.49** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no Inulinases-Accell Plus QMA. Condições operacionais coluna HR 5/2: leito de 3 cm e 100 mg,  $C_0 = 105 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$  e fluxo volumétrico de  $0,65 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### 5.5.2.3. - Ajuste do Modelo de Completo de Adsorção de Leito Expandido no Sistema Inulinases-Accell Plus QMA

Os resultados dos ajuste das curvas de “breakthrough” nas operações em leito fluidizado (expandido) do sistema Inulinases-Accell Plus QMA seguiram a mesma metodologia utilizada nos processos de leito fixo. O algoritmo de modelagem e otimização foi baseado no método da colocação ortogonal e otimização múlti-variável sendo inicializado a partir das expressões (5.36) e (5.37).

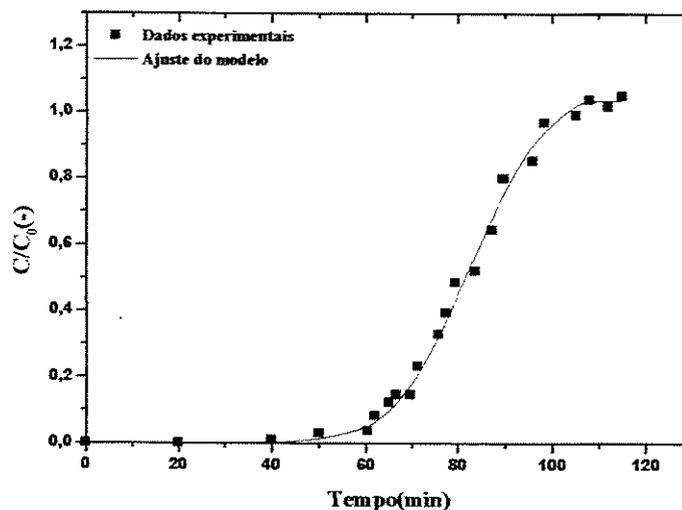
A Figura 5.50 apresenta os dados experimentais do processo de adsorção em leito expandido à altura de 4,4 cm e porosidade do leito estimada,  $\varepsilon = 0,79$  e a curva ajustada do modelo completo.



**Figura 5.50** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinases-Accell Plus QMA. Condições operacionais coluna C 10/20: leito de partículas 700 mg, altura do leito expandido  $H_{ex} = 4,4$  cm,  $C_0 = 98,8$  UA.mL<sup>-1</sup> e fluxo volumétrico de 0,65 mL min<sup>-1</sup>.

Os dados experimentais da Figura 5.50 foram ajustados por aplicação do método da colocação ortogonal através da utilização de 11 (onze) pontos de colocação internos e os coeficientes do polinômio ( $\alpha = 0$ ,  $\beta = 0$ ). Os valores dos parâmetros de transferência de massa obtidos no processo de otimização dispersão axial  $D_{ax} = 0,8475 \cdot 10^{-07}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> e o coeficiente global de transferência de massa no filme líquido,  $k_L = 0,95 \cdot 10^{-09}$  m.s<sup>-1</sup>.

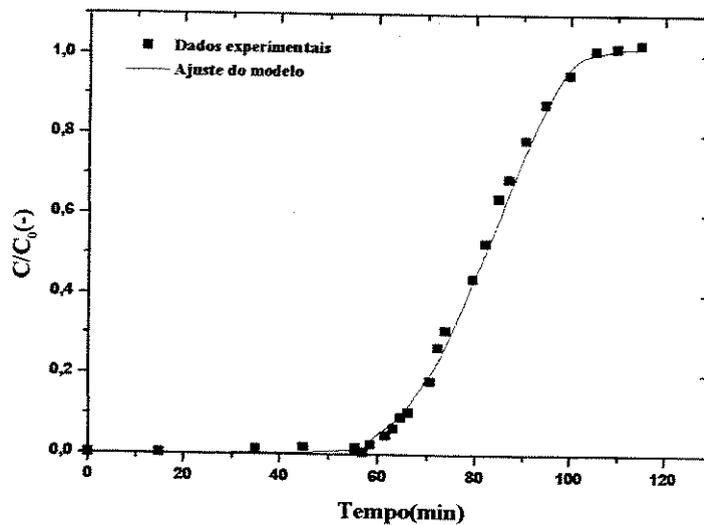
A Figura 5.51 apresenta a curva de “breakthrough” obtida no ensaio de adsorção em leito expandido, quando submetido ao fluxo volumétrico de 0,75 mL.min<sup>-1</sup> e expansão de 4,7 cm, porosidade do leito  $\varepsilon = 0,81$ .



**Figura 5.51** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinases-Accell Plus QMA. Condições operacionais coluna C 10/20: leito de partículas 700 mg, altura do leito expandido  $H_{ex}=4,7$  cm,  $C_o= 93,8$  UA.mL<sup>-1</sup> e fluxo volumétrico de 0,75 mL min<sup>-1</sup>.

Os dados experimentais da Figura 5.51 foram ajustados utilizando 13 (treze) pontos internos de colocação e com mesmo polinômio ( $\alpha = \beta = 0$ ). Os parâmetros de transferência de massa obtidos pelo processo de otimização,  $D_{ax} = 0,787 \cdot 10^{-07}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> e  $k_L = 0,13 \cdot 10^{-8}$  m.s<sup>-1</sup>,

Por fim, tem-se o ajuste do modelo completo ao conjunto de dados experimentais apresentados na Figura 5.52, resultantes do processo de adsorção após expansão do leito na coluna C10/20 à altura de 5,7 cm e porosidade do leito de  $\varepsilon = 0,84$ .



**Figura 5.52** - Curva de “breakthrough” experimental e ajustada pelo modelo completo no sistema Inulinas-Accell Plus QMA. Condições operacionais coluna C 10/20: leito de partículas 700 mg, altura do leito expandido  $H_{ex}=5,7$  cm,  $C_o = 117,7$  UA.mL<sup>-1</sup> e fluxo volumétrico de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

Observa-se, na Figura 5.52, que o modelo proposto ajusta bem os dados experimentais e o comportamento obtido por aplicação da discretização das equações do sistema por colocação ortogonal através de 11 (onze) pontos internos de colocação e mantido os mesmos coeficientes do polinômio. Os parâmetros de transferência de massa  $D_{ax} = 0,975 \cdot 10^{-07}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> e  $k_L = 0,157 \cdot 10^{-8}$  m.s<sup>-1</sup>.

## CAPÍTULO 6

### 6. - Resultados e Discussão: Separação das Inulinases

#### 6.1 - Introdução

Várias tentativas foram realizadas para separar as inulinases através da adsorção com os trocadores iônicos CM-sepharose CL-6B e Accell Plus QMA, utilizando colunas de leito fixo ou expandido.

Embora os adsorventes escolhidos tenham proporcionado um desempenho bastante satisfatório na adsorção da mistura Fructozyme<sup>®</sup>, o processo de eluição por gradiente salino não foi capaz de separar as enzimas presentes na mistura, apresentando após o processo de eluição por gradiente, uma fração (pico) contendo ainda a mistura de enzimas exo-inulinases e endo-inulinases.

Dentro das disponibilidades existentes no laboratório, foram utilizadas duas alternativas para se atingir a separação das enzimas, a partir das etapas posteriores ciclos de adsorção, lavagem e eluição com os adsorventes estudados.

- A primeira alternativa, foi baseada na metodologia experimental do trabalho realizado por Ettabili e Baratti(1987), em que os autores utilizaram como etapa finalizadora a cromatografia por troca iônica em coluna do tipo Mono Q, condicionada em solução tampão de trietanolamina (20mM, pH 8,5) e eluição com solução tampão contendo 1M de NaCl.

- A segunda alternativa, foi a utilização da cromatografia por permeação em gel Sephacryl HR-100 condicionada em tampão acetato de sódio (10 mM, pH 4,1).

Os resultados obtidos nos processos adicionais por cromatografia em coluna Mono Q e cromatografia de permeação em gel Sephacryl S100 HR, foram analisados através da produção de açúcares a partir da reação de hidrólise enzimática por análise

cromatográfica, e também por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes com SDS (SDS-PAGE).

