OMAR ANDRÉS PÉREZ SIERRA

ADSORÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO POR INTERAÇÃO HIDROFÓBICA EM LEITO EXPANDIDO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

OMAR ANDRÉS PÉREZ SIERRA

ADSORÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO POR INTERAÇÃO HIDROFÓBICA EM LEITO EXPANDIDO

Tese apresentada à Universidade FederalViçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 14 de dezembro de 2007.

Prof[a].Dr[a]. Jane Sélia dos Reis Coimbra (Co-Orientadora)	Prof. Dr. Luis Henrique Mendes da Silva (Co-Orientador)
Prof. Ph.D. Everson Alves Miranda	Prof. Dr. Márcio Arêdes Martins

Prof. Dr. Luis Antonio Minim
(Orientador)

Ao meu grande amor Elvira, pelo estímulo, apoio, força e compreensão.

Aos meus filhos, Andrea e Luis Felipe, que são minha luz.

À minha família, em especial, a meu pai (*in memoriam*) e minha irmã Gloria Luz

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos bons Anjos que me protegem, porque sempre estão em meu caminhar.

À Universidade de Córdoba, pela oportunidade de realização do curso e pelo apoio financeiro.

Aos membros do Conselho da Faculdade de Ciências Agrícolas da Universidade de Córdoba, pelo apoio.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela acolhida e pelo espaço para reflexão e aprendizado.

A todos os professores que participaram desta caminhada, contribuindo com seus valiosos conhecimentos que possibilitaram estas reflexões e a todos do corpo técnico-administrativo, em especial: Maria Geralda, Eliane, Vânia, Lúcia, Maria Rita, Divino, Juarez, Adão, Manoel, Luiz e Jose Tomaz "Perereca".

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Minim, por ter disposição e muita paciência para receber-me como seu orientado, sendo mais do que um orientador: um amigo pronto para partilhar seus conhecimentos e ampliar minhas reflexões, questionando, conduzindo por caminhos que se mostraram tão ricos de possibilidades e estimulando a percepção dos múltiplos olhares.

À Professora Jane S. Reis Coimbra, pelas valiosas sugestões e críticas a este trabalho, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo. Muito obrigado por sua paciência, ajuda, dedicação, incentivo e confiança.

Ao Professor Luis Henrique M. da Silva, pela amizade, valiosos conhecimentos compartilhados, dedicação e estímulo para querer descobrir algo mais.

Aos Professores Everson Alves Miranda e Márcio Arêdes Martins, por terem aceitado participar como membros da banca, pela presteza, correções e valiosas sugestões apresentadas.

Ao Professor Nélio Andrade, ex-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo recebimento carinhoso e apoio neste caminhar.

Ao Professor Afonso Mota Ramos, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela amizade e os muitos cafezinhos compartilhados.

Aos amigos Rafael, Rita, Rosana, César, Bruno, Rony e Edwin, excelentes pessoas, pelo apoio incondicional no processo deste trabalho e para sua conclusão.

À família Presotti, em especial ao Igor que me acolheu de forma carinhosa e hospitaleira na cidade de Belo Horizonte, obrigado pelo apoio.

Aos colombianos que moram e aos que moraram em Viçosa, em especial à Dina e ao Juan José pela acolhida e pelo apoio nesta terra brasileira. Obrigado a todos pelo compartilhar nossa cultura.

Aos amigos que contribuíram com incentivo, conversas e idéias.

Com muito carinho a toda minha família que, apesar da distância, estiveram presentes me apoiando em todas as horas.

Aos meus sobrinhos, Paula e Cristhian, por compartilharmos momentos em Viçosa que permitiram nos conhecer, ajudando-nos mutuamente, sempre os lembrarei.

À Elvira, minha companheira e grande amor da minha vida, por seu estímulo para eu continuar e pelo apoio incondicional que fizeram com que eu conseguisse culminar os estudos.

Aos meus filhos queridos, Andréa e Luis Felipe, que, com tanto carinho, me ajudaram, compreendendo os momentos de ausência do pai e me fortalecendo com palavras, abraços e brincadeiras.

Certamente, nestes parágrafos não contêm os nomes de todos que fizeram parte dessa importante fase da minha vida. Portanto, desde já, peço desculpas àqueles que não estão presentes nestas palavras, mas podem estar certos que fazem parte do meu pensamento e da minha gratidão.

Muito obrigado!!!!

BIOGRAFIA

Omar Andrés Pérez Sierra, filho de José Erasmo Pérez Paternina e Elvira Isabel Sierra Hernández, nasceu em Sincelejo, Sucre, Colômbia, no dia 25 de março de 1964.

Engenheiro Químico pela Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colômbia.

Mestre em Engenharia Química pela Universidad Industrial de Santander – UIS, Bucaramanga, Colômbia.

Professor do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade de Córdoba, na cidade de Montería, Colômbia, desde o ano 1997.

Ingressou em agosto de 2003 no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS IX
LISTA DE TABELAS XI
RESUMO XII
ABSTRACT XIII
INTRODUÇÃO GERAL 1
I. RECUPERAÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) USANDO ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO 3
RESUMO 3
1. INTRODUÇÃO 3
2. SORO DE LEITE 4
3. GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) 6
4. ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO 8
4.1. PRINCÍPIOS E OPERAÇÃO 12
4.2. HIDRODINÂMICA DO LEITO EXPANDIDO 14
4.2.1. Observação visual 15
4.2.2. Grau de expansão (H/H_0) 15
4.2.3 Distribuição do tempo de residência (DTR) 16
4.3. TRANSPORTE DE MASSA NO FLUIDO 17
4.4. TRANSPORTE DE MASSA NA PARTÍCULA 18
4.5 APLICAÇÕES 18
5. CONCLUSÕES 18
6. NOMENCLATURA 19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 20
II. ESTUDO DO EFEITO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DO SAL NA ADSORÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA: ANÁLISE TERMODINÂMICA 26
RESUMO 26
1. INTRODUÇÃO 26
2. TEORIA 27
2.1. ADSORÇÃO EM TANQUES AGITADOS 27
2.2. CÁLCULO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS 28
3. MATERIAL E MÉTODOS 29
3.1. MATERIAL 29
3.2. EXPERIMENTO DE ADSORÇÃO 29
3.3. MEDIDAS DE ENTALPIA DE ADSORÇÃO 29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 30

4.1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NAS ISOTERMAS ADSORÇÃO DE EQUILÍBRIO 30
4.2. EFEITO DA TEMPERATURA NA ADSORÇÃO 34
4.3. ANÁLISE TERMODINÂMICA 38
5. CONCLUSÕES 46
6. NOMENCLATURA 46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47

III. ADSORÇÃO DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA DA PROTEÍNA GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) EM TANQUES AGITADOS 49

RESUMO 49
1. INTRODUÇÃO 49
2. ADSORÇÃO EM TANQUES AGITADOS 50
3. MATERIAL E MÉTODOS 53
3.1. MATERIAL 53
3.2. PROCEDIMENTO 54
3.2.1 Determinação dos dados de equilíbrio 54
3.2.2 Determinação dos dados da cinética de adsorção 54
3.2.3 Determinação da viscosidade (m) 55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
4.1. CINÉTICA DE ADSORÇÃO 59
5. CONCLUSÕES 65
6. NOMENCLATURA 66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

IV. ADSORÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) EM LEITO EXPANDIDO POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA 70

RESUMO 70
1. INTRODUÇÃO 70
2. ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO 72
3. MATERIAL E MÉTODOS 74
3.1. MATERIAL 74
3.2. EQUIPAMENTO 74
3.3. PROCEDIMENTOS DOS EXPERIMENTOS 74
3.3.1 Determinação das curvas de rupturas 74
3.3.2 Distribuição do tempo de residência (DTR) 75
3.3.3 Determinação da viscosidade (m) 76
4. RESULTADOS E DISCUSÃO 76
4.1 ANÁLISES DA DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR) 77
4.2 DETERMINAÇÕES DOS PARÂMETROS DE RICHARDSON E ZAKI 78
4.3 ANÁLISES DAS CURVAS DE RUPTURA 81
5. CONCLUSÕES 85
6. NOMENCLATURA 86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87

CONCLUSÕES GERAIS 91

LISTA DE FIGURAS

Página

I. RECUPERAÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) USANDO ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO.

Figura 1. Local da ação da quimosina na k-caseína. 6
Figura 2. Processos de adsorção: (a) leito fixo (b) leito expandido (CHASE e DRAEGER, 1992). 10
Figura 3. Representação esquemática dos passos na adsorção em leito expandido.. 13
Figura 4. Determinação do tempo de residência (DTR) 17

II. ESTUDO DO EFEITO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA ADSORÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA: ANÁLISE TERMODINÂMICA.

Figura 1. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e temperatura de 10^oC..... 31
Figura 2. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e temperatura de 25^oC..... 31
Figura 3. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e temperatura de 35^oC..... 31
Figura 4. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e temperatura de 45^oC..... 31
Figura 5. Isotermas de GMP a diferentes temperaturas e concentração de 0,05 M Na_2SO_4..... 31
Figura 6. Isotermas de GMP a diferentes temperaturas e concentração de 0,3 M Na_2SO_4..... 31
Figura 7. Isotermas de GMP a diferentes temperaturas e concentração de 0,6 M Na_2SO_4. 31
Figura 8. Isotermas de GMP a diferentes temperaturas e concentração de 0,8 M de Na_2SO_4..... 31
Figura 9. Variação da entalpia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e 25^oC..... 31
Figura 10. Variação da entalpia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e 35^oC..... 31
Figura 11. Variação da entalpia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e 45^oC..... 31
Figura 12. Variação da entalpia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes temperaturas e concentração de 0,05 Na_2SO_4..... 31
Figura 13. Variação da entalpia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes temperaturas e concentração de 0,6 Na_2SO_4..... 31
Figura 14. Variação da entalpia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes temperaturas e concentração de 0,8 Na_2SO4..... 31

Figura 15. Variação da entropia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes concentrações de Na_2SO_4, e 25^oC..... 31
Figura 16. Variação da entropia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes concentrações de Na_2SO_4, e 35^oC..... 31
Figura 17. Variação da entropia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes concentrações de Na_2SO_4, e 45^oC..... 31

III. ADSORÇÃO DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA DA PROTEÍNA GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) EM TANQUES AGITADOS.

Figura 1. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e temperatura de 10^oC..... 56
Figura 2. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e temperatura de 25^oC..... 56
Figura 3. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e temperatura de 35^oC..... 56
Figura 4. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e temperatura de 45^oC..... 56
Figura 5. Dados experimentais obtidos da adsorção nos testes de velocidade. C/C0 é a relação entre concentração de GMP na fase fluida no tempo (s), sobre a concentração inicial de GMP na mesma fase C0..... 56
Figura 6. Exemplo de modelo ajustado. Condições: 318,15 K, 2 mg/mL de GMP e 800 mM de Na_2SO_4. Dados experimentais (x); Modelo ajustado (-)..... 56
Figura 7. Exemplo de modelo ajustado. Condições: 318,15 K, 1mg/mL de GMP e 800 mM de Na_2SO_4. Dados experimentais (x); Modelo ajustado (-)..... 56
Figura 8. Dados experimentais obtidos da cinética de adsorção do GMP. Concentração de proteína 3 mg/mL, temperatura de 288,1 K e concentração de Na_2SO_4 de 50 e 800 mM..... 56
Figura 9. Dados experimentais obtidos da cinética de adsorção do GMP em diferentes temperaturas e concentração de GMP de 3 mg/mL. A) Concentração de Na_2SO_4 de 800 mM. B)Concentração de Na_2SO_4 de 50 mM..... 56
Figura 10. Alguns dados experimentais obtidos da cinética de adsorção do GMP em diferentes concentrações de proteína a 303,1 K e concentração de Na_2SO_4 . A) 800 mM; B) 50mM..... 56

IV. ADSORÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) EM LEITO EXPANDIDO POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA.

Figura 1. Expansão de leito (Streamline Phenyl) em função da velocidade. 77
Figura 2. Coeficiente de dispersão axial em função da velocidade linear. 78
Figura 3. Linearização dos dados obtidos para velocidades lineares versus porosidade, objetivando a obtenção dos parâmetros de Richardson e Zaki. 79
Figura 4. Curvas de rupturas a concentrações constantes e diferentes vazões, A) 10 mg/mL, B) 15 mg/mL. 83
Figura 5. Curvas de rupturas a diferentes concentrações e vazão constante, A) 1 mL/min, B) 15 mL/min. 83
Figura 6. Valores observados versus valores preditos para a eficiência da coluna... 85

LISTA DE TABELAS

Página

I. RECUPERAÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) USANDO ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO.

Tabela 1. Características físico-químicas das proteínas do soro de queijo 5

II. ESTUDO DO EFEITO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA ADSORÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA: ANÁLISE TERMODINÂMICA.

Tabela 1. Valores da energia livre de Gibbs de adsorção ($D_{ads}G$ kJ/mol) para diferentes temperaturas. 45

III. ADSORÇÃO DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA DA PROTEÍNA GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) EM TANQUES AGITADOS.

Tabela 1. Valores do coeficiente de dissociação (k*d*) e capacidade máxima de adsorção (*qm*). 59

Tabela 2. Parâmetros de transferência de massa. 65

IV. ADSORÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) EM LEITO EXPANDIDO POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA.

Tabela 1. Valores da porosidade e velocidade linear experimental 80

Tabela 2. Parâmetros de Richardson e Zaki para a expansão da resina Streamline Phenyl obtidos com solução tampão fosfato 20 mM, pH 7,0 e água MQ, T=25^{o}C... 80

Tabela 3. Condições operacionais das curvas de rupturas e os valores da eficiência da coluna. 82

RESUMO

SIERRA, Omar Andrés Pérez, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2007**. Adsorção de glicomacropeptídeo por interação hidrofóbica em leito expandido.** Orientador: Luis Antonio Minim. Co-Orientadores: Jane Sélia dos Reis Coimbra e Luis Henrique Mendes da Silva.

Neste trabalho, foi estudado o processo de adsorção da proteína glicomacropeptídeo (GMP) proveniente do soro de queijo, em cromatografia de interação hidrofóbica, variando-se as condições de temperatura e a concentração de sal. Foi usada a calorimetria de titulação para conduzir uma análise termodinâmica do processo. Obtiveram-se as curvas de ruptura a partir do comportamento hidrodinâmico em leito expandido. Também foi estudada a cinética de adsorção do GMP na resina hidrofóbica (Streamline Phenyl). A partir dos resultados obtidos por meio do estudo de GMP na adsorção da resina hidrofóbica foi possível observar que este processo é dependente da concentração de sal e da temperatura. Verificou-se por meio da calorimetria, que o processo é espontâneo e entropicamente dirigido. Pôde-se observar que o aumento da velocidade linear e, consequentemente, o do grau de expansão associado com a elevação da concentração de proteína diminuiu a eficiência da coluna ao adsorver o GMP, ao mesmo tempo em que apresentou uma fluidodinâmica estável. No modelo cinético, verificou-se que o incremento da temperatura e da concentração do sal sulfato de sódio acarretou pequena variação no tempo de equilíbrio. O modelo de transferência de massa aplicado se ajustou bem à cinética de adsorção da proteína sob as condições estudadas.

ABSTRACT

SIERRA, Omar Andrés Pérez, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December of 2007. **Adsorption of the glicomacropeptide by hydrophobic interaction in expanded bed.** Adviser: Luis Antonio Minim. Co-Advisers: Jane Sélia dos Reis Coimbra and Luis Henrique Mendes da Silva.