## **6.2. – Processo de Polimento por Cromatografia em Coluna Analítica do Tipo Mono Q**

### **6.2.1. – Resultado da Análise Cromatográfica por Adsorção em Coluna Mono Q**

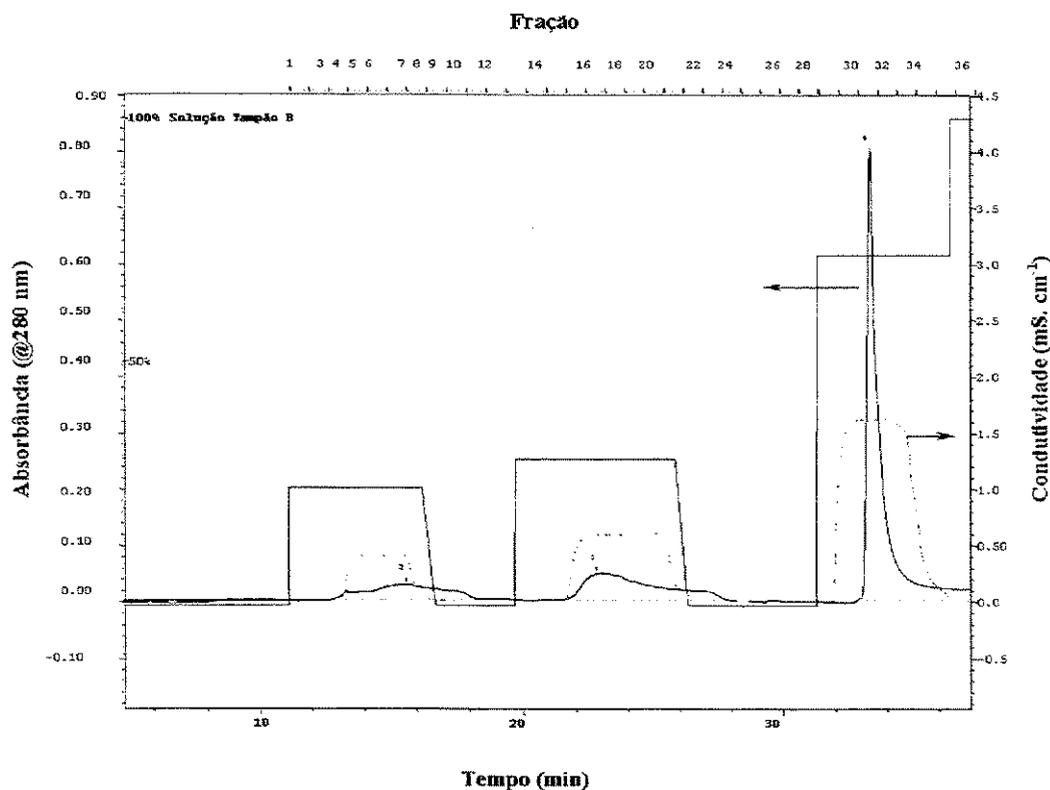
A coluna HR5/5 Mono Q, é uma coluna de troca iônica (aniônica) com alta resolução, sendo recomendada para aplicações de separação de proteínas, peptídeos, polinucleotídeos e outras biomoléculas. O adsorvente apresenta-se fortemente aniônico e tem uma curva de distribuição de tamanho de partículas muito estreita com diâmetro médio de 10  $\mu\text{m}$ . Desta forma, este adsorvente apresenta uma alta eficiência na separação de biomoléculas avaliada pelo NPT (números de pratos teóricos por metros) superior a 25000 (PHARMACIA, 1994).

As frações eluídas e provenientes dos processos de adsorção por leito fixo ou expandido nas colunas, contendo os adsorventes CM-Sepharose CL-6B e Accell Plus QMA, foram agrupadas no “pool” e dessalinizadas através da coluna PD-10<sup>®</sup> (PHARMACIA), contendo o gel Sephadex G-25. Objetivando a preparação de amostra, condicionando na solução tampão de trietanolamina-HCl (20 mM, pH 8,5) para ser injetada na coluna Mono Q.

Foram realizadas cromatografias baseadas no procedimento experimental de ETTALIBI e BARATTI (1987). Através da eluição por gradiente, os resultados apresentados nestas cromatografia indicaram a existência de frações (picos) distintas.

Porém, através do procedimento de eluição por gradiente salino 0-0,35 M de NaCl, seguido por outro gradiente 0,35 - 1 M de NaCl, os picos se apresentavam com baixa resolução. Desta forma, realizou-se modificações no procedimento de eluição descrito por ETTALIBI e BARRATTI (1987), objetivando melhorar a resolução cromatográfica.

A otimização do procedimento de eluição foi atingida com a realização da eluição por degraus de 22%, 35 % e 75% obtidos com a utilização das soluções tampão trietanolamina-HCl (20 mM , pH 8,5) (tampão A) e trietanolamina-HCl (20 mM , pH 8,5) contendo 1 M de NaCl (tampão B). A partir deste procedimento foi possível a obtenção de frações separadas, contendo as enzimas nas frações (7 e 8), frações (17, 18 e 19) e frações (31 e 32), sendo designadas M1, M2 e M3. A Figura 6.1, apresenta o perfil cromatográfico da eluição na coluna Mono Q, a partir da injeção do 'pool' da eluição proveniente da adsorção em colunas com os adsorventes CM-Sepharose CL-6B e Accell Plus QMA.



**Figura 6.1** - Cromatograma de adsorção de inulinases em coluna mono Q: injeção do pool eluído dos processos de adsorção com CM-Sepharose CL-6B e Accell Plus QMA.

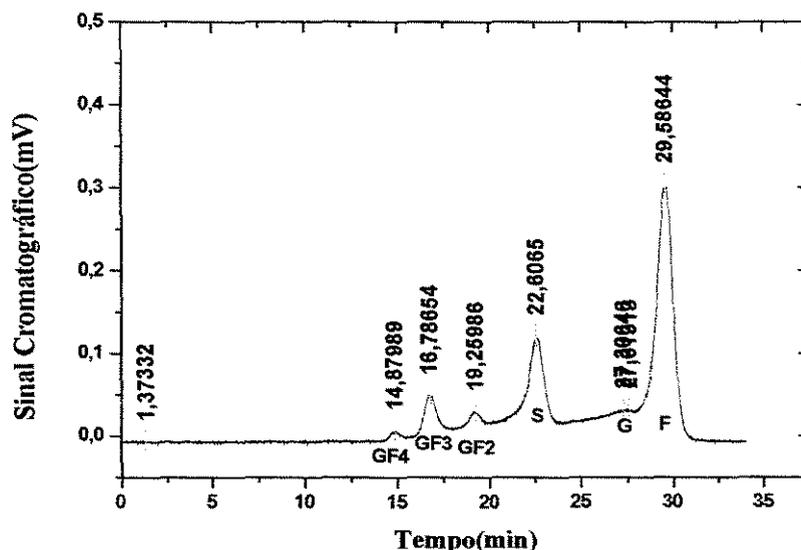
As frações coletadas foram submetidas à análise de açúcar redutor pelo método do DNS, apresentando os valores de atividade enzimática em torno de  $2,7 \text{ UA.mL}^{-1}$  na

fração M1 (degrau 22% tampão B), em torno de  $4,5 \text{ UA.mL}^{-1}$  na fração M2 (degrau 35% tampão B) e, na fração M3, o valor médio de  $6 \text{ UA.mL}^{-1}$  (degrau de 75% tampão B).

### 6.2.2. - Resultados da Análise dos Açúcares Produzidos por Hidrólise das Frações Coletadas da Cromatografia na Coluna Mono Q.

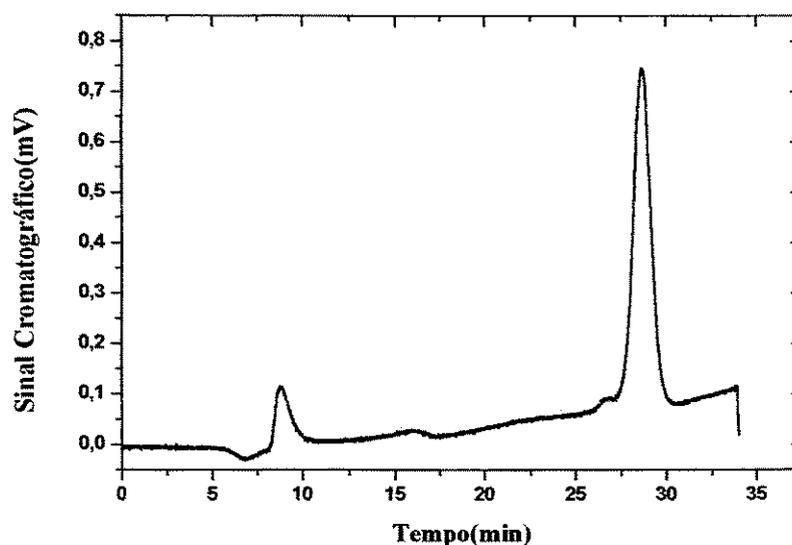
As frações separadas no processo de adsorção por troca iônica em coluna Mono Q, foram utilizadas no processo de hidrólise enzimática por incubação da inulina à temperatura de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  e período de 1 h, conforme descrito no Capítulo 4 (item 4.3.5). Os produtos foram analisados por cromatografia líquida na coluna Phenomenex RSO Oligosaccharide, operando com fase móvel água e fluxo volumétrico de  $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$  sob temperatura controlada de  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A Figura 6.2 apresenta o cromatograma da mistura sintética FOS-S-F com os respectivos tempo de retenção dos açúcares GF4, GF3, GF2, S, G e F.



**Figura 6.2** - Cromatograma da mistura FOS - S - F (32,04-39,76-28,20 %), componentes frutossil nistose(GF4), nistose(GF3), kestose(GF2), sacarose (S), glicose(G) e frutose(S).

O cromatograma, apresentado na Figura 6.2, é composto pela mistura sintética de FOS (glicose - 0,1%, frutose - 0,1%, sacarose - 3,6%, kestose - 43,05%, nistose - 45,44% e frutossil nistose - 7,68%), sacarose(S) e frutose(F) nas proporções mássicas de FOS(32,04%), S(39,76%) e F(28,20%). A análise dos produtos pela hidrólise enzimática do substrato inulina através da fração M1, após incubação é apresentada na Figura 6.3,



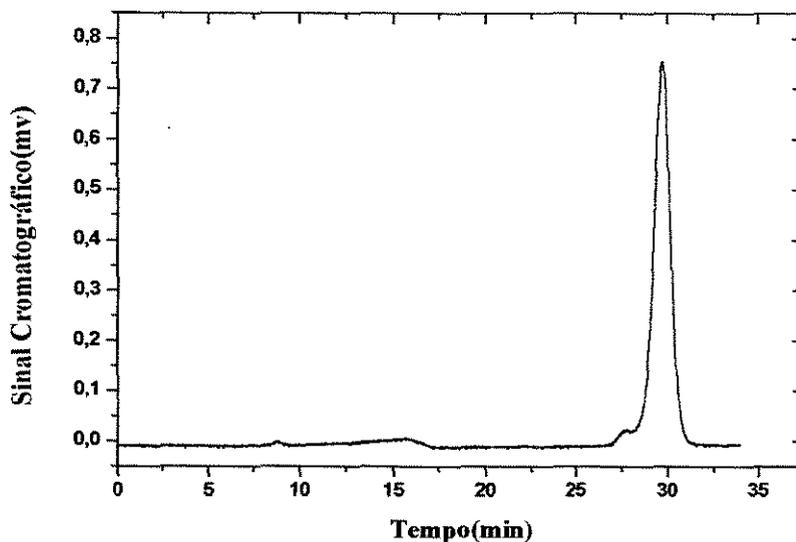
**Figura 6.3** - Cromatograma dos produtos da hidrólise enzimática da inulina(4%), a partir da fração M1 coletada da cromatografia analítica em coluna Mono Q.