In this work was studied the adsorption process of glicomacropeptide, protein obtained from the cheese whey protein, with hydrophobic iteration chromatography, modifying the temperature and salt concentration conditions. The titillation calorimetric was used to develop a thermodynamic analysis of the process. The rupture curves were obtained starting from the hydrodynamic behaviour of expanded bed, and also was studied the adsorption kinetics of the GMP in the hydrophobic resin. With these results, and studying the GMP in the adsorption of the hydrophobic resin (Streamline Phenil), was possible to observe that this process is dependent of the temperature and salt concentration, verified by calorimetry that the process is spontaneous and entropically developed. The increase of the lineal speed and consequently, the expansion degree associated with the increase of the protein concentration decreases the efficiency of the column to adsorve the GMP, presenting a stable fluid dynamics. In the kinetic model was found that with the increase of the temperature and the increase of the concentration of the sodium sulphate presents a little variation in the equilibrium time. The model of mass transference applied was properly adjusted to the adsorption kinetics of the protein in the studied conditions.

INTRODUÇÃO GERAL

A purificação de proteínas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência é uma das áreas que mais tem se desenvolvido nas ciências farmacêuticas e biotecnológicas, nas últimas décadas, dada a necessidade de obtenção de produtos de elevado grau de pureza, com condições de trabalho não-agressivas para que os compostos não percam sua atividade biológica (SHIOSAKI et al., 1994).

A técnica de cromatografia destaca-se como método de trabalho em escala preparativa, por seu elevado poder de purificação na obtenção de produtos em larga escala. Nos processos de purificação de proteínas, a cromatografia de interação hidrofóbica é uma das metodologias de cromatografia mais utilizada, devido à rapidez de separação com baixa degradação do produto e pequena quantidade de solvente, conduzindo a um elevado grau de purificação.

O glicomacropepitídeo (GMP) é um dos peptídeos bioativos do soro de queijo, derivado da caseína e resultante da produção de queijos pela via da renina, com concentração estimada de 1,2 a 1,5 g/L. Este valor corresponde a cerca de 15% a 25% do total das proteínas presentes no soro de queijo doce.

O interesse na recuperação, purificação e comercialização de GMP de soro de queijo doce tem origem tanto no seu elevado valor nutricional e funcional, quanto no potencial de aplicações médicas e terapêuticas às quais se adequa. Adicionalmente, pode-se reforçar a necessidade de desenvolvimento de técnicas de separação para o reaproveitamento das proteínas do soro de queijo.

O objetivo da revisão bibliográfica da primeira parte deste trabalho foi explicar o mecanismo básico da cromatografia de leito expandido, e a transferência de massa líquido-sólido.

Na segunda parte deste trabalho, foi estudado o efeito da temperatura (283.15 K, 298.15 K, 308.15 K e 318.15 K) e da concentração de sulfato de sódio (0,05 M; 0,3M ; 0,6 M; e 0,8 M) sobre a adsorção do GMP em uma coluna de leito expandido, com resina de interação hidrofóbica, determinando-se as isotermas de adsorção para a proteína GMP. Verificou-se o ajuste do modelo de isoterma de Laguimiur e, através de análises calorimétricas foram determinados os parâmetros termodinâmicos do processo (entalpia, entropia e energia livre de Gibbs), que possibilitaram a melhor compreensão do fenômeno.

Na terceira parte foi estudada a cinética de adsorção do GMP na resina hidrofóbica, usando-se tanques agitados.

Na quarta e última parte, foram determinadas as curvas de ruptura, usando-se análise frontal.

Este trabalho é uma importante contribuição para uma melhor compreensão dos fenômenos envolvidos na cromatografia hidrofóbica em leito expandido, e espera-se que as informações aqui apresentadas auxiliem no desenvolvimento de novos processos e em trabalhos futuros.

I. RECUPERAÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) USANDO ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO

RESUMO

O glicomacropepitídeo (GMP) é um dos peptídeos bioativos do soro de queijo, derivado da caseína e resultante da produção de queijos pela via da renina. O crescente interesse na purificação de glicomacropepitídeo do soro de queijo tem sua origem tanto no seu elevado valor nutricional e funcional, quanto no potencial de aplicações médico-terapêuticas às quais se adequa. Uma das técnicas de separação de interesse nos últimos anos é a cromatografia de leito expandido, que usada em colunas, reduz o número de etapas de separação e é de grande interesse na área de bioprocessos, uma vez que os métodos tradicionais (leito fixo) aumentam os custos do processo de recuperação de um bioproduto.

1. INTRODUÇÃO

O glicomacropepitídeo (GMP) é um dos peptídeos bioativos do soro de queijo, derivado da caseína e resultante da produção de queijos pela via da renina com concentração estimada de 1,2 a 1,5 g/L. Este valor corresponde a cerca de 15% a 25% do total das proteínas presentes no soro de queijo doce (DZIUBA; MINKIEWICZ, 1996).

Algumas atividades biológicas e fisiológicas potenciais relacionadas ao GMP contribuem para: a) reduzir desordens estomacais ao possibilitar a regulação de respostas imunológicas, bem como na prevenção da azia, por levar à diminuição da secreção gástrica (EL-SALAM et. al., 1996; IDOTA et al., 1994); b) minorar o risco de ataques cardíacos ao induzir a inibição da agregação de plaquetas (WHEYPROTEIN, 2005; EL-SALAN et al., 1996; DZIUBA; MINKIEWICZ, 1996); c) diminuir o apetite ao estimular a liberação de colecistoquinina, um hormônio que promove a sensação de saciedade (YVON et al., 1994); d) inibir a adesão de microrganismos em polímeros, sugerindo o uso do GMP como inibidor de placas bacterianas e de cáries dentárias (NEESER et al., 2000).

Devido às funções biológicas, grande atenção tem sido dada às técnicas de isolamento e purificação do GMP. Esta proteína é considerada um ingrediente com potencial para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Como o GMP contém resíduos dos aminoácidos 106-169 não apresenta aminoácidos aromáticos, também pode ser utilizado em alimentos para o tratamento da fenilcetonúria (NAKANO; OZIMEK, 1998).

A adsorção em leito expandido tem sido usada com a finalidade de eliminar operações como clarificação e filtração, comumente usadas nas etapas iniciais de muitas estratégias de purificação de biomoléculas, principalmente quando a fase fluida apresenta materiais particulados. Uma vez que o leito opera na forma expandida, o problema do bloqueio da coluna pelas partículas em suspensão não ocorre.

No presente capítulo, é apresentada uma revisão sobre o GMP e sobre a técnica de separação em coluna de leito expandido.

2. SORO DE LEITE

O soro de leite, ou soro de queijo, é um subproduto da indústria de queijos, de cor amarelo-esverdeada, obtido pela coagulação do leite. Seu sabor, ligeiramente ácido ou doce, e a sua composição dependem, respectivamente, do tipo e do processo de fabricação do queijo. A composição do soro é de aproximadamente 93% de água, 5% de lactose, 0,9% de proteínas, 0,3% de gordura, 0,2% de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas (BEM-HASSAN; GHALY, 1994).

Segundo o ANUÁRIO MILKBIZZ (2005), o Brasil produziu 480 mil toneladas de queijo durante o ano 2005, ficando atrás somente da União Européia e dos Estados Unidos.

As proteínas do soro correspondem a 20% das proteínas do leite, sendo que a α-lactoalbumina, a β-lactoglobulina e o GMP representam cerca de 90% do total das proteínas do soro. No soro são encontradas também a albumina de soro bovino, imunoglobulinas, protease-petonas, lactoferrina, lactoperoxidase e outras enzimas [10]. A Tabela 1 apresenta algumas características físico-químicas das proteínas presentes no soro de queijo.

São, na maioria, proteínas globulares que contêm muitas das suas propriedades funcionais. Algumas de suas funções biológicas estão identificadas, outras emergem e outras, porém ainda estão por ser descobertas.

Tabela 1. Características físico-químicas das proteínas do soro de queijo

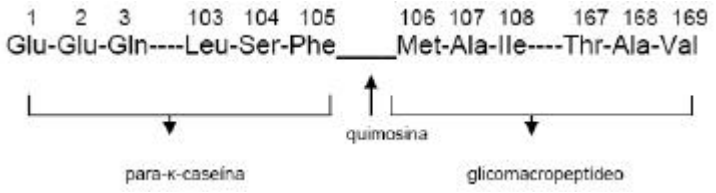
Proteína	**Concentração (g/L)**	**Massa Molar (KDa)**	**Ponto Isoelétrico**
β-lactoglobulina	2,0 – 4,0	18,3	5,2
α-lactoalbumina	1,0 - 1,5	14,2	4,2 - 5,1
Imunoglobulinas	0,4 -1,0	146,0 – 900,0	5,5 - 8,3
Albumina do soro	0,3 – 0,6	66,0 – 69,0	4,7- 4,9
Protease-peptona	0,5	4,0 – 20,0	-
Lactoferrina	0,05	78,0 – 92,0	8,0 – 9,0
Lactoperoxidase	0,06	78,0 – 89,0	9,6
Glicomacropeptideo	1,2 – 1,5	6,8 – 9,4	4,3

*Modificado de MORR e HÁ [41], McKENZEY [39], TOLKACH e KULOZIK [55]

O Glicomacropeptídeo (GMP) é um peptídeo formado por 64 aminoácidos, sendo cerca de 10% de sua massa, sacarídeos. É inexistente no soro ácido e representa cerca de 15% a 25% das proteínas do soro doce. Por não conter fenilalanina, é uma fonte desejável de nitrogênio nas dietas especiais formuladas para pacientes com fenilcetonúria (BURRINGTON, 2002). BRODY (2000) destaca as propriedades biológicas do GMP como proteção contra toxinas, bactérias, vírus e a regulação do sistema imunológico como as áreas mais promissoras no estudo deste peptídeo.

3. GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP)

O glicomacropepitídeo é um peptídeo derivado da caseína que corresponde a cerca de 10 a 20% do total de proteínas do soro de queijo doce. Quando o leite é submetido ao tratamento com a enzima quimosima durante a fabricação de queijo, a proteína k-caseína é hidrolisada em dois peptídeos. A clivagem ocorre entre os aminoácidos 105 (Phe) e 106 (Met), liberando um peptídeo C-terminal solúvel de 7 kDa, que é o GMP, e um peptídeo insolúvel, denominado para-k-caseína N-terminal de 12271 Dalton (DZIUBA; MINKIEWICZ, 1996; EL-SALAM et al., 1996). A Figura 1 representa o local da ação da quimosina na k-caseína.



Fonte: FENNEMA (2000)

Figura 1. Local da ação da quimosina na k-caseína.

A literatura reporta que a massa molecular teórica de GMP está entre 7 e 8 kDa. Alguns autores sugerem que o GMP tem a habilidade de associar-se e dissociar-se a determinadas condições de pH. KAWASAKI et al. (1993a) propõem que a k-caseína GMP de massa molecular 9 kDa é obtida em pH igual a 4, e o polímero de k-caseína GMP de massa molecular entre 45-50 kDa é obtido em pH acima de 4.

Nakano e Ozimek (1998) estudaram como a variação de pH influencia na massa molecular de GMP, utilizando cromatografia em gel de Sephacryl S-200 e coletando frações que foram monitoradas em ácido siálico. Os resultados sugeriram que o GMP compreende um agregado de três monômeros, sendo que a massa molecular não é afetada pela mudança do pH.

Mikkelsen et al. (2005) demonstram em seus estudos que a massa molecular experimental do GMP é maior que a teórica, devido à agregação de monômeros de GMP de massa molecular de 7 kDa. Os autores sugerem que: o GMP pode agregar até 4 monômeros que são resistentes à mudança de pH; a formação e a conformação

destes agregados são influenciadas por propriedades do GMP na k-caseína e que o GMP ligado a k-caseína é reversivelmente influenciada pelo pH.

Diferentes abreviações são usadas para identificar o GMP derivado da *k*-caseína, mas todas se referem à mesma molécula encontrada no soro. CMP é a abreviação para caseinomacropeptídeo, enquanto CGMP é usada para uma designação mais descritiva de caseinoglicomacropeptídeo. É também referida como CDP (peptídeo derivado de caseína) ou CGP (caseinoglicopeptídeo) (DAVISCO, 2005). É também chamada de CDP (peptídeo derivado da caseína) (EL-SALAM et. al, 1996).

O interesse na purificação de glicomacropepitídeo do soro de queijo tem sua origem tanto no seu elevado valor nutricional e funcional, quanto no potencial de aplicações médico-terapêuticas às quais se adequa. Entre as aplicações biológicas potenciais do GMP, estão: 1) o auxílio na inibição de cáries dentárias; 2) a promoção de crescimento de bifidobactérias, por alterações na secreção gástrica; e, 3) a modificação do crescimento da bactéria do ácido lático (EL-SALAM et al., 1996). Tema de várias pesquisas científicas, o caseinomacropeptídeo (CMP) tem provado seu valor, em dietas especiais, em produtos de higiene oral e no controle de peso.

Estudos de sua habilidade para nutrir a microflora intestinal saudável apontam o ingrediente para uso como prebiótico em alimentos (IDOTA et al., 1994). Propriedades anticariogênicas inibem a adesão de bactérias cariogênicas, como *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* e *S. sobrinus*, tornando a microbiota dental mais favorável (NEESER et. al, 2000, 1994; SCHUPBACH et. al, 1996). Estudos adicionais têm mostrado que o GMP reduz o apetite, fazendo dele um componente apropriado em produtos utilizados no controle de peso (YVON et al., 1994). TAKAHASHI et al. (1992) relatam a obtenção de um alimento hipoalergêncio à base de GMP, com elevado valor nutritivo, facilmente absorvido, digerido e com ação anti-inflamatória.

O GMP tem sido também um dos parâmetros mais utilizados na detecção de soro de queijo adicionado fraudulentamente ao leite, devido à presença do ácido siálico (DRACZ, 1996).

O desenvolvimento de alimentos inovadores com adição de componentes benéficos à saúde é um dos alvos do processamento para a indústria alimentícia. As

características do CMP prometem não somente aplicações medicinal e dietética, mas também apresentam um potencial elevado no uso como um agente estrutural do alimento, pois a sua estrutura glicosídica confere propriedades emulsificante e espumante (KULOZIK; GUILMINEAU, 2003).

Por outro lado, MARTÍN-DIANA, FRIAS E FONTECHA (2005) estudaram CMPs de três espécies (bovino, ovino e caprino) e concluíram que os CMPs mostraram atividades emulsificantes mais estáveis à variação de pH em relação ao concentrado protéico de soro, sugerindo a possibilidade de utilização de CMP como emulsificante em alimentos que sofrem grande variação de pH durante o processamento, como por exemplo em produtos lácteos fermentados.

Diferentes métodos para separação de GMP são descritos na literatura, sendo que a maior parte foi desenvolvida em escala de laboratório ou encontra-se protegida por patentes. Ultimamente, esforços têm sido empregados em processos para produção de GMP em grande escala para que suas propriedades nutricionais e biológicas não sejam perdidas. Entre estes métodos, que podem obter o GMP do soro de leite ou de concentrado protéico do soro, estão os que utilizam resinas trocadoras de ânion ou ultrafiltração (CASAL et al., 2005).