Observa-se na Figura 6.3, há existência de dois produtos provenientes da hidrólise enzimática da inulina pela fração M1. A comparação entre os tempos de retenção dos compostos presentes na Figura 6.2 e dos produtos do cromatograma da Figura 6.3, revelou que foi produzido algum açúcar com massa molecular superior ao componente GF4 (mistura FOS-S-F), como também, a frutose.

Desta forma, pode-se afirmar que na fração M1 estão coexistindo as duas enzimas endo-inulinase e exo-inulinase. E que os açúcares produzidos pela ação

enzimática da endo-inulinase na fração, podem ter sido convertidos em frutose por ação da enzima exo-inulinase.

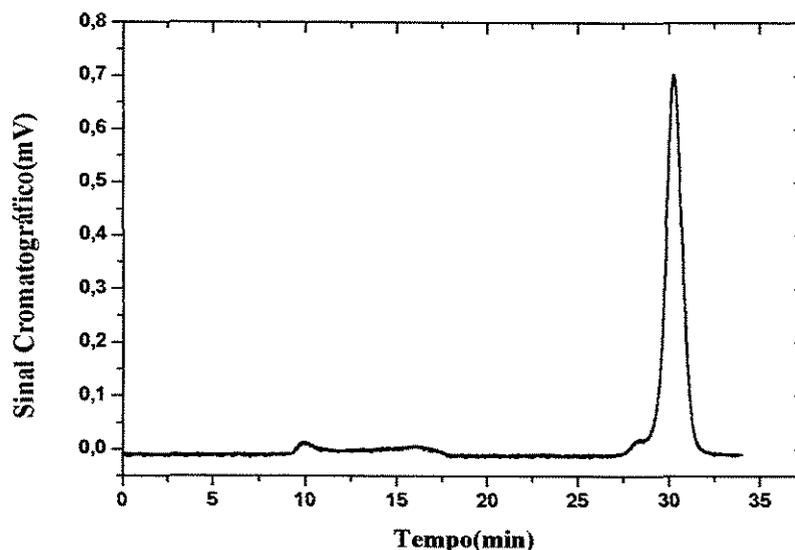
O resultado do produto da hidrólise enzimática do substrato inulina através da ação da(s) enzima(s) presente na fração M2, é apresentado na figura abaixo.



**Figura 6.4** - Cromatograma dos produtos da hidrólise da inulina a partir da fração M2, coletada da cromatografia analítica em coluna Mono Q.

O resultado após análise cromatográfica apresentado na Figura 6.4, revelou a produção única de frutose comparando com o tempo de retenção no cromatograma da mistura FOS-S-F, Figura 6.2. Não é possível fazer qualquer afirmação sobre a existência única da exo-inulinase nesta fração, pois a coexistência dos dois tipos é possível e os produtos da hidrólise enzimática pela enzima endo-inulinase, pode ser outra vez hidrolisado por uma enzima do tipo exo-inulinase e conseqüentemente produzir frutose.

Na Figura 6.5, é apresentada o cromatograma da análise do produto proveniente da hidrólise enzimática da enzima presente na fração M3 sobre a inulina, por período de incubação de 1h.



**Figura 6.5** - Cromatograma dos produtos da hidrólise da inulina a partir da fração M3, coletada da cromatografia analítica em coluna Mono Q.

O resultado na Figura 6.5, revelou a produção única de frutose comparando com o tempo de retenção no cromatograma da mistura FOS-S-F, Figura 6.2.

Conclui-se que as análises dos produtos da hidrólise enzimática das frações coletadas, após eluição da coluna Mono Q, mostraram que existem enzimas distintas nas frações. Isto, foi analisando os produtos formados pela ação enzimática das frações sobre o substrato de inulina (4%).

E que o processo de eluição definido anteriormente para coluna Mono Q, se mostrou satisfatório em termos de separação das enzimas comparado com as eluições obtidas por gradiente linear nos leitos fixo com adsorventes CM-Sepharose CL-6B e Accell Plus QMA e também na adsorção por leito expandido com o adsorvente Accell Plus QMA.

Nesses processos a eluição por gradiente apresentou uma única fração (pico), contendo uma mistura com as duas enzimas, e que após o processo de hidrólise

enzimática do substrato pela ação da enzima na fração, a análise cromatográfica dos açúcares gerados apresentava apenas formação de frutose.

### **6.3. - Processo de Polimento por Cromatografia de Permeação em Gel Sephacryl S 100 HR.**

A utilização da cromatografia por permeação em gel, apresenta-se geralmente como uma das técnicas de finalização de processo para purificação de enzimas. Essa técnica explora a propriedade de tamanho das moléculas e tem como características: baixa seletividade, baixa resolução e alto rendimento. Sendo uma técnica de baixo custo, necessita de amostra com composição protéica elevada e pequeno volume (HARRIS, 1995).

As amostras da etapa de eluição provenientes dos processos cromatográficos de análise frontal dos sistemas Inulinases-CM-Sepharose CL-6B e Inulinases-Accell Plus QMA, foram reunidas no “pool” e dessalinizadas em colunas PD-10 com gel Sephadex G-25 M sendo condicionadas em solução tampão de acetato de sódio (10 mM, pH 4,1).

O “pool” das frações foi injetado na coluna empacotada de gel Sephacryl S-100 HR com volume aproximado de 44 mL e fluxo volumétrico de  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Sendo que, o gel Sephacryl S-100 HR tem capacidade de exclusão de proteínas globulares numa faixa de fracionamento entre 1 até 100 kDa.

Na Figura 6.6, é apresentado o cromatograma do processo de cromatografia por permeação em gel Sephacryl S-100 HR, no qual é identificado frações com atividade enzimática. As frações (17 a 24), foram agrupadas e designadas F22 e as frações 31 até 33, designadas de F32.

A análise de atividade enzimática, mostrou que as frações separadas F22 apresentaram uma concentração em torno de  $7,5 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$  e para a fração F32 em torno de  $1,5 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

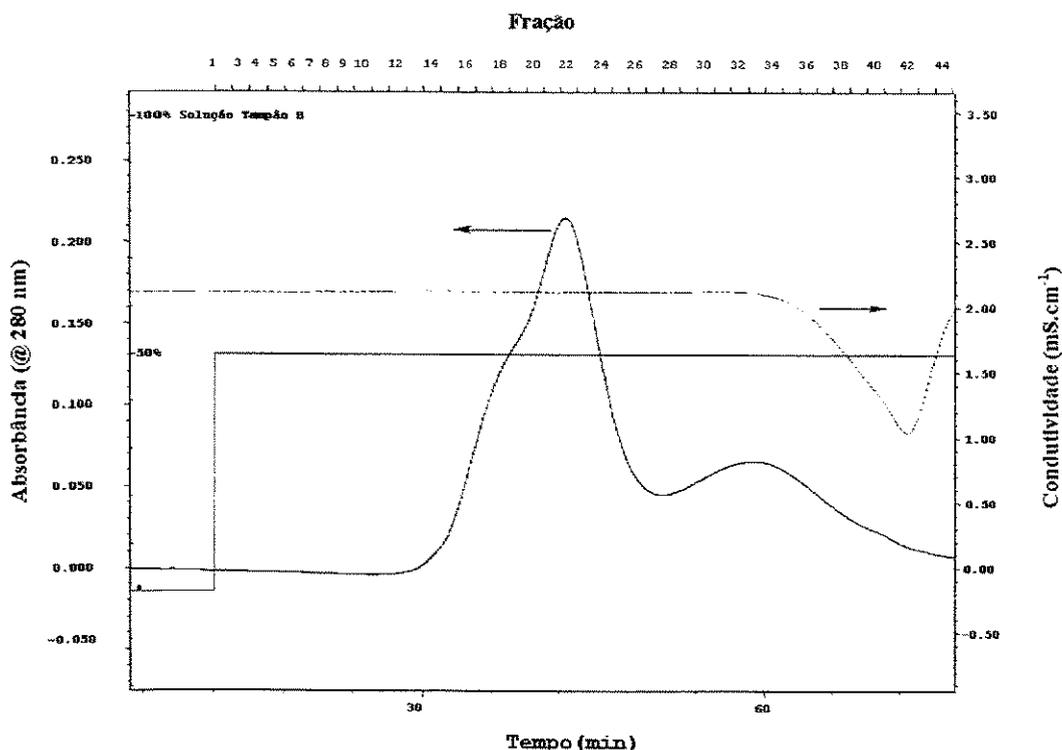
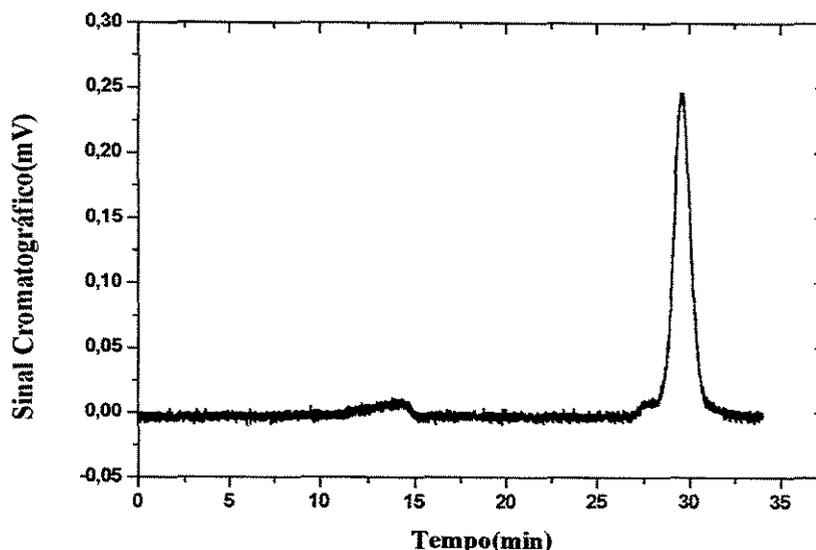


Figura 6.6 - Cromatograma da exclusão em gel Sephacryl S-100 HR, amostra injetada proveniente da eluição do sistema inulinases-Accell Plus QMA.

### 6.3.1 – Resultados da Análise dos Açúcares Produzidos pela Hidrólise das Frações Coletadas da Cromatografia por Permeação em Gel.

As frações, separadas pelo processo de cromatografia por permeação em gel Sephacryl S-100 HR, foram submetidas a hidrólise enzimática, conforme procedimento descrito no Capítulo 4 (item 4.3.5). Sendo, os produtos formados da hidrólise enzimática analisados por cromatografia líquida em coluna Phenomenex RSO Oligosaccharide.

Na Figura 6.7, é apresentado o cromatograma dos açúcares produzidos a partir da hidrólise enzimática do substrato inulina por ação da(s) enzima(s) presente na fração F22 sob o substrato inulina (4%),

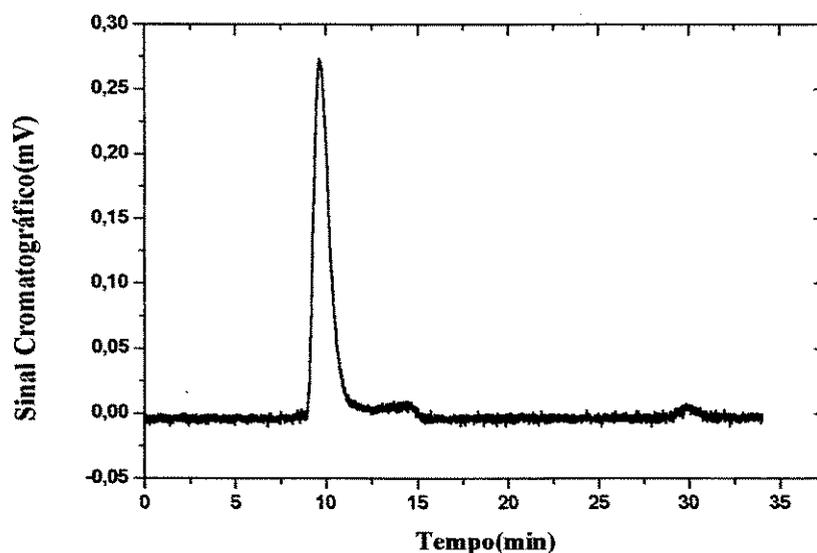


**Figura 6.7** - Cromatograma do produto formado pela hidrólise da inulina a partir da ação da(s) enzima(s) presente na fração F22, coletada na cromatografia por permeação em gel Sephacryl S 100 HR.

O cromatograma, Figura 6.7, apresentou um único produto, que comparando os tempos de retenções dos picos da mistura sintética Figura 6.2, identifica-se como frutose o açúcar formado pela hidrólise enzimática do substrato pela ação do 'pool' F22.

Uma análise posterior desta fração por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturante com SDS (SDS-PAGE), poderá identificar a existência da enzima isolada ou se encontra a mistura de enzimas.

Na Figura 6.8, é apresentado o cromatograma obtido da hidrólise enzimática da fração F32 sob o substrato inulina (4%),



**Figura 6.8** - Cromatograma do produto da hidrólise da inulina a partir da fração F32, coletada da cromatografia por permeação em gel Sephacryl S 100 HR.

O cromatograma apresentado na Figura 6.8, comparado com os tempos de retenções da mistura FOS-S-F na Figura 6.1, mostra que a enzima presente na fração F32 apresentou apenas um produto da reação enzimática e que o mesmo é um açúcar com massa molecular superior ao GF4 (presente na mistura FOS-S-F). Desta forma, pode-se afirmar que esta fração apresenta a enzima do tipo endo-inulinase.

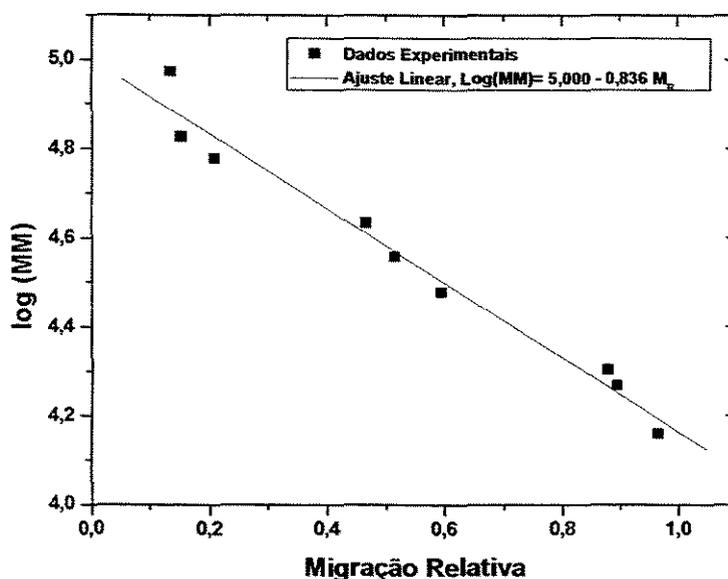
#### **6.4. - Determinação da Massa Molecular das Enzimas Purificadas**

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS) foi desenvolvida para determinação da massa molecular das enzimas purificadas e avaliação do perfil das proteínas após a etapa de polimento por cromatografia em gel Sephacryl S 100 HR.

A massa molecular das enzimas, foram estimadas utilizando uma curva de calibração, apresentada na Figura 6.9, construída com a distância percorrida pelas proteínas padrões versus o logaritmo das massas moleculares conforme Tabela 6. 1.

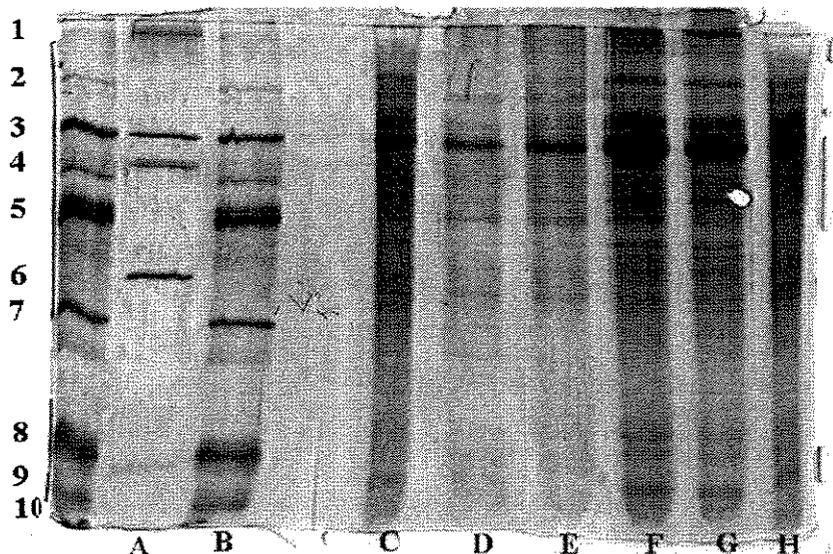
**Tabela 6.1** - Massa molecular das proteínas padrões e distância percorrida no gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

Proteínas	Massa Molecular (kDa)	Migração relativa
Fosforilase	94	0,137
Albumina do soro bovino	67	0,153
Catalase	60	0,209
Ovalbumina	43	0,467
Lactato desidrogenase	36	0,516
Anidrase carbônica	30	0,596
Inibidor de tripsina de soja	20,1	0,879
Ferritina	18,5	0,895
$\alpha$ -Lactoalbumina	14,4	0,967



**Figura 6.9.** - Curva de calibração de proteínas padrões e ajuste linear.

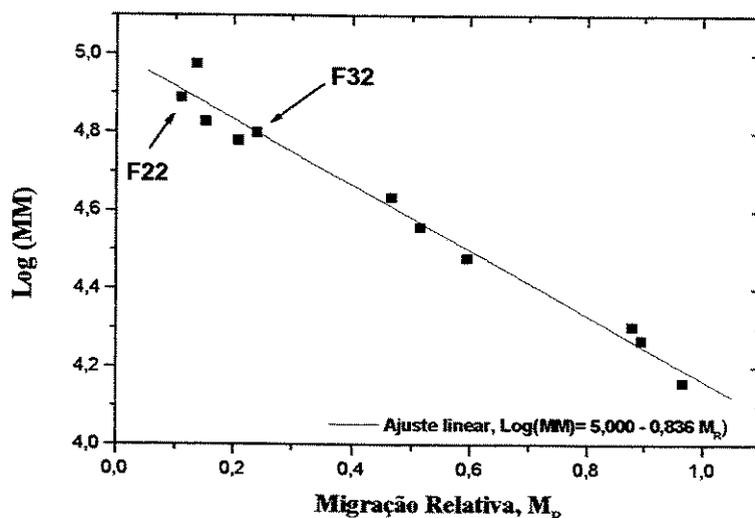
A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS) para as frações eluídas na cromatografia em permeação em gel Sephacryl S 100 HR, é apresentada na Figura 6.10.