Entre os diferentes métodos para isolamento e purificação de GMP e que são utilizados de forma isolada ou combinada encontram-se:

a) Precipitação seletiva induzida por ajuste das propriedades físicas da solução (aquecimento, precipitação alcoólica, precipitação com ácido trifluracético, precipitação com ácido acético).

b) Filtração por membrana baseada principalmente em diferenças de tamanho e carga (diálise, ultrafiltração, microfiltração, osmose inversa, eletrodiálise).

c) Adsorção seletiva (cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica), que pode ser em coluna de leito fixo ou em leito expandido.

4. ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO

Em meados do século XX, os processos que utilizavam a fluidização sólido-líquido vinham sendo usados em muitas áreas de química industrial como, por exemplo, no tratamento de águas residuais, através do processo de adsorção por troca

iônica (DOS SANTOS, 2001). Segundo GOPAL (1993), a partir da década de sessenta, essa técnica começou a ser utilizada sem muito sucesso em processos biológicos, devido às limitações de propriedades físicas, como a pequena diferença de densidade entre a partícula sólida empregada como adsorvente e o líquido, e às complexidades inerentes aos fluidos usados em processos biológicos.

Apesar dos problemas mencionados, o leito fluidizado para a purificação de biomoléculas continuou sendo empregado pela indústria de biotecnologia visando a redução do número de operações unitárias usadas nos processos de purificação. Principalmente, em substituição às operações unitárias de centrifugação e filtração, uma vez que as proteínas podem estar presentes em meio líquido contendo partículas sólidas em suspensão (fragmentos de células) ou em meio líquido complexo, como é o caso do soro de leite provocando a colmatagem de leitos fixos (BASCOUL et. al., 1993; CARRERE, 1993; JAMES, 1994). Como conseqüência da redução do número de etapas na recuperação e na purificação de biomoléculas, os custos na obtenção da proteína de interesse com elevado grau de pureza são menores.

Esta técnica vem sendo de crescente interesse, dos anos noventa em adiante, para os pesquisadores, CHASE, 1994; CHASE; DRAEGER, 1992; CHANG et al., 1993; DASARI et al., 1993; DE LUCA et. al., 1994; McCREATH et al., 1995; FREJ et al., 1994; BATT et. al., 1995; CHANG; CHASE, 1996 (a); FREJ et. al., 1997; LEVISON et. al., 2000; SANTOS et. al., 2000; TONG et. al.,2003; e CHEN et. al.,2003, para recuperar e purificar proteínas de soluções contendo ou não material particulado.

A Figura 2 ilustra o princípio de funcionamento de um processo de adsorção em leito fixo e expandido. Pode-se observar que operando em leito fixo, o material particulado bloqueia a coluna (Figura 2a). Entretanto, ao ser operado de forma expandida, o material particulado passa pelo leito sem haver a obstrução da coluna (Figura 2b).

BUIJS e WESSELINGH (1980) tentaram estabilizar o leito num processo tipo “cascata”. Nesse estudo, o leito foi dividido em um número de pequenos compartimentos, cada um trabalhando como um leito fluidizado. Quando estes compartimentos foram considerados juntos, houve um aumento na eficiência global do leito. Outras técnicas de estabilização de leito são encontradas na literatura, sendo que a maior parte baseia-se no uso de partículas adsorventes levemente magnetizadas

(CHETTY; BURNS, 1991; TERRANOVA; BURNS, 1991) havendo, porém, dificuldades para o aumento de escala pelo uso de equipamentos caros (HJORTH et. al., 1995).

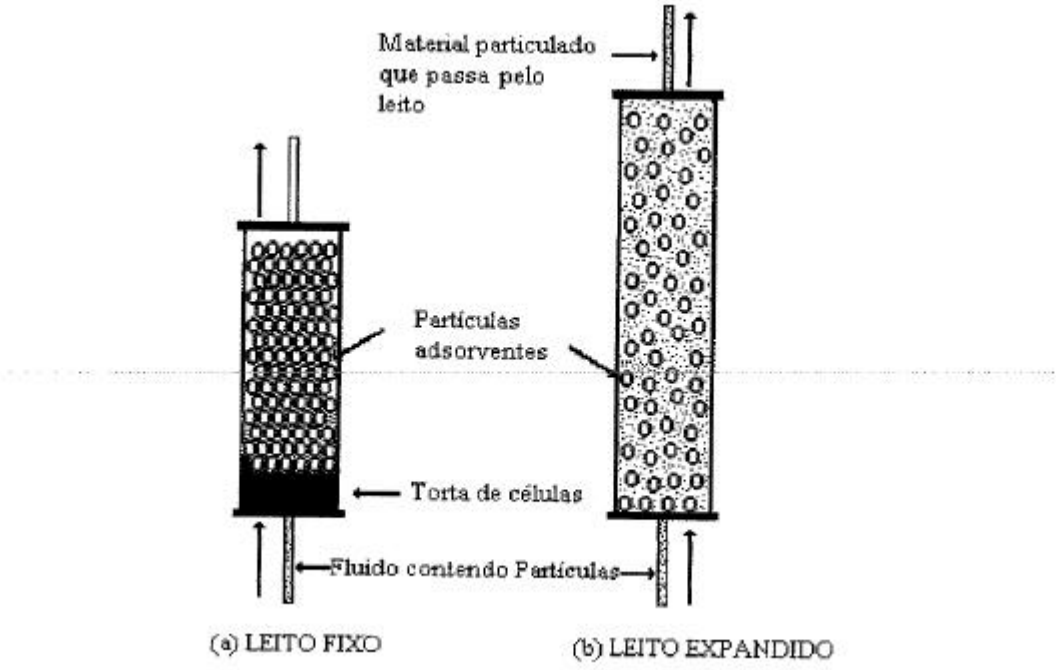


Figura 2. Processos de adsorção: (a) leito fixo (b) leito expandido (CHASE e DRAEGER, 1992).

O emprego da fluidização do leito com os adsorventes convencionais utilizados na adsorção em leito fixo provoca elevada mistura entre o líquido e o adsorvente, gerando uma dispersão axial elevada, diferindo do comportamento desejável do escoamento tubular apresentado pelo leito fixo, e aproximando-se indesejavelmente do comportamento de tanque agitado. Neste caso, a existência de apenas um estágio de equilíbrio compromete a eficiência do processo de separação por adsorção. Algumas alternativas foram criadas para limitar o grau de mistura existente no leito fluidizado. BUIJS e WESSELINGH (1980) desenvolveram uma coluna com bandejas providas de distribuidores de fluxos que serviam como suporte para o adsorvente sólido. Entretanto, a redução do grau de mistura não foi suficiente para a melhoria da eficiência da coluna e do processo, se comparada com o leito fixo.

TERRANOVA; BURS (1991), CHETTY; BURNS (1991) desenvolveram uma coluna de leito fluidizado estabilizado magneticamente usando adsorventes de afinidade não magnetizados, misturados com partículas de material magnetizado

inerte em relação à adsorção. Com esse procedimento, obtiveram baixa mistura no leito. Porém, devido à complexidade do equipamento, não houve um favorecimento no que diz respeito ao aumento de escala para uso industrial.

CHASE e DRAEGER (1992) desenvolveram uma coluna cromatográfica provida de um distribuidor de fluxo que permitia uma fluidização estável do leito com escoamento tubular, mesmo utilizando adsorventes à base de agarose, convencionalmente utilizados em adsorção em leito fixo. Essa fluidização estável só era conseguida quando baixas velocidades de fluxos eram utilizadas, provocando baixa produtividade no processo de purificação de biomoléculas a partir de meios complexos. Estes pesquisadores perceberam a necessidade de serem desenvolvidos adsorventes com alta velocidade de sedimentação. Surgiu, então, a necessidade de desenvolver adsorventes capazes de exibir características físicas e adsortivas desejáveis para que a técnica de fluidização sólido-líquido pudesse ser usada na separação de biomoléculas apresentando as mesmas características encontradas em leito fixo.

Em 1993, a Pharmacia Biotech introduziu no mercado novos tipos de adsorventes e colunas denominadas STREAMLINE, designados especialmente para a tecnologia de leito expandido. Altas velocidades de fluxos podem ser usadas durante a aplicação da amostra, devido às partículas de adsorventes possuírem altas velocidades de sedimentação conseguida através da inclusão de um núcleo de cristal de quartzo na matriz de agarose. Têm sido desenvolvidos novos tipos de adsorventes, mantendo-se as características de alta densidade, oriundos de vários tipos de materiais RICHARDSON; ZAKI, 1954; SANTOS, GUIRARDELLO; FRANCO, 2000.

A principal vantagem da utilização da adsorção em leito expandido sobre a cromatográfica convencional em leito fixo é que a coluna pode ser alimentada com uma solução contendo células ou resíduos celulares em suspensão, sem a necessidade de remoção prévia das mesmas; reduzindo, assim, a etapa do processo referente à filtração ou à centrifugação; ou seja, reduzindo o número de etapas no processo e evitando a perda da atividade da biomolécula alvo.

As partículas adsorventes utilizadas na adsorção em leito expandido possuem uma distribuição de tamanho e de densidade. Essa distribuição provoca o fenômeno de segregação no leito, que nada mais é do que um gradiente de concentração dentro

da coluna, com as partículas menores ou menos densas posicionando-se na parte superior do leito, e as maiores ou mais densas, na parte inferior. Dessa forma, o leito expandido pode ser considerado como composto por diversos leitos fixos agrupados formando o leito total. É esse comportamento que dá estabilidade ao leito e faz com que na adsorção em leito expandido o fluido apresente um comportamento mais próximo de regime empistonado do que o de completamente misturado.

4.1. PRINCÍPIOS E OPERAÇÃO

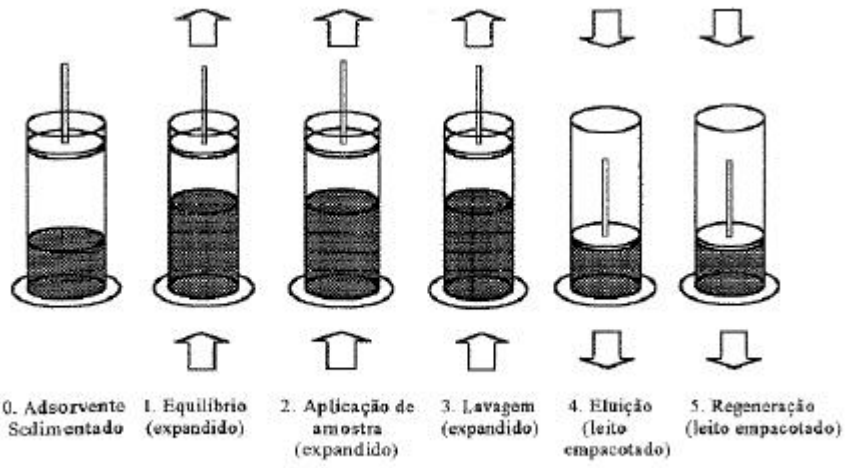
A adsorção em leito expandido baseia-se na fluidização. Dessa forma, partindo-se de um leito fixo, e aumentando-se a vazão do fluido, atinge-se uma velocidade na qual a força de arraste se iguala ao peso das partículas, ou seja, a força de arraste fica igual à queda de pressão em uma determinada área transversal. Então, um leito fluidizado estável é formado quando as partículas adsorventes são suspensas devido ao equilíbrio entre a velocidade de sedimentação e a velocidade do fluido ascendente. Diferente da técnica de fluidização convencional, que é caracterizada principalmente pela ocorrência da mistura resultando, assim, em uma baixa eficiência de ligação adsorvente-proteína, essa técnica opera em condições "suaves" de fluidização, ocasionado pela segregação das partículas adsorventes e caracterizado por um baixo Re_p (Reynolds da partícula), da ordem de 0,5-1, aumentando, então, a eficiência da ligação adsorvente-proteína.

O equipamento utilizado na adsorção em leito expandido consiste basicamente de uma coluna com um distribuidor e um pistão, que permitem a mudança de posicionamento durante o processo, além dos acessórios comuns aos processos cromatográficos como bombas, registradores, etc.

O modo de operação da adsorção em leito expandido difere um pouco dos processos cromatográficos convencionais (leito fixo), uma vez que se opera com uma maior porosidade, da ordem de 0,7 a 0,8 para velocidade linear (na ordem de 300,0 cm/h a 400,0 cm/h), quando comparado com os processos em leito fixo, cujos valores típicos de porosidade do leito são de aproximadamente 0,4. É baseado nesse fato que se utiliza o leito expandido como alternativa para os processos biotecnológicos que contêm material particulado, uma vez que as células rompidas ou não, podem passar pelo leito sem obstruir a coluna.

Na adsorção em leito expandido, o equilíbrio entre o sistema tamponante e o adsorvente é realizado com o fluxo ascendente e com o leito na forma expandida. Ou seja, nessa etapa o pistão é posicionado na parte superior da coluna permitindo assim a expansão de leito. Após a etapa de equilíbrio, segue-se a etapa de aplicação de material. Essa etapa também é realizada com fluxo ascendente e com o leito na forma expandida, ou seja, com uma maior porosidade do leito. Aplicada a amostra, realiza-se a lavagem, também com fluxo ascendente para se retirar do leito o material fracamente ligado ao adsorvente, tais como células residuais, outros tipos de materiais particulados e moléculas não adsorvidas.

Em seguida, o fluxo de solução tamponante para o leito é interrompido, espera-se a sedimentação do adsorvente, e o pistão é abaixado até a superfície do adsorvente. Nessa etapa, o sentido do fluxo é invertido e a eluição é realizada com o sentido do fluxo descendente com o leito fixo. Pode-se utilizar a eluição da proteína alvo com o leito expandido, porém, o volume de eluição é menor diluindo-se a proteína alvo na solução, o que não é interessante. Após a eluição, a regeneração do adsorvente é realizada *in situ.* Como na eluição, o procedimento de limpeza, pode ser realizado tanto na forma expandida como em leito fixo; sendo que o modo fixo é mais comum. A Figura 3 ilustra as etapas usadas na adsorção em leito expandido.



Fonte: THÖMES et al. (1994)

Figura 3. Representação esquemática dos passos na adsorção em leito expandido

4.2. HIDRODINÂMICA DO LEITO EXPANDIDO

O conhecimento do comportamento do leito em função das propriedades físicas das partículas e do fluido é de fundamental importância para as operações usando leito expandido. Essa caracterização ocorre principalmente medindo-se a expansão do leito em função da velocidade do fluido, ou observando-se a influência de outros fatores como distribuição de tamanho de partículas, viscosidade do fluido e presença de células.

CHASE e DRAEGER (1992) mencionaram que o sucesso da purificação de proteínas usando a adsorção em leito expandido depende crucialmente da habilidade do sistema em produzir um leito com expansão estável. Essa condição é fundamental para que se possa realizar um aumento de escala, partindo-se de resultados obtidos em pequena escala em laboratório.

Uma das formas de conhecer o comportamento de um leito fluidizado em função das propriedades físicas das partículas e do fluido é através da correlação de RICHARDSON e ZAKI (1954). Para partículas rígidas, os autores propuseram que a relação entre a velocidade superficial do líquido (U) e a velocidade de equilíbrio (U_t) fosse dada por:

$$\frac{U}{U_t} = e^n \tag{1}$$

Em que e é a porosidade do leito e n é o coeficiente de Richardson e Zaki.

A porosidade do leito expandido é determinada por uma relação do grau de expansão do leito. O grau de expansão do leito fornece a relação entre a altura final do leito após a expansão (H) e a altura do leito sedimentado (H_o).

$$e = 1 - (1 - e_0)\frac{H_0}{H} \tag{2}$$

Sendo e_0 a porosidade do leito fixo.

Através da linearização da equação (2), pode-se determinar a velocidade de equilíbrio de uma partícula e o coeficiente de Richardson e Zaki experimentais, se a porosidade do leito for conhecida. A equação (4) representa a forma linearizada de Richardson e Zaki.

$$\ln U = \ln U_t + n \ln e \tag{3}$$

O valor de n é dado em função do número de Reynolds terminal (Re_t) e da relação entre o diâmetro da partícula (d) e da coluna (D).

$$n = 4{,}65 + 20(d / D) \qquad (\mathrm{Re}_t < 0{,}2) \tag{4}$$

$$n = 4{,}40 + 18(d / D)\,\mathrm{Re}_t^{-0{,}03} \qquad (0{,}2, < \mathrm{Re}_t < 1{,}0) \tag{5}$$

$$n = 4{,}40 + 18(d / D)\,\mathrm{Re}_t^{-0{,}1} \qquad (1{,}0 < \mathrm{Re}_t < 200) \tag{6}$$

$$n = 4{,}40\,\mathrm{Re}_t^{-0{,}1} \qquad (200 < \mathrm{Re}_t < 500) \tag{7}$$

$$n = 2{,}40 \qquad (\mathrm{Re}_t > 500) \tag{8}$$

Em que Re_t é dado pela expressão:

$$\mathrm{Re}_t = \frac{v_t\, r\, d}{m_l} \tag{9}$$

Em que d é o diâmetro da partícula, r a densidade do líquido, m_l a viscosidade do líquido e U_t a velocidade terminal ou de Stokes apresentada na equação (11):

$$v_t = \frac{d^2 g}{18 m_l}(r_s - r) \tag{10}$$

Sendo r_s a densidade do sólido.

Existem três modos de se avaliar a estabilidade do leito.

4.2.1. Observação visual

A observação visual da estabilidade do leito é mais usada como um caráter confirmativo, por ser esta rápida e não dispendiosa. Um fato desfavorável para o uso desse modo é que ele não garante a reprodutibilidade dos resultados (DOS SANTOS, 2001).

4.2.2. Grau de expansão (H/H_0)

Este é o modo mais prático e utilizado na caracterização de um leito expandido. O grau de expansão é um número adimensional, que consiste na medida

relativa da altura do leito expandido, para uma determinada vazão, com a do leito fixo do adsorvente (CHANG; CHASE, 1996(a); KARAU et al., 1997).

4.2.3 Distribuição do tempo de residência (DTR)

A distribuição do tempo de residência (DTR) é obtida utilizando-se uma técnica de estímulo e resposta que caracteriza o tipo de escoamento dentro da coluna. O conhecimento do tipo de escoamento existente, ou seja, saber se o mesmo é empistonado ou misturado, é de fundamental importância, pois as diferentes características destes influenciam a cinética de adsorção proteína-adsorvente.

Dentre as técnicas de estímulo e resposta existentes, as técnicas conhecidas como pulso e análise frontal são aplicadas no estudo da expansão do leito. A análise frontal com sinal negativo relaciona o coeficiente de dispersão axial (D_{axi}) e o número de pratos teóricos (N) pela relação:

$$N = \frac{UH}{2eD_{axi}} \tag{11}$$

(U) a velocidade do fluido, (D_{axi}) o coeficiente de dispersão axial da fase líquida, (N) o número de pratos teóricos, (H) a altura do leito expandido e (e) a porosidade do leito dada pela equação (3).

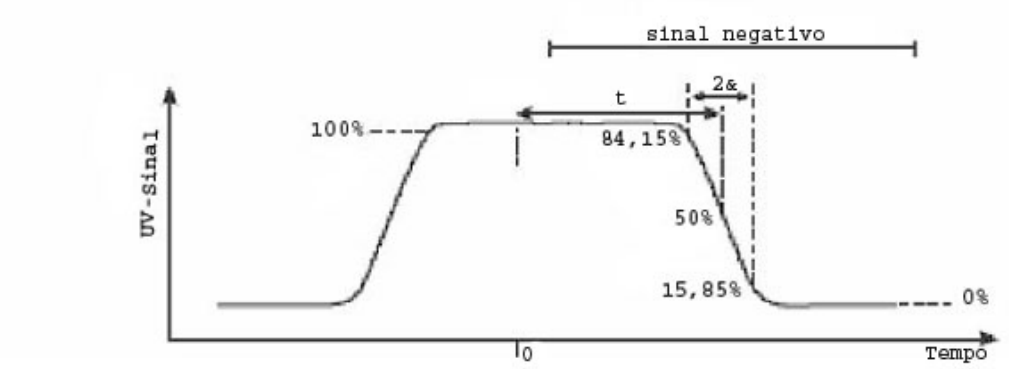
O tampão (fosfato 20 mM, pH 7,0) é bombeado pelo leito até a obtenção de uma resposta estável. O pistão móvel da coluna é movido até a superfície do leito e o escoamento permanece até a estabilização da leitura no detector. Em seguida, a fase móvel contendo o tampão fosfato e 1% (v/v) de acetona foi escoada pela coluna até a estabilização da leitura da absorbância máxima (etapa do sinal positivo).

Neste instante, troca-se a fase móvel por uma isenta de acetona e estabelece-se este como tempo zero. O escoamento é mantido até que se verifique o registro da absorbância como zero. Define-se então o tempo de residência médio como o tempo gasto para que a absorbância seja igual a 50% de seu valor máximo. O desvio padrão é dado como a metade do intervalo de tempo entre os valores respectivos a 15,85 % e 84,15 % da absorbância máxima. O número de pratos teóricos (N) é determinado pela técnica de sinal negativa por:

$$N = \frac{t^2}{s^2} \tag{12}$$

A relação entre o coeficiente de dispersão do líquido (D_{axi}) e N é dada pela equação (12).

A Figura 4 mostra um esquema da utilização da técnica frontal na determinação do tempo de residência (DTR).



Fonte: EBA HANDBOOK, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (1997)

Figura 4. Determinação do tempo de residência (DTR)

4.3. TRANSPORTE DE MASSA NO FLUIDO

Antes de se difundir para a superfície interna dos poros, a proteína deve ser transferida da solução para a superfície do adsorvente. Dessa forma, é comum expressar o coeficiente de transferência de massa (k_f) em termos do número de Reynolds e do número de Schmidt, que se baseia na existência de um filme de líquido estagnado na superfície externa da partícula. Para os processos com leito fluidizado é importante considerar o efeito de expansão do leito que, por sua vez, é função da velocidade. THÖMMES (1997) apresenta uma correlação para o cálculo de coeficiente de transferência de massa na fase líquida, que considera o efeito da expansão do leito, na forma:

$$k_f = \frac{D_{AB}}{d_p}\left[2 + \left(1{,}5\left((1-e)\,\mathrm{Re}_p\right)^{1/2} Sc^{1/3}\right)\right] \qquad (13)$$

O valor de k_f pode variar de acordo com os parâmetros de operação dos processos, tais como: vazão, viscosidade da fase líquida e tamanho das partículas.

4.4. TRANSPORTE DE MASSA NA PARTÍCULA

Na adsorção de proteínas os adsorventes são porosos com sítios ativos na sua superfície interna. Sabe-se que a adsorção de proteínas em colunas cromatográficas é um processo cuja taxa de difusão para os poros dos adsorventes é um fator limitante. HJORTH et al. (1995) determinaram a capacidade de adsorção da resina Streamline SP, usando leito expandido, para as proteínas lizosima e da albumina de soro bovino (BSA). Estes pesquisadores observaram uma redução da capacidade de adsorção com o aumento da velocidade, sendo o efeito para a BSA maior do que o da lizosima devido ao seu maior tamanho. Então, os parâmetros que influem na cromatografia usando leito fixo também influem na adsorção usando o leito expandido. Entre estes se destacam a difusividade efetiva e o tamanho da partícula.

4.5 APLICAÇÕES

A adsorção em leito expandido pode ser usada para processar praticamente todos os tipos de materiais como, por exemplo, proteína recombinate de homegenados de bactérias (FREJ et al., 1994; HANSSON et al., 1994), purificação de anticorpos monoclonais (THÖMMES et al., 1995b; THÖMMES et al., 1996; BORN et al., 1996), caldos de fermentação não clarificados de bactérias e leveduras (CHANG; CHASE, 1996b; McCREATH et al., 1995), extração de proteínas de leite (NOPPE et al., 1996) e extrato de tecido animal (GARG et al., 1996).

5. CONCLUSÕES

O crescente interesse na purificação de glicomacropepitídeo do soro de queijo tem sua origem tanto no seu elevado valor nutricional e funcional, quanto no potencial de aplicações médico-terapêuticas às quais se adequa. Entre as aplicações biológicas potenciais do GMP, estão a inibição de cáries dentárias, os efeitos na secreção gástrica promovendo a atividade de crescimento da bifidobactéria, a modificação do crescimento da bactéria do ácido lático, entre outras.

Esforços têm sido empregados em processos para a produção de GMP em grande escala onde as propriedades nutricionais e biológicas não sejam perdidas. Dentre estes métodos que podem obter o GMP do soro de leite ou concentrado

protéico do soro, estão os que utilizam resinas de troca de íons e hidrofóbicas em leito fixo, leito expandido ou ultrafiltração.

A técnica de separação de leito expandido com resina em coluna por cromatografia reduz o número de etapas de separação, e é de grande interesse na área de bioprocessos, uma vez que os métodos tradicionais (leito fixo) podem comprometer em até 80% do custo do processo de recuperação de um bioproduto.

A principal vantagem da utilização da adsorção em leito expandido sobre a técnica cromatográfica convencional em leito fixo é que a coluna pode ser alimentada com solução contendo partículas sem necessidade de remoção prévia das mesmas reduzindo, assim, a etapa do processo referente à filtração e/ou centrifugação, fazendo com que o processo seja mais econômico.

6. NOMENCLATURA

Símbolo	**Descrição**
d	Diâmetro da partícula
D	Diâmetro de coluna
D_{axi}	Coeficiente de dispersão axial da fase líquida
D_{AB}	Coeficiente difusão livre no fluido
g	Aceleração de gravidade
H_o	Altura do leito sedimentado
H	Altura final do leito após a expansão
k_f	Coeficiente de transferência de massa
n	Coeficiente de Richardson e Zaki
N	Número de pratos teóricos
Re_t	Número de Reynolds
Re_p	Reynolds partícula
t	Tempo
Sc	Número de Schmidt
U	Velocidade superficial do líquido
U_t	Velocidade de equilíbrio
v_t	Velocidade terminal

Símbolos Gregos	Descrição
r_s	Densidade do sólido
r	Densidade do líquido
e	Porosidade do leito
e_0	Porosidade de leito fixo
s	Desvio padrão
m_l	Viscosidade do líquido

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO MILKBIZZ. São Paulo: Editora Milkbizz Ltda, 2005.

BASCOUL, A. BENAIJA, E. H., BERTHAUD, Y., TORRENTI, J. M., ZIZI, Z. Movents des perticules en fluidization liquide. **Chemical Engineering Journal.** Vol.6, 1340-1350, 1993.

BATT, B. C., YABANNAVAR, V. M., SINGH, V. Expanded bed adsorption for protein recovery from whole mammalian cell culture broth. **Bioseparation**. Vol. 5, 41-52, 1995.

BEM-HASSAN, R. M., GHALY, A. E. Continuous propagation of kluyveromyces fragilis in cheese whey for pollution potential reduction. **Appl. Biochem. Biotech.** Vol.47, p.89-105, 1994.

BORN, C., THÖMMES, J., BISELLI, M., WANDREY, C., KULA, M-R., An approach to integrate antibody production: Coupling of fluidized bed cultivation and fluidized bed adsorption. **Bioprocess Engineering**. Vol.15, 21-29, 1996.

BRODY, E.P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. **British Journal of Nutrition.** Vol. 84, suppl.1, p.39-46, 2000.

BUIJS, J., WESSELINGH, J. A. Batch fluidized ion-exchange column for streams containing suspend particles. **Scientific Publishing Company Amsterdam.** 1980.

BURRINGTON, K. J. The whey to nutrition. **Dairy Pipeline**.Vol. 14, n.2, p.01-03, 2002.

CARRERE, H. **Extraction des proteines du lactoserum par chromatographie D'echange D'ions en lit fluidese. Modelation et optimisation.** Toulouse: L'institut National Polytechnique de Toulouse 1993.

CASAL, E., CORZO, N., MORENO. F. J., OLANO, A. Selective recovery of glycosylated caseinmacropeptide with chitosam. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** Vol. 53, 1201-1204, 2005.

CHANG, Y. K. CHASE, H. A., Development of operating conditions for protein using expanded bed techniques: The effect oh the degree of bed expantion on adsorption performance. **Biotechnology and Bioengineering**. Vol. 49, 512-526, 1996 (a).

CHANG, Y. K., CHASE, H. A., Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. **Biotechnology and bioengineering**. Vol. 49, 204-216, 1996 (b).

CHANG, Y. K., McCREATH, G. E., DRAEGER, N. M., CHASE, H. A., Novel technologies for direct extraction of proteins. **Trans. Inst. Chem. Engs**. Vol. 71B, 299-303, 1993.

CHASE, H. A. DRAEGER, N. M., Affinity purification of proteins using expanded beds. **Journal of Chromatography A**. Vol. 597, 129-145, 1992.

CHASE, H. A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. **Tibtech**. Vol. 12, 296-303, 1994.

CHEN, W., TONG X., DONG X., SUN Y., Expanded bed adsorption of protein with DEAE Spherodex M. **Biotechnol. Prog.** 2003, Vol. 19, 880-886, 2003.

CHETTY, A. S., BURNS, M. A., Continuous protein separations in a magnetically stabilized fluidized bed using nonmagnetic supports. **Biotechnology and bioengineering**. Vol. 38, 963-971, 1991.

CONRADO, L. DE S. **Influência da temperatura, grau de expansão e altura do leito sobre a recuperação e purificação da Alfa-Lactalbumina a partir do soro de leite bovino em leito expandido de resina hidrofóbica.** Dissertação de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003, 134p.

DASARI, G., PRINCE, I., HEARN, M. T. W., High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins, CXXIV. Physical characterization of fluidized-bed behaviour of chromatographic packing materials. **Journal of Chromatography A.** Vol. 631, 115-124, 1993.

DAVISCO, disponível: em www.daviscofoods.com, abril, 2005.

DE LUCA, L., HELLENBROICH, D., TITCHENER-HOOKER, N. J., CHASE, H. A., A study of the expansion characteristics and transient behaviour of expanded beds of adsorbent particles suitable for bioseparations. **Bioseparation.** Vol. 4, 311-318, 1994.

DOS SANTOS, E. S. **Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leito expandido.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001, 151p.

DRACZ, S. **Desenvolvimento de um novo método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite**. Viçosa, MG: UFV. 1996. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DZIUBA, J., MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabiling ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's k-casein. **Int. Dairy j..** Vol. 6, 1017-1044,1996.

EL-SALAM, A.M. H.; EL-SHIBINY, S.; BUCHHEIM, W. Characteristics and potential uses of the casein macrompeptide. **Int. Dairy J**.. Vol. 6:327-341. 1996

FREJ, A-K. B., HJORTH, R., HAMMARSTRÖM, A., Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified Escherichia coli homogenate using expanded bed adsorption. **Biotechnology and Bioengineering.** Vol. 44, 922-929, 1994.