**Figura 6.10** - Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS 12,5%. Faixas A e B proteínas padrões: 1A - Ferritina (220 kDa); 2B - Fosforilase B(94 kDa); 3A e 3B - Albumina de soro bovino (67kDa); 4A - Catalase (60 kDa); 5B - Ovoalbumina (43 kDa); 6A - Lactato desidrogenase (36 kDa); 7B - Anidrase carbônica (30 kDa), 8B - Inibidor de tripsina de soja (20,10 kDa); 9A - Ferritina (18,5 kDa) e 10B -  $\alpha$ -Lactoalbumina (14,4 kDa). Faixa C e H, amostra injetada. Faixa D e E amostra eluída F32. Faixa F e G, amostra da fração eluída F22. Tempo de migração 58 min e voltagem 200 V.

Observa-se, na Figura 6.10, a existência de uma única banda na faixa D e E (fração F32) e nas faixas F e G (fração 22) revelam a presença de mais de uma enzima. De acordo com os cromatogramas dos açúcares produzidos após hidrólise enzimática nas Figuras 6.7 e 6.8, e pela eletroforese realizadas nas duas frações pode-se distinguir as enzimas distintas presentes nas frações F22 e F32. Sendo que, a fração F22, representa uma enzima do tipo exo-inulinase e a fração F32 uma endo-inulinase.

A estimação da massa molecular é possível pela curva de calibração obtida na Figura 6.9, e expressa por  $\text{Log (MM)} = 5,00 - 0,836 M_R$ . Na Figura 6.11 apresenta-se as frações de interesse (F22 e F32) plotadas na curva de calibração.



**Figura 6.11** - Curva de calibração de proteínas e frações de interesse F22 e F32.

Através da expressão do ajuste linear, tem-se que a fração F22 é uma exo-inulinase e possui uma massa molecular estimada em 70 kDa e a fração F32 64 kDa é uma enzima classificada como endo-inulinase.

As massas moleculares das enzimas purificadas apresentaram-se com valores semelhante aos encontrados na literatura, como nos trabalhos de AZHARI et al. (1989), que quantificaram as enzimas exo-inulinase e endo-inulinase, 81 kDa e 53 kDa, e como também no processo de purificação desenvolvido por ETTABILI e BARATTI (1987) as massas moleculares foram 74, 75 e 76 kDa nas exo-inulinases e 64 kDa nas endo-inulinases. Já, as massas moleculares obtidas por XIAO et al. (1989) apresentaram-se com 58 e 56 kDa. Os valores de 60 e 56 kDa foram encontrados por MUKHERJEE e SENGUPTA (1987) e que são inferiores aos obtidos no presente trabalho.

## CAPÍTULO 7

### 7. - Conclusões

A utilização dos adsorventes de troca iônica Accell Plus QMA (aniônica) e CM-Sepharose CL-6B (catiônica) no processo de adsorção de uma mistura comercial de enzimas inulinases, Fructozyme<sup>®</sup>, ofereceu um conjunto de conclusões delineadas a seguir:

- (1) Os adsorventes utilizados foram caracterizados com relação às seguintes propriedades: tamanho de partículas e distribuição de poros.
- (2) Os dados de equilíbrio conduziram a isotermas de adsorção que foram ajustadas pelo modelo de Lagmuir.
- (3) A cinética de adsorção foi avaliada experimentalmente através de ensaios de adsorção em tanques agitados.
- (4) O modelo matemático completo para a cinética de adsorção em tanques agitados permitiu quantificar os parâmetros de convecção externa e de difusão efetiva nos poros dos adsorventes.
- (5) O modelo completo para a adsorção em colunas conduziu ao ajuste das curvas experimentais de ruptura (“breakthrough”), permitindo assim a previsão do comportamento da adsorção de inulinases em colunas de adsorção.
- (6) Ciclos de adsorção, lavagem e eluição para o sistema constituído pela mistura de inulinases e pelos adsorventes Accell Plus QMA indicaram um fator de concentração médio das enzimas de 8 vezes, com uma recuperação de 52% da enzima originalmente presente.

No processo de purificação das inulinases foram utilizadas duas rotinas distintas:

- (I) Processo de purificação por cromatografia analítica em coluna Mono Q e (II) Processo

de permeação em gel Sephacryl S 100 HR. Algumas conclusões foram obtidas através desses processos, tais como:

- (1) O processo I apresentou enzimas eluídas e separadas nas frações E8, E17 e E32, porém não foi possível a identificação e classificação das enzimas presentes nas frações. Quando submetidas à hidrólise enzimática os produtos da reação, foram apenas identificados a existência de pelo menos enzimas doo tipo exo-inulinase nas frações.
- (2) No processo II as enzimas foram separadas com sucesso. As enzimas presentes nas frações, F22 e F32, foram classificadas como enzimas do tipo exo-inulinase e endo-inulinase. Está identificação foi possível através da análise cromatográfica dos produtos da hidrólise enzimática sob o substrato inulina, confrontando com a mistura FOS-Sacarose-Frutose.
- (3) A caracterização da massa molecular das enzimas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), revelou que a endo-inulinase purificada na fração F32 possui massa molecular estimada de 64 kDa e a exo-inulinase purificada na fração F22 foi estimada em 70 kDa.

## 7.1 - Sugestões para Trabalhos Posteriores

- (1) Elaboração de ensaios de adsorção com um extrato enzimático bruto produzido por uma cepa específica contendo material particulado;
- (2) Levantamento das condições ótimas da adsorção ( força iônica e pH ) no adsorvente Mono Q ou adsorventes com partículas inferiores a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetros;
- (3) Estudo da adsorção em colunas em leito fixo e expandido utilizando um modelo distribuído para quantificar isoladamente os coeficientes de transferência de massa na fase líquida externo e interno (nos poros);
- (4) Estudo da discretização dos modelos em tanques agitados e em colunas de adsorção por colocação ortogonal em elementos finitos.

## CAPÍTULO 8

### 8 - Referências Bibliográficas

- ARAÚJO, M. O. D. Adsorção de albumina de soro bovino em resinas trocadoras de íons, Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP, 1996.
- ARNOLD, F. H., BLANCH, H. W. e WILKE, C. R., Liquid chromatography plate height equations, *J. Chrom.*, 330, p. 159-166, 1985.
- ARVE, B. H. e LIAPIS, A. I., Modeling and analysis of biospecific adsorption in a finite bath, *AIChE J.*, v. 33, 2, p. 179-193, 1987.
- AZHARI, R. SZLAK, A. M., ILAN, E., SIDEMAN, S. e LOTAN, N. Purification and characterization of endo- and exo-inulinase, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 11, p. 105-117, 1989.
- BARTHOMEUF, C., REGERAT, F. e POURRAT, H. Production of inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum*, *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 6, p. 491-494, 1991.
- BATT, B. C., YABANNAVAR, V. M. e SINGH, V. Expanded bed adsorption process for protein recovery from whole mammalian cell culture broth, *Bioseparation*, 5, p. 41-52, 1995.
- BELAMRI, M., SASSI, H. A., SAVART, M., TANTAOUI-ELARAKI, A. e COTTIN, P. Purification and properties of an extracellular inulinase-like  $\beta$ -fructosidase from *Bacillus stearothermophilus*, *Letters Appl. Microbiol.*, 19, p. 410-413, 1994.

- BRAUNAUER, S., EMETT, P. H. e TELLER, F. Adsorption of gases in multimolecular layer, J. Am. Chem. Soc., 60, p. 309, 1938.
- BELUCHE, J., GUIRAUD, J. P. e GALZY, P. Study of inulase from *Debaryomyces cantarelli*. Folia Microbiol., 23, p. 32-39, 1980.
- BEVERLOO, W., PIERLIK, G. M. e LUYBEN, K. Fundamentals of adsorption (MYERS, L., BELFORT, G. eds.) Engineering Foundation, New York, p. 95, 1984.
- BLANCH, H. E CLARK, D. S. Biochemical Engineering, Marcel Dekker, 2 ed., New York, 1997.
- BOSCHETTI, E. Advanced sorbents for preparative protein separation purposes, J. Chrom., 658, p. 207-236, 1994.
- BOX, P., A New Method of Constrained optimization and a comparison with other methods, Computer Journal, v. 8, p. 42-52, 1965.
- BYUN, S. M. e NAHM, B. H. Purification and characterization of inulinase from *Kluyveromyces fragilis*, Korean Biochem. J., 10, p. 95-108, 1977.
- CARRÈRE, H., Extraction des proteines du lactoserum par chromatographie d'echange d'ions en lit fluidisé, These de Doutorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 1993.
- CHAPLIN, M. F. e BUCKEN, C. Enzyme Techonology, 1 ed., Cambridge Unv. Press, London, p. 265, 1990.
- CHASE, H. A. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography, J. Chrom., v. 297, p. 179-202, 1984.
- CHASE, H. A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds, Trends in Biotechnology, v. 12, p. 296-303, 1994.

- CLAESSENS, G., VAN LAERE, A. e DE PROFT, M. Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L. ). J. Plant. Physiol. 136, p. 35-39, 1990.
- COLLINS, C. H., BRAGA, G. L. e BONATO, P. S., Introdução a métodos cromatográficos, Editora da Unicamp, Campinas, p. 279, 1990.
- CRUZ, J. M. Adsorção de insulina em resinas trocadoras de íons utilizando leitos fixos e fluidizado, Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP, 1997.
- DECHOW, F. J. Separation and purification techniques in biotechnology. Noyes Publications, New Jersey, 1988.
- DRAEGER, N. M. e CHASE, H. A., Liquid fluidized bed for adsorption of protein in the presence of cells. Bioseparation, 2, p. 67-80, 1991.
- DRAEGER, N. M. e CHASE, H. A., Protein adsorption in liquid fluidized beds - Advances in Separation Processes, I. Chem. E. Symp. Series, 118, p. 161-172, 1991.
- DRAEGER, N. M. e CHASE, H. A. Liquid fluidized beds for protein purification. Trans. Inst. Chem. Eng., 69C, p. 45-53, 1991b.
- DRAEGER, N. M. e CHASE, H. A. Affinity purification of proteins using expanded beds. Journal of Chromatography, v.597, p. 129-145, 1992a.
- DRAEGER, N. M. e CHASE, H. A. Expanded-bed adsorption of proteins using ion-exchangers. Sep. Sci. Technol., 27, p. 2021-2039, 1992b.
- DERYCKE, D. G. e VANDAMME, E. J. Production and properties of *Aspergillus niger* inulinase. J. Chem. Technol. Biotechnol., 34B, p. 45-51, 1984.