FREJ, A-K. B., JOHANSSON, H. J., JOHANSSON, S., LEIJON, P., Expanded bed adsorption at production scale: scale-up verification, process example and sanitization of column and adsorbent. **Bioprocess Engineering**. Vol. 16, 57-63, 1997.

GARG, N., YU, I., MATTIASSON, G. MATTIASSON, B., Polymer-Shielded dye-ligand chromatography of lactecte dehydrogenase from porcine muscle in a expanded bed system. **Bioseparation.** Vol. 6, 193-199, 1996.

GOPAL, D., PRINCE, I., HERN, M. T. W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. CXXIV. Physical characterization of fluidized-bed of chromatographic packing materials**. Journal Chromatography.** Vol. 631, 115-124, 1993.

HANSSON, M., STAHL, S., HJORTH, R., UHLÉN, M., MOKS, T., Single-step recovery of a secreted recombinant protein by expanded bed adsorption. **Biotechnology.** Vol. 12, 285-288, 1994.

HJORTH, R., KÄMPE, S., CARLSSON, M., Analysis of some operating parameters of novel adsorbents for recovery of proteins in expanded beds. **Bioseparation.** Vol. 5, 217-223, 1995.

IDOTA, T.; KAWAKAMI, H.; NAKAJIMA, I. Bifidobacterium growth promoting activity effect on N-acetylneuraminic acid containing substances. **Biosci. Biotech. Biochem.** Vol. 58, 1720-1722, 1994.

JAMES, E. A. **The application of multicomponent adsorption theory to an ion exchange chromatography system for recovery of whey proteins.** Brisbane:

Department of Chemical Engineering, Thesis. The University of Queensland 1994

KAWASAKI, Y; KAWAKAMI, H.; TANIMOTO, M.; DOSAKO, S; TOMIZAWA, A.; KOTAKE, M.; NAKAJIMA, I. pH-independent molecular weight changes of k-casein glycomcacropeptide and its preparation by ultrafiltration. **Milchwissenschaft.** Vol. 48, n 4, 191-195, 1993a.

KULOZIK, U.; GUILMINEAU, F. Food process engineering and dairy technology at the Technical University of Munich. **International Journal of Dairy Technology.** Vol.56, n.4, 191-198, 2003.

LEVISON, P. R., HOPKINS, A. K., HATHI, P. BADGER, S. E., MANN, F., DICKSON, N., PURDOM, H. A., Suspended bed chromatography, a new approach in downstream processing. **Journal of Cromatography A**. Vol. 890, 45-51, 2000

MARTIN-DIANA A. B. ; FRIAS J. ; FONTECHA J. ; Emulsifying properties of whey protein concentrate and caseinomacropeptide of cow, ewe and goat. **Milchwissenschaft.** Vol. 60, n.4, p.363-366, 2005.

McCREATH, G. E., CHASE, H. A. OWEN, R. O., LOWE, C. R. Expanded bed affinity chromatography of dehydrogenases from baker's yeast using dye-ligand perfluoropolymer supports. **Biotechnology and Bioengineering.** Vol. 48, 341-354, 1995.

McKENZEY, H. A. **milk proteins, Chemistry and molecular biology.** Vol. 1, Academic press, New York, 1970.

MIKKELSEN, T. L.; FROKIAER, H.; TOPP, C. BONOMI, F.; IAMETTI, S.; PICARIELLO, G. Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in k-caseíne. **Journal Dairy Science.** Vol. 88, 4228-4238, 2005.

MORR, C., HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Sci. Nutrition.** Vol. 33, n.6, 431-476, 1993.

NAKANO, T.; OZIMEK, L. Gel chromatography of glycomacropeptide (GMP) from sweet whey on Ssphacryl S-200 at different pH's and on Sephadex G-75 in 6M guanidine hydrochloride. **Milchwissenschaft.** Vol. 53, n. 11, 629-632, 1998.

NEESER, JR. Milk protein hydrolysate for addressing a bone or dental disorder. **Int. Pat., n WO** 00/49885,2000.

NOPPE, W., HANSSENS, I., DE CUYPER, M. Simple two-sted procedure for the preparation of highly active pure equine milk lysozyme. **Journal of Chromatography A..** Vol. 719, 327-331, 1996.

RICHARDSON, J. H. ZAKI, W. N. Sedimentation and fluidization: part I. **Trans. Instn. Engrs.** Vol. 32, 35-53, 1954.

SANTOS, E. S., GUIRARDELLO, R., FRANCO T. T., **Distributor effect onexpanded bed adsortion. Ion Exchange at the Millenium (proceedings of IEX 2000),** ed. by J. A. Greig, SCI press, London, 408p., 2000.

SCHUPBACH, P., NEESER, J.R., GOLLIARD, M., ROUVET, M., GUGGENHEIM, B. Incorporation of caseinoglycomacropeptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutans streptococci. **J. Dent. Res**.. Vol. 75, nº 10:1779-88, 1996.

SKIDMORE, G. L., HORSTMAN, B. J., CHASE, H. A. Modelling single component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose FF. **Journal of Cromatography A**. Vol. 498, 113-128, 1990.

TAKAHASHI, N., ASAKAWA, S. DOSAKO, S. TADASHI, I. **Hypoallergenic nutritive composition**. French Pat. Appl. FR 2677850 A1, 1992.

TERRANOVA, B. E., BURNS, M. A., Continuous cell suspension processing using magnetically atabilized fluidized. **Biotechnology and Bioengineering**. Vol. 37 110-120, 1991.

THEODOSSIOU, I., THOMAS, R. T. O., TIMOTHY, J. H. Fluidisation and dispersion behaviour of small high density pellicular expanded bed adsorbents. **Journal of Chromatography A**. Vol. 964, 77-89, 2002.

THÖMMES, J., BADER, A., HALFAR, M., KARAU, A., M-R. Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein a coated adsorbent in expanded beds. **Journal Chromatography A** Vol. 752, 111-122, 1996.

THÖMMES, J., HALFAR, M., LENZ, S., KARAU, A., M-R. Purification of monoclonal antibodies from whole hybridoma fermentation broth by fluidized bed adsorption. **Biotechnology and Bioengineering**. Vol. 45, 205-211, 1995b.

THÖMES, J.; WEIHER, M.; KULA, M. R ., Expanded bed adsorption of monoclonal antibodies from whole hybridoma fermentation broth, new developments in process separation technologies – Downstream, **Pharmacia BioProcess Technology**. Vol. 17, 5-7, 1994.

TOLKACH, A., KULOZIK, Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. **J. Food Eng..** Vol. 67, 13-20, 2005.

TONG X., XUE B., SUN Y. Modeling of expanded-bed protein adsorption by taking into account the axial particle size distribution. **Biochemical Engineering Journal.** Vol. 16, 265-272, 2003.

VOUTE, N. e BOSCHETTI, E. Higly dense beded sorbents suitable for fluidized bed applications.**Bioseparation.** Vol. 8, 115-120, 1999.

WHEYPROTEIN. Disponível em: www.wheyprotein.com. Acesso em: dezembro, 2005.

YVON, M.; BEUCHER, S.; GUILLOTEAU, P.; LE HUEROU- LURON I; CORRING, T. Effects of caseinomacropeptide (CMP) on digestion regulation. **Reprod Nutr Dev**. Vol. 34, nº 6:527-37, 1994.

II. ESTUDO DO EFEITO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DO SAL NA ADSORÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA: ANÁLISE TERMODINÂMICA

RESUMO

O comportamento adsortivo do glicomacropeptído em adsorvente hidrofóbico foi estudado para quatro temperaturas (283,15 K; 298,15 K; 308,15 K e 318,15 K) e quatro concentrações de sal (0,05 M; 0,3 M; 0,6 M; 0.8 M). Os dados experimentais foram ajustados pelo modelo de Langmuir, observando-se que com o aumento da concentração de sal e da temperatura tem-se um incremento na capacidade de adsorção da resina. A análise termodinâmica de processo adsortivo usando a microcalorimetria de titulação, mostrou que o processo adsortivo de proteína é entropicamente dirigido e espontâneo.

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) é uma técnica muito utilizada para a separação de proteínas, baseada na interação reversível entre as zonas hidrofóbicas da superfície da proteína e o ligante hidrofóbico de uma resina cromatográfica (MAHN et al., 2005). A CIH alcança separações rápidas com pequenas degradações do produto, baixas exigências de solventes e níveis de purificação muito bons (QUIERIOZ et al., 2001). O mecanismo de interação hidrofóbica entre solutos e líquidos foi estudado devido à sua importância na precipitação das proteínas por *salting-out* (CHEN; SUN, 2003). A CIH é amplamente influenciada pelo tipo e concentração de sal. Nos sistemas por CIH, as proteínas são adsorvidas na presença de altas concentrações de sal e são eluídas com redução da concentração de sal (CHEN et al, 2007).

A temperatura é outro fator que afeta a CIH. Em geral, pode-se afirmar que a elevação da temperatura aumenta a retenção de proteínas enquanto que a sua diminuição promove a eluição da proteína. HJERTEN et al. (1974), GOHEEN e

ENGELHORN (1984), HEINITZ et al. (1988) e INGRAHAM et al. (1985) demonstraram que o tempo de retenção da proteína geralmente aumenta com a temperatura. Para o estudo da interação entre a proteína e a superfície hidrofóbica sólida, os pesquisadores têm desenvolvido tradicionalmente análises termodinâmicas baseadas na dependência de Van't Hoff (BOYSEN et al., 1999) e, na ultima década, está se usando a calorimetria.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento da adsorção do glicomacropeptídeo (GMP) na resina de interação hidrofóbica Streamline Phenyl, em quatro diferentes concentrações de sulfato de sódio e em quatro diferentes temperaturas. Os parâmetros termodinâmicos ($\Delta_{ads}H$, $\Delta_{ads}S$, $\Delta_{ads}G$) foram determinados através da microcalorimetria de titulação.

2. TEORIA

2.1. ADSORÇÃO EM TANQUES AGITADOS

Um sistema de adsorção em batelada, equipado com um dispositivo de agitação, constitui um tanque agitado. O volume total do tanque é V (mL). Neste tanque, um volume de adsorvente v (mL) pode ser colocado em contato com um volume de solução protéica de concentração C_o (mg.mL^{-1}) em permanente agitação. A concentração de proteína na fase líquida diminui com o tempo e, após um período, é estabelecido um equilíbrio entre a concentração da proteína na fase líquida (solução protéica) e na fase sólida (adsorvente). Para um intervalo de tempo Δt (min) medido a partir do tempo $t = 0$, a concentração de adsorvato (proteína) no adsorvente (q) é calculada através de um balanço de massa no tanque, o qual resulta:

$$q = \frac{V}{v}(C_0 - C_b) \qquad (1)$$

Em que C_b (mg.mL^{-1}) é a concentração de adsorvato em solução no final do intervalo de tempo considerado (MARQUES, 1999).

Os parâmetros experimentais foram ajustados pelo modelo de Langmuir, o qual foi proposto em 1916, para um sistema de adsorção gás-sólido. Ele assumiu

como constante o calor de adsorção e, como finito, o número de sítios de adsorção. Com estas considerações, o máximo de adsorção é obtido quando há formação de uma monocamada saturada de moléculas de soluto na superfície dos adsorventes (LANGMUIR, 1916; JACOBSON et al., 1984). Este modelo é escrito da seguinte forma:

$$q_s = q_m \frac{bC}{1+bC} \qquad (2)$$

Neste modelo, q_s é a capacidade de saturação da monocamada, b é a constante de equilíbrio de adsorção, C é a concentração de proteína no equilíbrio e Q é a quantidade de proteína adsorvida.

2.2. CÁLCULO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS

Os parâmetros do modelo das isotermas de adsorção de Langmuir podem ser determinados por regressão não linear e os parâmetros termodinâmicos, calculados pela medida direta da energia de adsorção pela calorimetria de titulação, usando-se a equação (3) para obter a entalpia de adsorção $\Delta_{ads}H$.

$$\boldsymbol{Q_{ads}} = \boldsymbol{V_s q} \Delta_{ads}\boldsymbol{H} \qquad (3)$$

Em que $\boldsymbol{Q_{ads}}$ é a energia livre atribuída à interação entre a proteína e o adsorvente hidrofóbico, V_s é o volume de absorvente na ampola, q é a quantidade de proteína adsorvida e é determinada pela correspondente isoterma de equilíbrio.

A entropia é determinada pela equação (4).

$$\Delta_{ads}\boldsymbol{G} = \Delta_{ads}\boldsymbol{H} - \boldsymbol{T}\Delta_{ads}\boldsymbol{S} \qquad (4)$$

Em que $\Delta_{ads}\boldsymbol{S}$ é a variação da entropia de adsorção, $\Delta_{ads}\boldsymbol{G}$ é a variação da energia de Gibbs de adsorção, que pode ser determinada pela equação (5).

$$\Delta_{ads}\boldsymbol{G} = -\boldsymbol{RT}\ln \boldsymbol{k_d} \qquad (5)$$

Em que kd é o parâmetro da equação de Langmuir.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

O GMP foi adquirido da Davisco, Foods International, Inc (Minnesota, EUA) e a resina Streamline Phenyl da Amershan Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). A densidade e o diâmetro da resina foram de 1.2 g/mL e 100-300 m m, respectivamente. Água ultrapura (MilliQ system, Millipore Inc., USA) e reagentes químicos de grau cromatográfico foram usados nos experimentos.

3.2. EXPERIMENTO DE ADSORÇÃO

Os dados de equilíbrio de adsorção do GMP foram determinados seguindo a metodologia para a adsorção descrita na literatura (CHEN; SUN, 2003; ZHANG; SUN, 2002). Assim, para equilibrar a resina Streamline Phenyl, 0.1 g do adsorvente foram adicionados a 10 mL de tampão fosfato (20 mM e pH 7,0) contendo o sal avaliado (Na_2SO_4) em concentrações de pré-definidas (0,05 M; 0,3 M; 0,6 M; e 0,8 M) . Após 12 horas, a solução tampão foi separada da resina e, na mesma, foram adicionadas 10 mL da solução protéica nas concentrações conhecidas. A faixa de concentração da proteína em solução variou entre (0 a 80) mg/mL. A mistura foi agitada por 12 horas (CHEN; SUN, 2003), e mantidas a 10, 25, 35 e 45 ^oC, respectivamente, em uma estufa (DBO Mod.101M\3Eletrolab, Brasil), utilizando-se o dispositivo para simular um tanque agitado proposto por FERREIRA (2001) e PEREIRA (1999). A seguir, a concentração de proteína do sobrenadante foi determinada usando-se um espectrofotômetro (Varian, Austrália) a 210 nm. A quantidade de proteína adsorvida na resina foi calculada por um balanço de massa.

3.3. MEDIDAS DE ENTALPIA DE ADSORÇÃO

As entalpias de adsorção foram medidas em um microcalorímetro de titulação isotérmica, CSC, modelo ITC 4200 (EUA). Foram tituladas dispersões contendo o tampão e 0,045 g de resina. Nestas titulações, alíquotas de 10 µL da solução de proteína (70 mg/mL^{-1}) foram adicionadas à 1,8 mL da dispersão resina/tampão.

Alíquotas da solução de proteína também foram adicionadas ao tampão puro para descontar a energia de diluição da proteína, e assim obter a energia de adsorção.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NAS ISOTERMAS ADSORÇÃO DE EQUILÍBRIO

Os experimentos de adsorção foram realizados em quatro concentrações de sulfato sódio, nas seguintes temperaturas: 283,15 K; 298,15 K; 308,15 K e 318,15 K. As representações gráficas de Q (mg de proteína adsorvida/g de resina), versus C_p (concentração de proteína na fase líquida, mg proteína/mL) são mostradas nas Figuras 1-4. Observa-se que a adsorção de GMP na resina aumenta com o incremento da concentração de sulfato de sódio. Estes resultados são consistentes com dados de CHEN et al. (2003) e ARAKAWA (1986) para a interação de proteínas em colunas hidrofóbicas de octil-sepharose e polissacarídeo, respectivamente, em solução tampão de sulfato de amônio. E também com os resultados de FERREIRA (2005) para a interação de proteínas em resina hidrofóbica Streamline Phenyl em coluna empacotada de leito fixo e uma solução tampão com fosfato de sódio.

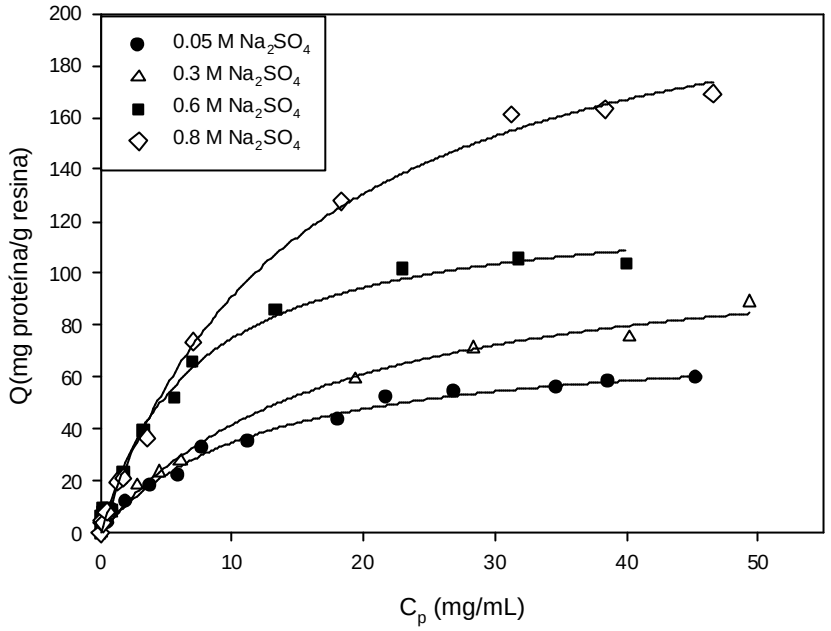


Figura 1. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e temperatura de 10°C.

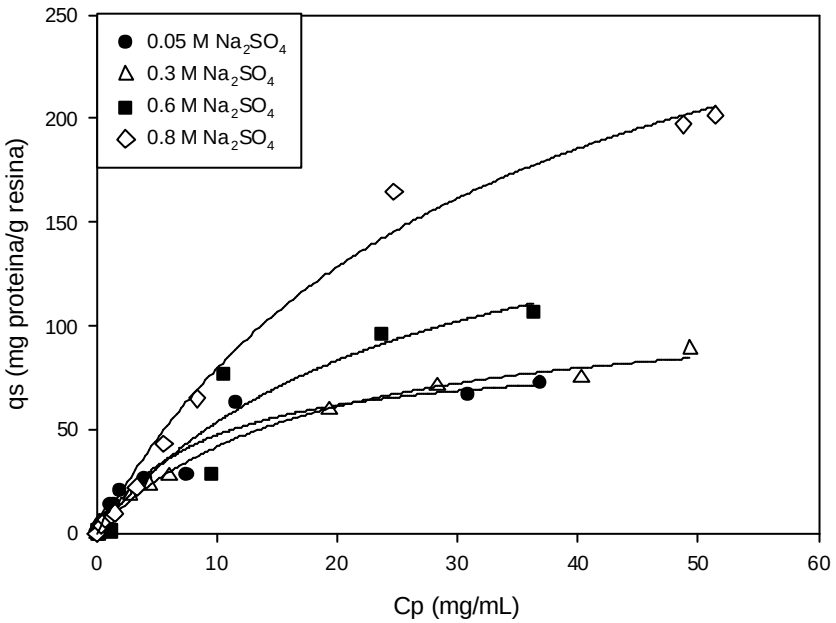


Figura 2. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e temperatura de 25°C.

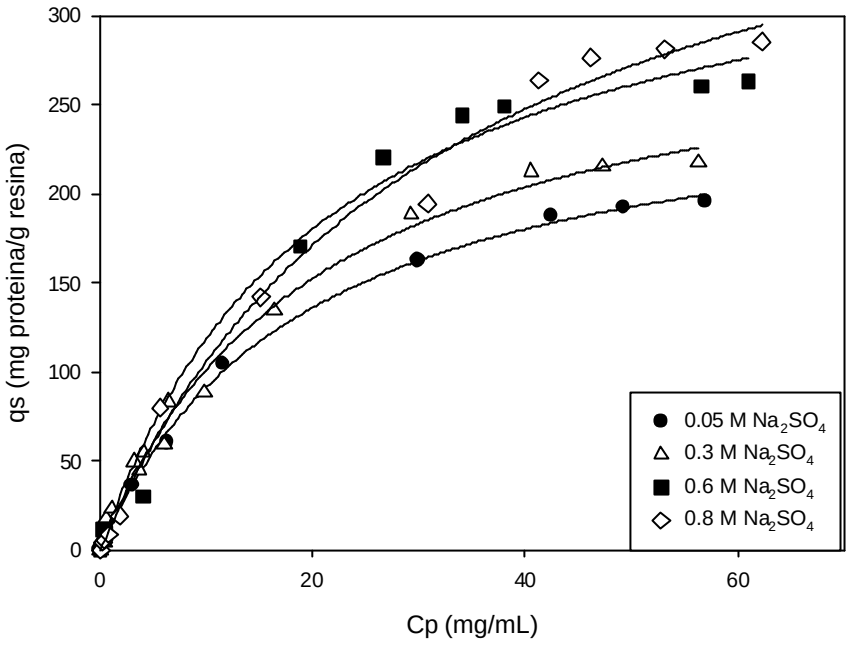


Figura 3. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e temperatura de 35°C.

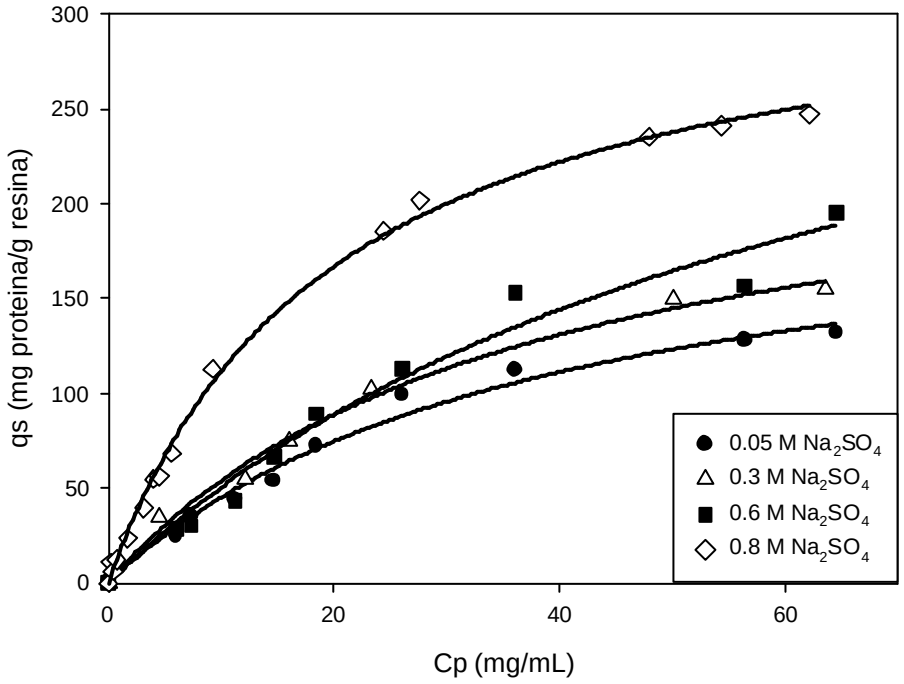


Figura 4. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e temperatura de 45°C.

Pode-se explicar o aumento das interações hidrofóbicas quando o processo adsortivo ocorre em altas concentrações de sal, levando-se em consideração a distribuição de moléculas e cargas elétricas (íons) na interface da proteína e no interior da solução. No pH igual a 7, a proteína encontra-se carregada negativamente (pI=4,3), tendo ao seu redor uma distribuição de íons de mesmo sinal e de sinal contrário à carga da superfície da proteína. Além disso, moléculas de H_2O também se distribuem e se reorientam nas proximidades da interface proteína/solução. A distribuição destes íons gera uma diferença de potencial elétrico entre a interface da proteína e um ponto qualquer na solução. Por sua vez, esta diferença de potencial elétrico também influencia a distribuição destes íons. A região descrita acima é conhecida como dupla camada elétrica.

A interação dos íons e das moléculas de água com a interface da proteína é regida por três fatores termodinâmicos que, no equilíbrio, permanecem constantes (equação 6).

$$m^o + RT \ln x_i + z_i e \Delta j N = cons\tan te \qquad (6)$$

Em que m^o é o potencial da espécie química que está interagindo molecularmente com a superfície da proteína. Assim, quanto maior for a interação molecular, maior será a adsorção da espécie i na interface da proteína. Em nosso sistema são as moléculas de água que estão em maior concentração na interface proteína/solução. Estas moléculas estão orientadas tendo, por isto, uma baixa entropia configuracional, quando comparada às moléculas do interior da solução.

O termo $RT \ln x_i$ expressa a contribuição da entropia configuracional sobre a distribuição dos íons. Quanto mais simétrica em termos de cargas elétricas for a distribuição dos íons, maior será a entropia configuracional. Já o termo $z_i e \Delta j N$ expressa a contribuição das interações eletrostáticas na distribuição iônica da dupla camada elétrica. Quanto maior for a carga elétrica da proteína, maior será o valor de Δj e, conseqüentemente, mais assimétrica será a distribuição dos íons, ou seja, maior número de cátions estarão próximos à interface da proteína, enquanto os ânions estarão concentrados longe da interface.

Em resumo, podemos afirmar que existem basicamente duas regiões ao redor da proteína. A primeira, bem próxima à interface, dominada por interações moleculares fortes, é formada por moléculas e íons orientados, com uma forte

diminuição da entropia configuracional. Esta camada é chamada de região interna da dupla camada elétrica. A segunda é formada por espécies químicas que interagem preferencialmente por interação eletrostática e são também dominadas por aspectos entrópicos. Esta região é denominada de camada difusa.

A função do sal sulfato de sódio é modificar as interações intermoleculares provenientes da dupla camada elétrica, alterando, assim, a distribuição molecular e iônica desta região. Em baixas concentrações de sulfato de sódio, é a região difusa a primeira a mudar a distribuição de íons pois, aumentando-se a concentração de cátion (Na^+) e ânions (SO^{-2}) nesta região, diminui-se a diferença de densidade de carga, reduzindo assim o valor de Δj e, conseqüentemente, a interação dos íons com a proteína. Este efeito geralmente é denominado blindagem eletrostática da região difusa da dupla camada elétrica. Aumentando-se ainda mais a concentração do sal, poderá ocorrer a interação de seus íons com as moléculas de água presentes na camada interna dessolvatando a interface da proteína, isto é, alterando m_i^o.

O processo de adsorção da proteína pode ser esquematizado nas seguintes etapas: primeiramente ocorre a deionização da camada difusa da proteína e, em seguida, a dessolvatação da interface protéica, permitindo, assim, a exposição das regiões hidrofóbicas. Finalmente, ocorre a interação proteína-substrato. Desta forma, o aumento da interação hidrofóbica verificada com o aumento da concentração do eletrólito, pode ser atribuído a um menor custo energético para deionizar e dessolvatar a proteína durante o processo de adsorção. Entretanto, para dar maior suporte termodinâmico a este modelo é necessário determinar as contribuições entálpicas e entrópicas para o processo de adsorção.

4.2. EFEITO DA TEMPERATURA NA ADSORÇÃO

As Figuras 5-8 mostram as isotermas de adsorção de onde se observa o efeito da temperatura na interação entre o GMP e a resina Streamline Phenyl nas mesmas concentrações de Na_2SO_4.

A estrutura dobrada da proteína pode ser parcialmente destruída a temperaturas altas, expondo a hidrofobicidade contida em seu núcleo interno, aumentando a interação hidrofóbica com a resina. Também, o incremento da

interação hidrofóbica entre a proteína e o ligante hidrofóbico pode induzir inativação térmica irreversível (DILL, 1987).

Pode-se explicar também a influência da temperatura sobre a adsorção hidrofóbica em uma determinada concentração de sal. Pode-se considerar que a proteína encontra-se carregada e rodeada de uma camada de água que está sob o efeito do campo elétrico gerado pela proteína (camada de Sterr), por existir uma camada de íons positivos e negativos da solução na vizinhança (camada difusa) que também está influenciada pela carga da proteína.

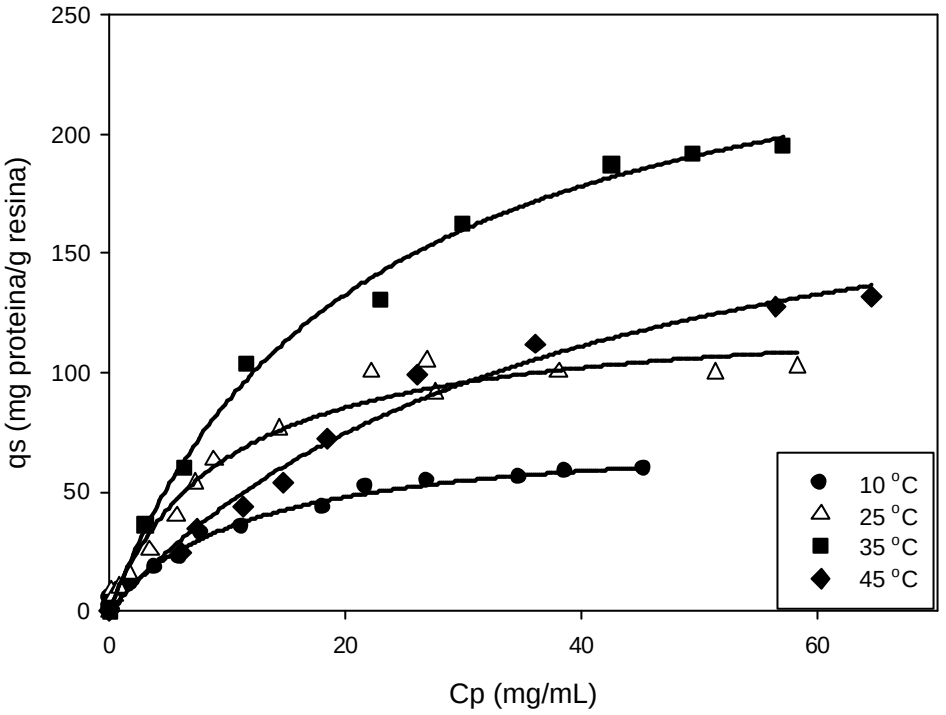


Figura 5. Isotermas de GMP a diferentes temperaturas e concentração de 0,05 M Na_2SO_4.