- DEUTSCHER, M. P. Guide to protein purification. Series: Methods in enzymology, V. 182, Academic Press, San Diego, p. 849, 1990.
- DWIVEDI, P. N. e UPADHYAY, S. N. Particle-fluid mass transfer in fixed and fluidized beds. *Ind. Eng. Chem. Process Dev.*, v.16, 2, p. 125-130, 1977.
- ELYACHIOUI, M., HORNEZ, J. P. e TAILLIEZ, R. General properties of extracellular bacterial inulinase. *J. Appl. Bacteriol.* 73, p. 514-519, 1992.
- ETTALIBI, M. e BARATTI, J. C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinase and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, p. 13-20, 1987.
- ETTALIBI, M. e BARATTI, J. C. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases, *Agric. Biol. Chem.*, v. 54, p. 61-68, 1990.
- FINLAYSON, B. A., *Nonlinear analysis in chemical engineering*, McGraw-Hill, New York, 1980.
- FLOOD, A. E., RUTHERFORD, P. P. e WESTON, E. W. Effects 2:4 dichlorophenoxyacetic acid on enzyme systems in Jerusalem artichoke tubers and chicory roots. *Nature*, 214, p. 1049-1050, 1967.
- FURUSAWA, T., SUZUKI, M. e SMITH, J. M., Rate parameters in heterogeneous catalysis by pulse techniques. *Catal. Ver.-Sci. Eng.*, v. 13, 1, p. 43-76, 1976.
- GEANKOPLIS, C. J. *Transport process and unit operations*, Prentice-Hall, 3 ed., New Jersey, p. 921, 1993.
- GUPTA, A., K., SINGH, P. D., KAUR, N. e SINGH, R. Production, purification and immobilisation of inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 59, p. 377-385, 1994.

- GUPTA, A. K., RATHORE, P., KAUR, N. e SINGH, R. Production, thermal stability and immobilisation of inulinase from *Fusarium oxysporum*, J. Chem. Tech. Biotechnol., 47, p. 245-257, 1990.
- GUPTA, A. K., NAGPAL, B. KAUR, N., RATHORE, P. e SINGH, R. Properties of invertase from *Fusarium oxysporum*. Proc. Indian Nat. Sci. Acad., B55, p. 505-512, 1989.
- GROOTWASSINK, J. W. D. e FLEMING, S. E. Non-specific  $\beta$ -fructofuranosidase (inulinase) from *Kluyveromyces fragilis* : batch and continuous fermentation, simple recovery method and some industrial properties. Enzyme Microbiol. Technol., v. 2, p. 45-53, 1980.
- HARRIS, E. L. e ANGAL, S., Protein purification methods: a practical approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, p. 317, 1995.
- HANSSON, M., STAHL, S., HJORTH, R., UHLEN, M. e MOKS, T. Single-up recovery of a secreted recombinant protein by expanded bed adsorption, Bio/Technology, 12, p. 285-288, 1994.
- HORSTMANN, B. J., KENNEY, C. N. e CHASE, H. A. Adsorption of proteins on sepharose affinity adsorbents of varying particle size. J. Chrom., 361, p. 179-190, 1986.
- HORSTMANN, B. J. e CHASE, H.A., Modelling the affinity adsorption of immunoglobulin G to protein A immobilised to agarose matrices, Chem. Eng. Res. Dev., v. 67, 3, p. 243-254, 1989.
- HIDAKA, H. e HIRAYAMA, M. Useful characteristic and commercial applications of fructo-oligosaccharides, Biochem. Soc. Trans., v. 19, 3, p. 561-565, 1991.
- JANSON, J-C. e RYDÉN, L. Protein purification: principles, high-resolution, methods and applications, Wiley-Vch, 1end, p. 300, 1998.

- JEFFORD, T. G. e EDELMAN, J. The metabolism of fructose polymers in plants 4.β fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. *Biochem. J.*, 93, p. 148-161, 1964.
- KANG, S-II., CHANG, Y-J., OH e S-J KIM, S-II. Purification and properties of na endo-inulase from na *Arthrobacter* sp., *Biotech. Letters* , v. 20, 10, p. 983-986, 1998.
- KAWASAKI, T. Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing. *J. Chrom.*, v. 544, p. 147-184, 1991.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, p. 680-685, 1970.
- LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids, *J. Am. Chem. Soc.*, 38, p. 2263-2295, 1916.
- LE PAGE, J. F. Applied heterogeneous catalysis: design - manufacture use of solid catalysts. , 1<sup>a</sup> edition , Houston, Paris, p. 515, 1987.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. e COX, M. M. Principles of biochemistry, 2<sup>a</sup> edition, Worth Publishers, Londres, p. 775, 1993.
- LILLEHOJ, E. P. e MALIK, V. S. Protein purification. *Bioprocess and Engineering*, 40, p. 19-71, 1982.
- LOWRY, O. H., ROSEBOUGH, N. N., FAAR, A. L. e RANDALL,R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* ,v. 100, p. 238-242, 1951.
- MANZONI, M. e CAVAZZONI, V. Purification and characterization of the extracellular inulinase from *Kluveromyces cicerisporus*, *Lebensm. - Wiss. U. - Technol.*, 24, p. 236-240, 1991.

- MARTIN, M. J. P. e SYNGE, R. L. M. Separation of the higher monoamino acids by counter-current liquid-liquid extraction: the amino acid composition of wool. *Biochem. J.*, 35, p. 1359, 1941.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing Sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, 3, p. 426-428, 1959.
- MORRISSEY, J. H., Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity, *Anal. Biochem.*, 117, p. 307-310, 1981.
- MUKHERJEE, K., e SENGUPTA, S. Purification and properties of a nonspecific  $\beta$ -fructofuranosidase (inulinase) from the mushroom *Panaeolus papillonaceus*. *Can. J. Microbiol.*, v. 33, p. 520-524, 1987.
- NAKAMURA, T., MARUKI, S., NAKATSU, S. e UEDA, S. Studies on microbial inulase part V general properties of an extracellular inulase (P-II) from *Aspergillus* sp. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 52, p. 581-587, 1978.
- NAKAMURA, T. e NAKATSU, S. Studies on microbial inulase from *Penicillium*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 52, p. 681-689, 1978.
- NAKAMURA, T., NAGATOMO, Y., HAMADA, S., NISHINO, Y. e OHTA, K. Occurrence of two extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817 J. *Ferment. Bioeng.*, v. 78, n. 2, p. 134-139, 1994.
- NEGORO, H. e KITO, E.  $\beta$ -fructofuranosidase from *Candida kefyr*, *J. Ferment. Bioeng.*, v. 51, n. 2, p. 96-102, 1973.
- NEGORO, H. e KITO, E. Purification and enzymatic properties of intracellular  $\beta$ -fructofuranosidase from *Candida kefyr*, *J. Ferment. Bioeng.*, v. 51, n. 2, p. 103-110, 1973.

- NEVES, S. B. Modelagem de um leito fixo de adsorção para sistemas líquido-sólido. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química - UFBA, p. 130, 1995.
- OHTA, K. HAMADA e S. NAKAMURA, T. Production of high concentrations of ethanol inulin by simultaneous saccharification and fermentation using inulin *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol., 59, p. 729-733, 1993.
- ONODERA, S. e SHIOMI, N. Purification and substrate specificity of endo-type Inulinase from *Penicillium purpurogenum*, Agric. Biol. Chem., 52, 10, p. 2569-2576, 1988.
- ÖNGEN-BAYSAL, G., SUKAN, S. S. e VASSILEV, N. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*, Biotech. Letters, 16, 3, p. 275-280, 1994.
- PETERS, H. J. O., KERKHOFF, L. P., CALLS, H. J. M., BALKEN, M. A. J. e MEJER, E. M. DSM RESERCH AND PATENTS NR SOO3723, 1983.
- PESSOA, A Jr., HARTMANN, R., VITOLO, M. e H. HUSTEDT Recovery of extracellular inulinase by expanded bed adsorption, J. Biotechnol., 51, p. 89-95, 1996.
- PHARMACIA. Guide products for biotechnologies. Pharmacia Publications, 1991.
- PHARMACIA. Guide products for biotechnologies. Pharmacia Publications, 1998.
- PETZOLD, L.R. A description of DASSL: a diferencial/algebraic system solver, Livermone, Sandia National Laboratories, ReportSAND 82-8637, 1982.
- POLSON, A. Relationship between diffusion constants and molecular weight. J. Phys. Colloid Chem., 54, p. 649, 1950.