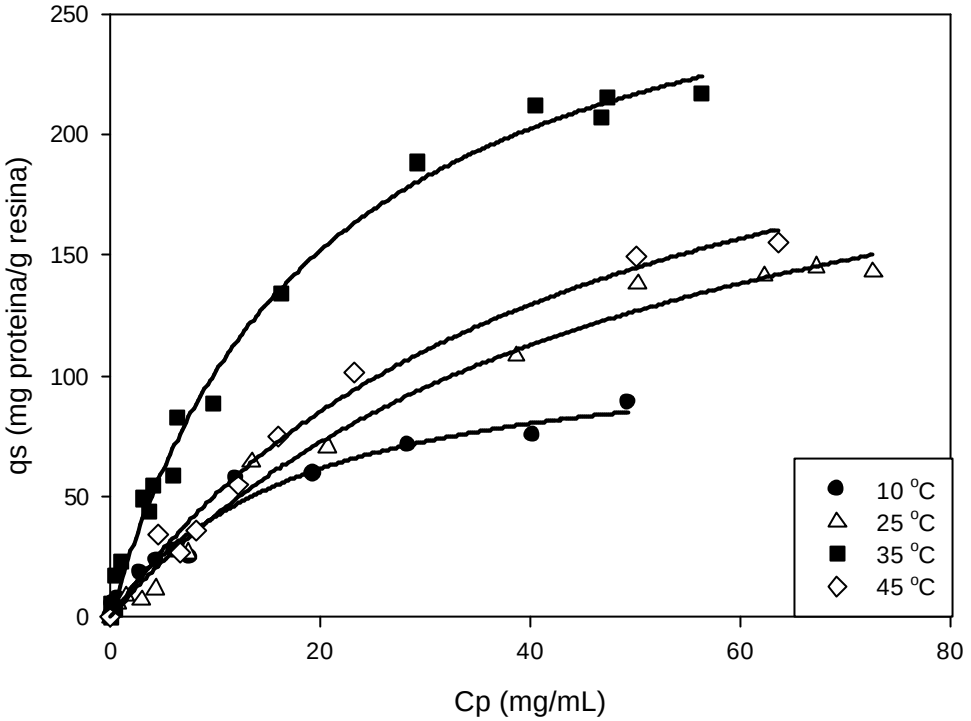


Figura 6. Isotermas de GMP a diferentes temperaturas e concentração 0,3 M Na_2SO_4.

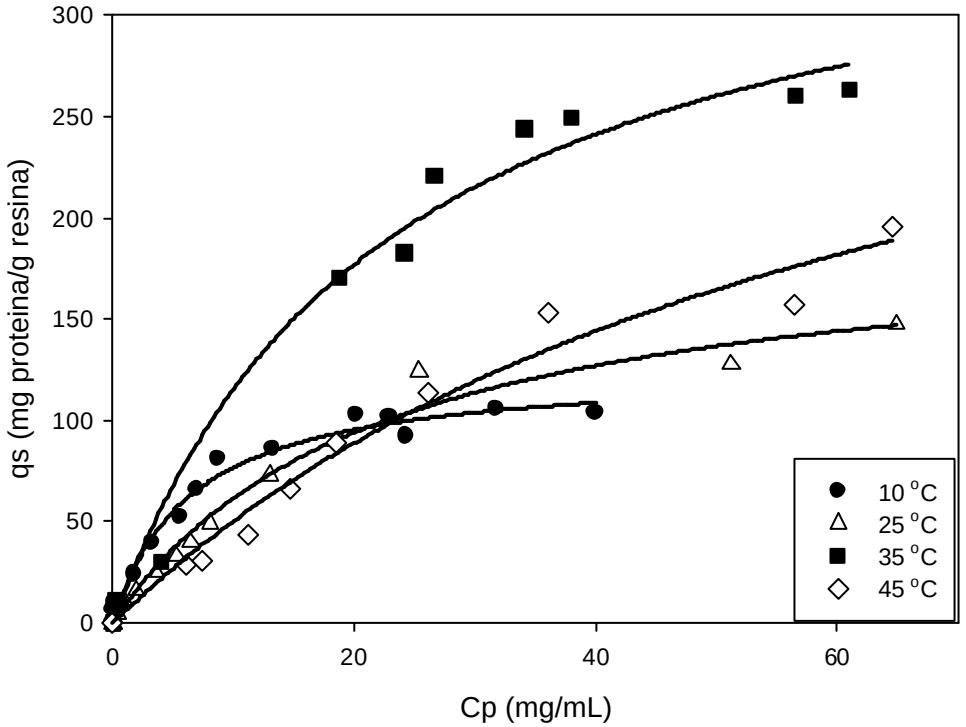


Figura 7. Isotermas de GMP a diferentes temperaturas e concentração 0,6 M Na_2SO_4.

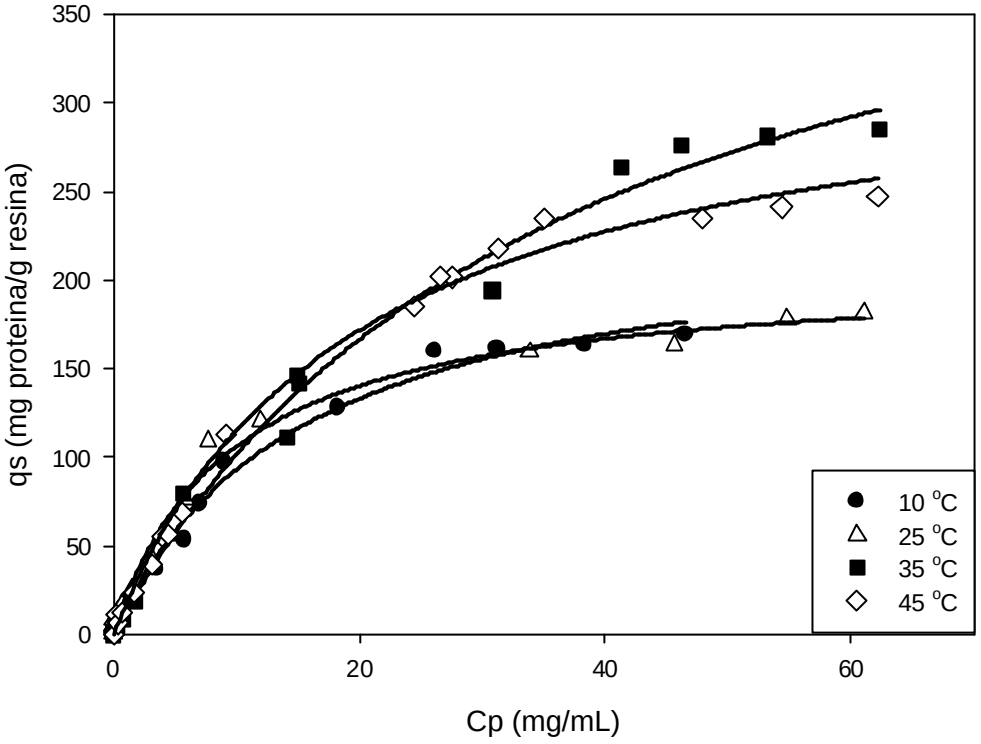


Figura 8. Isotermas de GMP a diferentes temperaturas e concentração 0,8 M de Na_2SO_4.

O aumento da temperatura provoca uma maior mobilidade dos constituintes da solução e, por sua vez, uma maior energia cinética, como a da camada difusa, que é constituída por íons, afastando-se da proteína, do mesmo modo que as moléculas de água (camada de Sterr), permitindo assim a desidratação da proteína. Assim, as zonas hidrofóbicas da proteína podem ser gradualmente expostas com o incremento da temperatura, fortalecendo a interação hidrofóbica entre a proteína e a superfície do adsorvente.

Nas Figuras 7 e 8, pode-se observar que as curvas a 10°C e 25°C não apresentam uma diferença apreciável, indicando que a afinidade de ligação da adsorção da proteína é quase inalterada em baixas temperaturas e em altas concentrações de sal. Em contraste, a afinidade da ligação entre a proteína e a matriz para a temperatura de 35°C acarreta uma elevação na adsorção, sugerindo que a redução da polaridade da solução e a diminuição da estabilidade da estrutura protéica aumentam a exposição dos resíduos hidrofóbicos do interior da proteína nesta temperatura. Em outras palavras, a transformação da proteína contribuiu para a diminuição da energia potencial de sua estrutura e aumentou a afinidade de ligação

de adsorção da proteína CHEN et al. (2003). A análise termodinâmica explica este fenômeno.

4.3. ANÁLISE TERMODINÂMICA

O comportamento da retenção da proteína GMP na resina Streamlene Phenyl foi investigado em função da concentração de sal e da temperatura. As isotermas de equilíbrio foram determinadas a partir de medidas realizadas para quatro concentrações de sal (Na_2SO_4) e quatro temperaturas. Este estudo usou a microcalorimetria de titulação isotérmica para determinar a quantidade de energia entálpica associada ao processo de adsorção, e contribuir para a análise dos resultados encontrados pela adsorção em batelada.

As Figuras 9-11 mostram a variação da entalpia de adsorção com a concentração de sal, nas temperaturas 25°C, 35°C e 45°C, respectivamente.

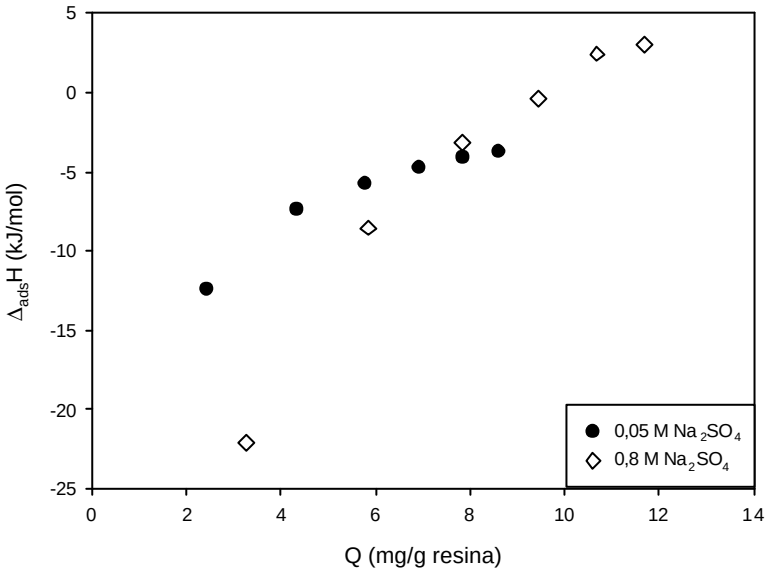


Figura 9. Variação da entalpia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e 25°C.

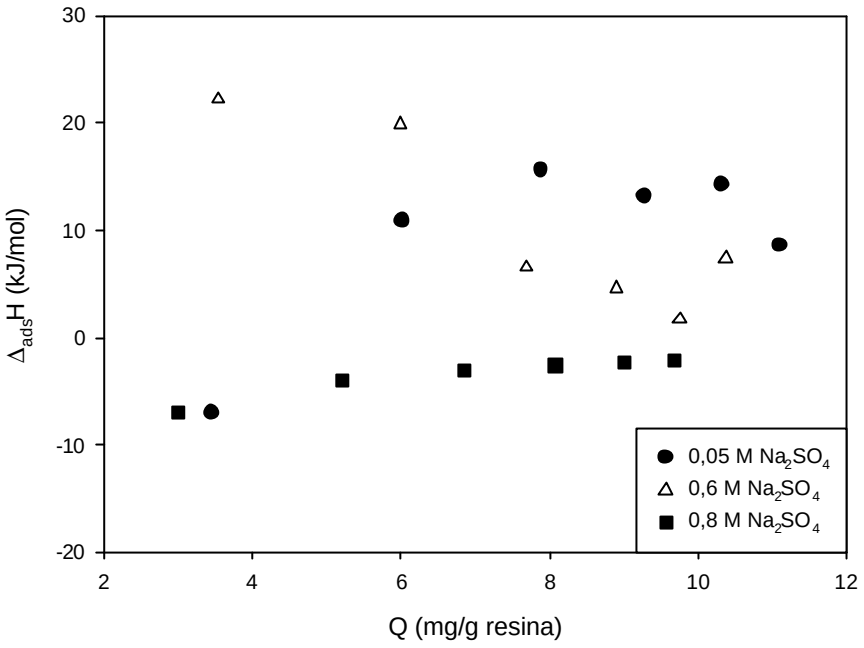


Figura 10. Variação da entalpia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e 35^{o}C.

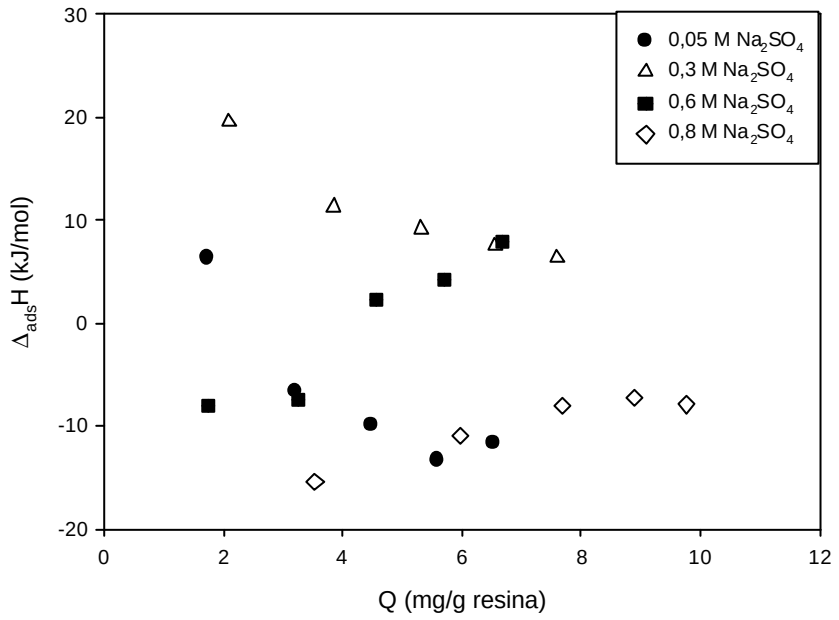


Figura 11. Variação da entalpia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e 45^{o}C.

A Figura 9 mostra que, a 25^{o} C, o aumento da concentração do eletrólito torna o processo de adsorção mais endotérmico. Na concentração de 0,05 mol L^{-1} de sal, o processo de adsorção é exotérmico, enquanto que a 0,8 mol $L^{-1,}$ necessita-se absorver energia para que o GMP concentre-se na interface. Segundo o modelo que considera o efeito do eletrólito sobre a dupla camada elétrica das proteínas, este comportamento pode ser explicado segundo as seguintes considerações: à concentração de 0,05 mol L^{-1} de Na_2SO_4, a região difusa é enfraquecida diminuindo, assim, o número de íons sob a influência da carga elétrica da proteína. Este processo tem pouco efeito sobre as moléculas de H_2O adsorvidas na interface da proteína. Assim, durante a adsorção é necessário um gasto energético para retirar as moléculas de água que estão na interface da proteína e também remover alguns íons que ainda se encontrem na região difusa da dupla camada elétrica. Entretanto, quando a concentração do eletrólito é aumentada para 0,8 mol L^{-1}, a região difusa é praticamente destruída, tornando as moléculas de H_2O de solvatação da proteína mais organizadas e interagindo mais fortemente com o biopolímero. É bem conhecido que o sulfato de sódio é um sal que quebra a estrutura tridimensional de água (sal caotrópico). Assim, para que ocorra a adsorção nesta concentração, é necessário um maior gasto energético para retirar as moléculas de água adsorvidas na interface proteína/solução. É importante destacar que a 25^{o}C as moléculas de água estão interagindo fortemente com a proteína de tal forma que o sulfato de sódio não consegue retirá-las.