- RUTHERFORD, P. P. e DEACON, A. C.  $\beta$ -Fructofuranosidases from roots of Dandelion (*Taraxacum officinale*). J. Biochem., 126, p. 569-573, 1972.
- ROE, S., Separation based on structure, In: HARRIS, E.L., ANGAL, S., Protein purification methods: a practical approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, p. 175-244, 1995.
- RONSENBROCK, H. H. An automatic for finding the greatest or least value of a function Comp. J., 3, p. 175-184, 1960.
- ROUWENHORST, R. J., HENSING, M., VERBAKEL, J., SCHEFFERS, W. A. e DIJKEN, J. P. V. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, Appl. Environ. Microbiol., v. 56, 11, p 3337-3345, 1990.
- SANTACESARIA, E., MORBIDELLI, M., SERVIDA, A., STORTI, G. e CARRÀ, S. Separation of xylenes on  $\gamma$  zeolites. 2. Breakthrough curves and their interpretation, Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev., v. 21, p. 446-451, 1982.
- SCOPES, R.K., Protein purification-principles and practice, Springer-Verlag, 2ed., New York, p. 329, 1987.
- SKIDMORE, G. L., HORSTMANN, B. J. e CHASE, H. A., Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose<sup>®</sup> FF, J. Chrom., v. 498, p. 113-128, 1990.
- SKIDMORE, G. L. e CHASE, H. A., Two-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose<sup>®</sup> FF, J. Chrom., v. 505, p. 329-347, 1990.
- TANAKA, K. UCHIAMA, T. e ITTO, M. A Formation of difructose anhydride from an extracellular inulinase II on *arthrobacter ureafaciens*. Bioch. Bioph. Acta, 284, p. 246-251, 1972.

- THÖMMES, J. Fluidized bed adsorption as a primary recovery step in protein purification. *Adv. Biochem. Eng. Biotechn.*, v. 58, p. 185-229, 1997.
- THOMAS, H. Heterogeneous ion exchange in an flowing system *J. Am. Chem. Soc.*, 66, p. 1666-1668, 1944.
- UHM, T-B., JEON, D-Y., BYUN, S. M., HONG, J.-S. e GROOTWASSINK, J. W. D. Purification and properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *aspergillus niger*. *Bioch. Bioph. Acta* , 926, p. 119-126, 1987.
- UCHIYAMA, T., NIWA, S. e TANAKA, K. Purification and properties of *Arthrobacter ureafaciens* inulase II. *Biochim. Biophys. Acta*, 315, p. 412-420, 1973.
- VANDAMME, E. J. e DERYCKE, D. G. Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications, *Adv. Appl. Microbiol.*, 29, p. 139-176, 1983.
- VAN DER LAAN, E. Th. Notes on the diffusion-type model for the longitudinal mixing in flow (O. LEVENSPIEL and W. K. SMITH), *Chem. Eng. Sci.*, 7, p.187-191, 1957.
- VILLADSEN, J. e MICHELSEN, M. L., *Solution of differential equation models by polynomial approximation*, Prentice Hall Inc, New Jersey, p. 445,1978.
- VOUTÉ, N. Fluidized beds with beaded supports for protein separation. *Proceedings of the second international conference on separation of biopharmaceuticals*, France, 1992.
- XIAO, R., TANIDA, M. e TAKAO, S. Purification and some properties of endoinulinase from *Chrysosporium pannorum*. *J. Ferment. Bioeng.*, 67, 4, p. 244-248, 1989.
- YAMAMOTO, S., NAKANISHI, K. e MATSUNO, R. *Ion-exchange chromatography of proteins*. *Cromatographic Science*, v. 43, Marcel Dekker, New York, 1988.
- YAO, C. e TIEN, C. Approximation of intraparticle mass transfer in adsorption processes- II non-linear systems. *Chem. Eng. Sci.*, v. 47, 2, p. 465-473, 1992.

WATERS. Accell Plus QMA and CM Bulk Media, Waters Publications, 1987.

WORKMAN, W. E. e DAY, D. F. Purification and properties of the  $\beta$ -fructofuranosidase from *Kluyveromyces fragilis*. FEBS Letters, 160, p. 16-20, 1983.

## ANEXO A

### A. 1 - Curva de Calibração para Proteína Total e Atividade Enzimática.

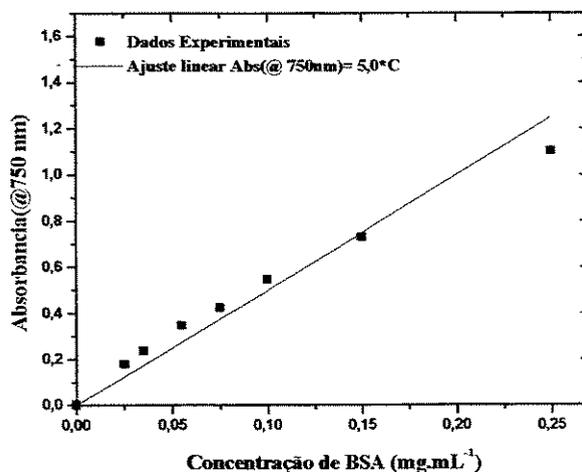


Figura A. 1.- Curva de calibração proteína total.

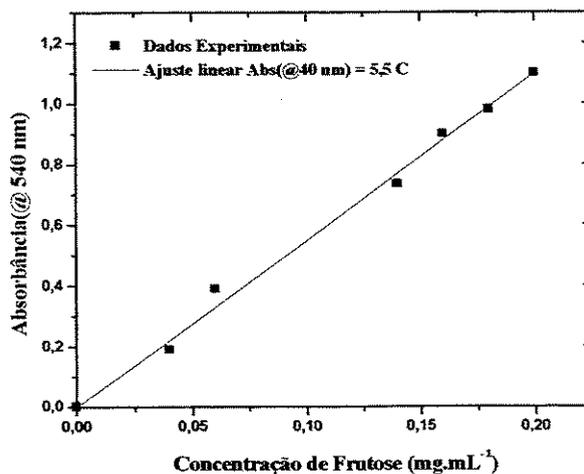


Figura A. 2.- Curva de calibração atividade enzimática

## ANEXO B

### B1 – Caracterização do Leito de Adsorvente e Partícula por Aplicação da Análise dos Momentos com Pulso Traçador

A porosidade das partículas individuais, bem como de um leito formado pelas partículas de um adsorvente trocador de íons, podem ser determinadas através do método de análise dos momentos. Neste método as moléculas de um fluido traçador percolam o leito de partículas e saem deste em diferentes tempos.

A distribuição desses tempos na corrente do fluido que deixa o sistema é denominada de distribuição de idades de saída,  $\underline{E}$ , ou distribuição de tempo de retenção (DTR) do fluido. É conveniente representar a DTR do fluido traçador de tal maneira que a área sob a curva seja unitária.

$$\int_0^{\infty} \underline{E}(t) \cdot dt = 1 \quad (\text{B.1})$$

A curva  $\underline{E}$  é necessária para levar-se em conta o escoamento não ideal. Desejando-se caracterizar o grau de não idealidade de um escoamento através da função de distribuição de idade do fluido, deve-se proceder uma avaliação da curva  $\underline{E}$  para qualquer escoamento. Faz-se uso de um certo número de métodos experimentais dinâmicos que podem ser classificados como técnica de estímulo e resposta. Em todas essas experiências perturba-se o sistema e verifica-se como ele responde ao estímulo. Analisando-se a resposta de um certo tipo de perturbação, obtêm-se informações sobre o sistema em estudo. O estímulo é, geralmente, uma medida da presença do traçador na entrada, junto com o fluido que alimenta o recipiente, enquanto que a resposta é um registro da presença do traçador em função do tempo na saída do recipiente.

Qualquer material que possa ser detetado, e que em quantidade não perturbe o escoamento no sistema, pode ser utilizado como traçador.

Por definição, a curva  $C$ , indicada na Figura B.1, representa a curva  $E$ , quando se fornece, na entrada da corrente fluida na coluna, um sinal pulsante ideal de traçador. Tal entrada é freqüentemente denominada de função de Dirac ou impulso. A normalização deste sinal é conseguida dividindo-se a concentração medida pela vazão total  $Q$ .

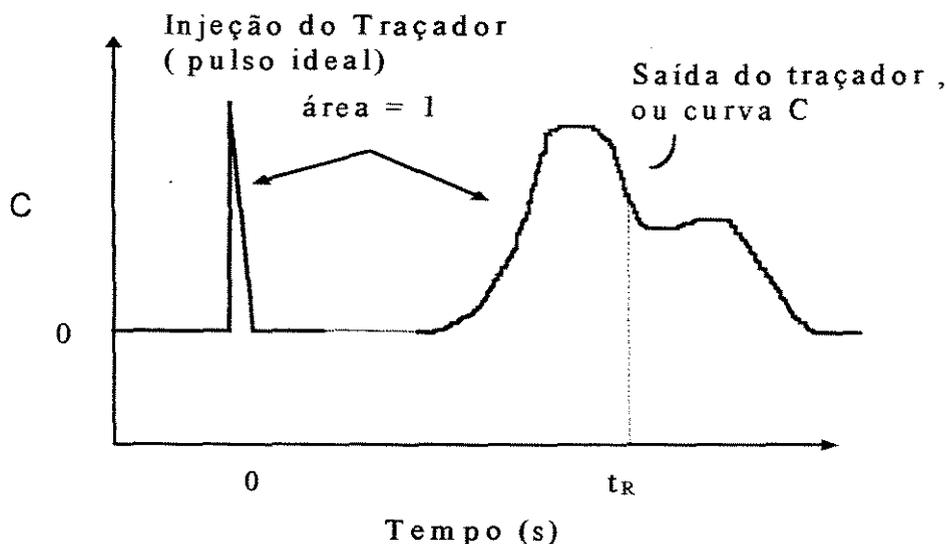


Figura B.1 - Sinal típico da curva C.

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

$$\mu_k = \int_0^{\infty} t^k E(t) dt \quad (\text{B. 2})$$

em que  $k$  é a ordem do momento; para  $k = 1$  tem-se o tempo de retenção médio,  $t_R$ , e  $k=2$  permite calcular a variância,  $\sigma^2$ , para o momento centrado em relação ao tempo de retenção médio. Dessa forma, o momento de 1ª ordem é representado pela expressão

$$\mu_1 = t_R = \frac{\int_0^{\infty} tC(L, t)dt}{\int_0^{\infty} C(L, t)dt} \quad (\text{B.3})$$

e a variância é expressa por

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} t^2 C(L, t)dt}{\int_0^{\infty} C(L, t)dt} - t_R^2 \quad (\text{B.4})$$

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

As equações (B.3) e (B.4), podem ser representadas pela forma discretizada.

$$t_R = \frac{\sum_{i=1}^n t_i C_i \Delta t}{\sum_{i=1}^n C_i \Delta t} \quad (\text{B.5})$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=0}^n t_i^2 C_i \Delta t}{\sum_{i=0}^n C_i \Delta t} - t_R^2 \quad (\text{B.6})$$

## B. 2 - Modelo de Escoamento com Dispersão

O modelo de dispersão é baseado no conceito de cromatografia, e envolve as fases estacionária e móvel. A fase estacionária corresponde ao líquido no interior do adsorvente, e a fase móvel ao líquido no espaço intersticial às partículas. O balanço de massa do soluto (traçador) na fase móvel é expresso pela equação abaixo, supondo-se que

a geometria da partícula é esférica, e que o soluto não tem interação específica com o sólido adsorvente (FURUSAWA et al., 1976):

$$\frac{\partial C}{\partial t} + u \frac{\partial C}{\partial z} + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{\partial \bar{q}}{\partial t} = \frac{D_{ax}}{\varepsilon} \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (\text{B.7})$$

$$\frac{\partial \bar{q}}{\partial t} = \left( \frac{3}{R} \right) \frac{k_f}{\rho_p} (C - C_i|_{r=R}) = \left( \frac{3}{R} \right) \frac{D_{ef}}{\rho_p} \frac{\partial C_i}{\partial r} \Big|_{r=R} \quad (\text{B.8})$$

em que  $C$  é a concentração do traçador na fase líquida externa ( $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ ),  $D_{ax}$  coeficiente de dispersão axial ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $D_{ef}$  difusão de massa nos poros da partícula ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $u$  é a velocidade intersticial ( $u = u_0/\varepsilon$ ) ( $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $k_f$  é o coeficiente de transferência de massa ( $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $\varepsilon$  é a porosidade do leito e  $\rho_p$  densidade da partícula. O balanço de massa na partícula é expresso por (BLANCH e CLARK, 1997):

$$D_{ef} \left( \frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \beta \frac{\partial C_i}{\partial t} - \rho_p \frac{\partial \bar{q}}{\partial t} = 0 \quad (\text{B.9})$$

$$\frac{\partial \bar{q}}{\partial t} = k_f q_{\max} \left( C_i - \left( \frac{1}{K_A} \right) \cdot q \right) \quad (\text{B.10})$$

em que  $C_i$  é a concentração do traçador nos poros da fase estacionária ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e  $\beta$  a porosidade da partícula. As condições de contorno para entrada do pulso traçador em  $t_0$  são definidas abaixo.

$$\frac{\partial C_i}{\partial r} = 0 \quad \text{em} \quad r = 0 \quad \text{para} \quad t > 0 \quad (\text{B.11})$$

$$C = 0 \quad \text{em} \quad z > 0 \quad \text{para} \quad t = 0 \quad (\text{B.12})$$

$$C_i = 0 \quad \text{em} \quad r \geq 0 \quad \text{para} \quad t = 0 \quad (\text{B.13})$$

O pulso traçador é definido por

$$C = C_0 \quad \text{em} \quad z = 0 \quad \text{para} \quad 0 \leq t \leq t_0 \quad (\text{B.14})$$

O sistema de equações acima pode ser resolvido aplicando o domínio de Laplace (FURUSAWA et al., 1976). As derivadas de primeira e segunda ordem da solução, conforme o teorema de VAN DER LAAN (1957), representam os momentos de primeira e segunda ordem, de acordo com a expressão:

$$\mu_k = (-1)^k \left( \frac{\partial^k G(s)}{\partial s^k} \right) \Big|_{s=0} \quad (\text{B.15})$$

FURUSAWA (1976) e ARNOLD et al. (1985) apresentaram como solução para o sistema de equações as relações dos momentos com as seguintes expressões:

O momento absoluto de 1ª ordem, que representa o tempo de residência do traçador no leito empacotado, é expresso por:

$$\mu_1 = \frac{L\varepsilon}{u_0} (1 + \delta_0) + \frac{t_0}{2} \quad (\text{B.16})$$

em que

$$\delta_0 = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \beta \left( 1 + \frac{\rho_p}{\beta} K_A \right) \quad (\text{B.17})$$

Para momento central de 2ª ordem é expresso por :

$$\sigma^2 = \mu_2 - \mu_1^2 = \frac{2L\varepsilon}{u_0} \left( \delta_1 + \frac{D_{ax}}{\varepsilon} (1 + \delta_0)^2 \frac{1}{u_0^2} \right) + \frac{t_0^2}{12} \quad (\text{B.18})$$

em que

$$\delta_1 = \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \beta \left( \frac{\rho_p K_A^2}{\beta k_f} + \frac{R^2 \beta}{15} \left( 1 + \frac{\rho_p}{\beta} K_A \right)^2 \frac{1}{u_0^2} \left( \frac{1}{D_{ef}} + \frac{5}{k_f R} \right) \right) \quad (\text{B.19})$$

A análise das equações (B.18) e (B.19) permitem obter informações que caracterizam o leito ( $\varepsilon$ ), o adsorvente ( $\beta$ ) e os efeitos de transferência de massa no escoamento. O momento de 1ª ordem,  $\mu_1$ , que representa o tempo médio de retenção do traçador, mostra a influência da constante de equilíbrio de adsorção e das porosidades do leito e da partícula no escoamento. Já, o momento central de 2ª ordem,  $\sigma^2$ , representa a dispersão do traçador no sistema, contém os termos de dispersão axial, transferência de massa externa e interna.

As características do leito e efeitos de dispersão axial podem ser obtidos usando uma substância inerte ao sistema como pulso traçador, ou seja, que não adsorva ( $K_A=0$ ), conduz à simplificação das equações (B.18) e (B.19), resultando:

$$\mu_1 - \left( \frac{t_0}{2} \right) = \frac{L\varepsilon}{u_0} \left( 1 + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \beta \right) \quad (\text{B.20})$$

$$\frac{\sigma^2 - \left( \frac{t_0^2}{12} \right)}{2 \left( \frac{L\varepsilon}{u_0} \right)} = \delta_D + \delta_f + \frac{D_{ax}}{\varepsilon} (1 + \delta'_0)^2 \frac{1}{u_0^2} \quad (\text{B.21})$$

em que,  $\delta_D$  representa o termo de difusão intrapartícula,  $\delta_f$  a transferência de massa no filme externo da partícula e  $\delta'_0$  é constante e depende das porosidades do leito ( $\varepsilon$ ) e da partícula ( $\beta$ ).

$$\delta'_0 = \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \beta \quad (\text{B.22})$$

$$\delta_D = \delta'_0 \frac{R^2 \beta}{15} \left( \frac{1}{D_{ef}} \right) \quad (\text{B.23})$$

$$\delta_f = \delta'_0 \frac{R^2 \beta}{15} \left( \frac{5}{k_f R} \right) \quad (\text{B.24})$$

As porosidades do leito ( $\epsilon$ ) e das partículas ( $\beta$ ) e dispersão axial ( $D_{ax}$ ), podem ser estimadas usando dois traçadores um pequeno que penetra nos poros e um outro grande (alto peso molecular) que não penetre nas partículas, implicando em porosidade virtual  $\beta=0$ .

## ANEXO C

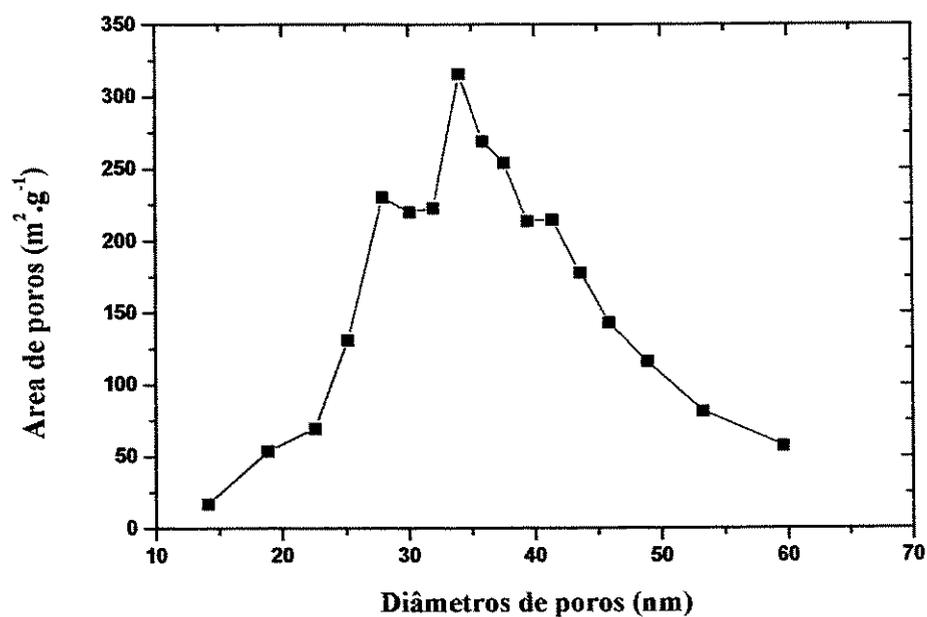


Figura C.1 - Curva de distribuição de poros, método BJH dessorção de N<sub>2</sub>, no adsorvente Accell Plus QMA.