Quando a temperatura é aumentada para 35^{o}C (Figura 10), ocorre uma diminuição nas interações H_2O-proteína e nas interações eletrostática íon-íon ou íon-proteína existentes na dupla camada elétrica. Desta forma, o aumento da concentração de sal de 0,05 para 0,6 mol L^{-1} é suficiente para a destruição da região difusa da dupla camada elétrica, mas não o suficiente para retirar as moléculas de solvatação. Assim, estas moléculas de água interagem mais fortemente com a proteína, o que leva ao aumento da energia de adsorção tornando, assim, o processo mais endotérmico. Mas o aumento da concentração do Na_2SO_4 de 0,6 para 0,8 mol L^{-1} foi suficiente para retirar parcialmente as moléculas de solvatação, tornando assim desnecessário o fornecimento de energia para retirá-las durante a adsorção, tendo como conseqüência uma liberação de energia durante a adsorção.

Na temperatura de 45^{o}C (Figura 11), podemos observar o comportamento que reforça o modelo proposto. Como demonstrado acima, à concentração de 0,05 mol L^{-}

^{1} de sulfato de sódio, tanto a região difusa quanto a camada de solvatação são preservadas, lembrando que com a presença dos íons na região difusa, ocorre a desestruturação das moléculas de água de solvatação. Desta forma, a energia necessária para arrancar os íons e a água é menor, tornando o processo de adsorção exotérmico. Nesta temperatura, o incremento da concentração do sal para 0,3 mol L^{-1} foi suficiente para retirar os íons da região difusa e, com isto, organizar as moléculas de água próximas a interface da proteína tornando, assim, mais intensas as interações H_2O-proteína. Este efeito teve como conseqüência uma maior gasto de energia para o processo de dessolvatação, o que levou a necessidade de absorver energia para que ocorresse a adsorção. Com o aumento da concentração do eletrólito (0,6 e 0,8 mol L^{-1}), o processo de adsorção ficou menos endotérmico, o que demonstra que, o aumento da concentração de íons ao redor da proteína, tanto a região difusa quanto a camada mais interna são destruídas, necessitando, assim, de menos energia para que ocorra a adsorção.

O modelo descrito acima também se aplica para explicar o efeito da temperatura sobre a entalpia de adsorção (Figuras 12, 13). Estas figuras mostram a variação da entalpia de adsorção com a temperatura e a concentração de sal constante.

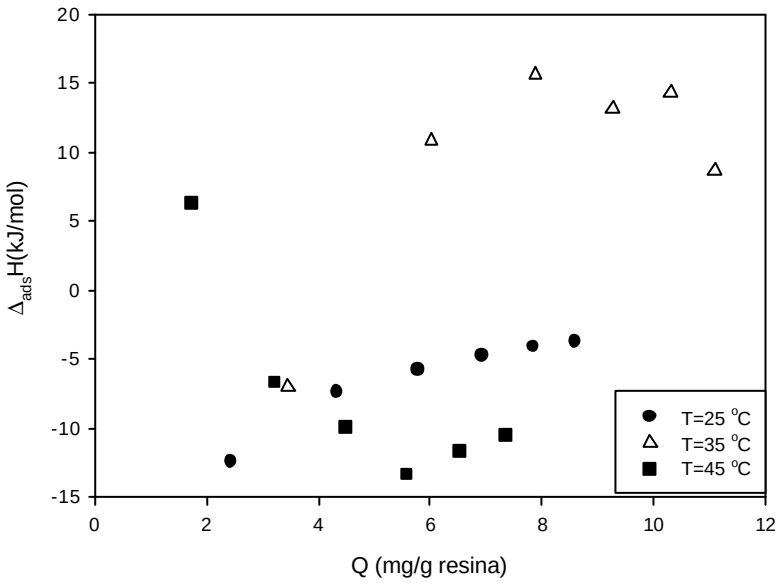


Figura 12. Variação da entalpia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes temperaturas e concentração de 0,05 Na_2SO_4,

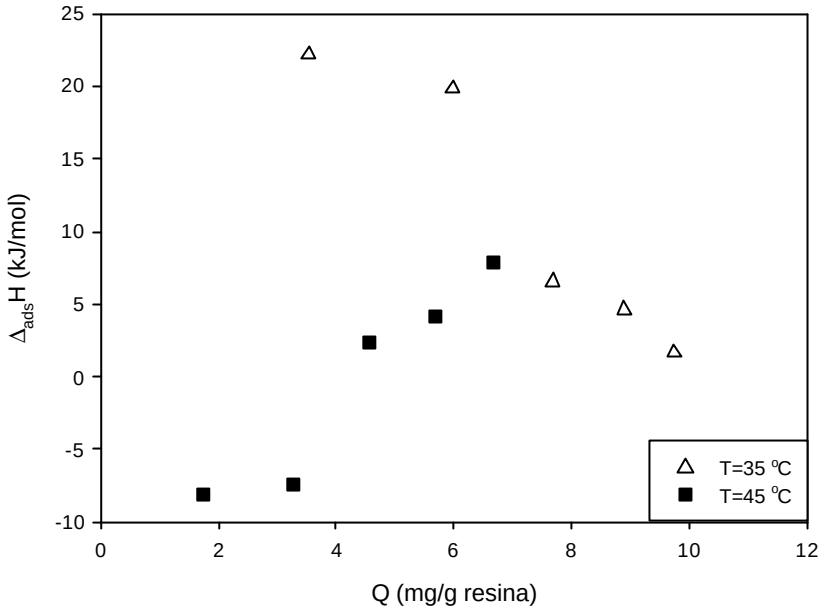


Figura 13. Variação da entalpia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes temperaturas e concentração de 0,6 Na_2SO_4,

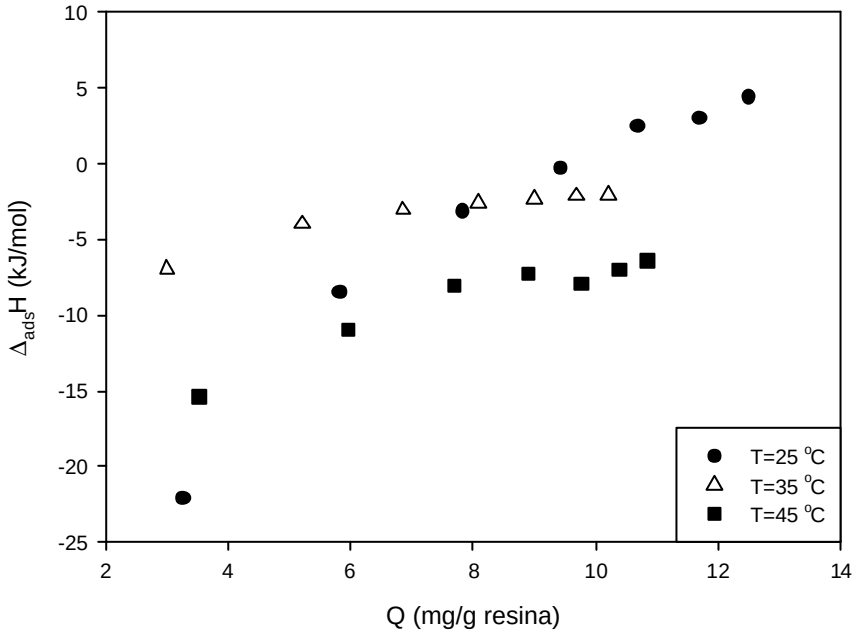


Figura 14. Variação da entalpia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes temperaturas e concentração de 0,8 Na_2SO4.

Nas Figuras 15-17 são apresentadas as variações da entropia de adsorção com a concentração de sal à temperatura constante. A 25°C, o aumento da concentração

do Na_2SO_4 causa um aumento na entropia de adsorção. Esta entropia de adsorção está associada ao aumento da entropia translacional das partículas (íons e moléculas de água) que solvatavam (dupla camada elétrica) a proteína e que, durante o processo de adsorção, foram liberadas; e a diminuição da entropia translacional das moléculas de proteína que quando adsorvidas reduzem o seu grau de liberdade translacional. Assim, como já discutido anteriormente, a concentrações de 0,05 mol L^{-1} de sulfato de sódio, a camada difusa é apenas parcialmente destruída, e ao redor da proteína ficam moléculas de água e íons interagindo mais fracamente. Por isto, quando ocorre a adsorção, o número de moléculas liberadas é pequeno, causando assim uma redução na entropia. Entretanto, quando a concentração de eletrólito é aumentada (0,8 mol L^{-1}), as moléculas de água aumentam sua interação com a proteína e, ao ocorrer a adsorção, um número maior de moléculas de H_2O é liberado o que aumenta a entropia. É importante destacar que este comportamento está coerente com a variação da entalpia de adsorção.

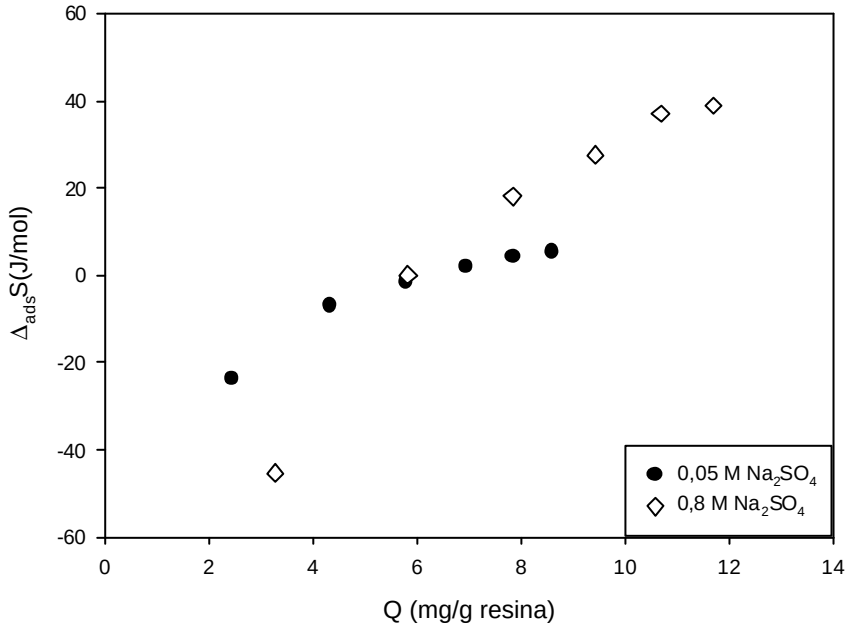


Figura 15. Variação da entropia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes concentrações de Na_2SO_4 e 25°C.

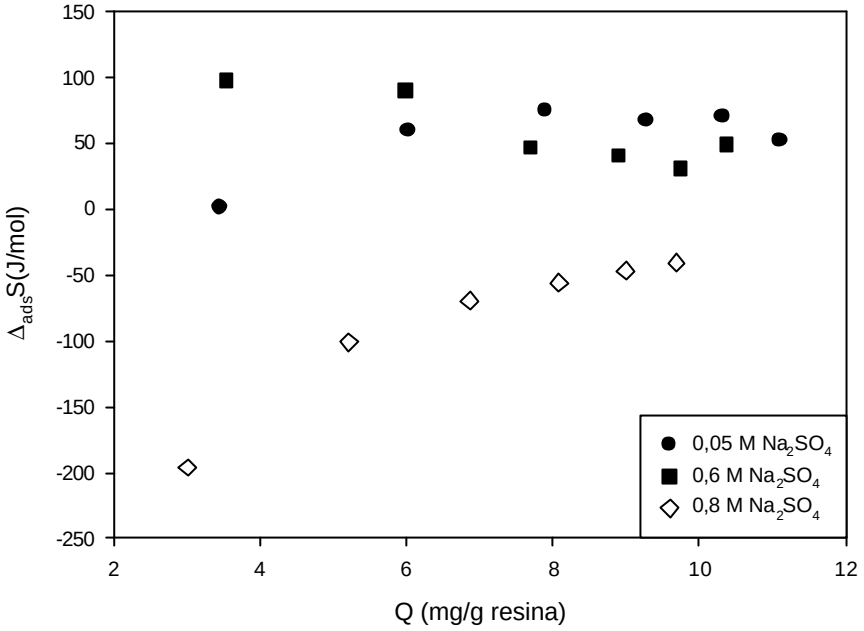


Figura 16. Variação da entropia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes concentrações de Na_2SO_4, e 35°C.

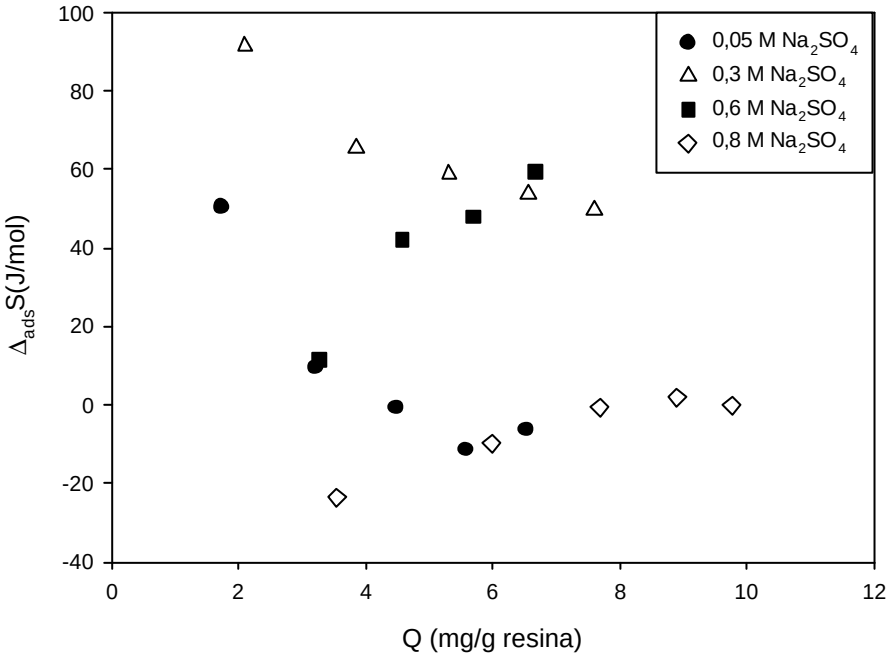


Figura 17. Variação da entropia de adsorção para o sistema GMP-Streamline Phenyl a diferentes concentrações de Na_2SO_4, e 45°C.

Para a temperatura de 35°C, o aumento da concentração do eletrólito de 0,05 mol L^{-1} para 0,6 mol L^{-1} causa o mesmo processo descrito acima para 25°C. Quando ocorre o aumento da concentração para 0,8 mol L^{-1}, a entropia de adsorção é diminuída. Isto pode ser entendido considerando que a esta temperatura, a quantidade de sal adicionada retira todas as partículas (H_2O e íons) que cercam a proteína, fazendo com que durante a adsorção poucas moléculas sejam liberadas e, conseqüentemente, a entropia é reduzida porque a contribuição da diminuição da liberdade translacional da proteína ancorada na superfície supera o pequeno ganho entrópico vindo da liberação das moléculas de solvatação.

Para a temperatura de 45°C, podemos afirmar que as concentrações de 0,05 e 0,3 mol L^{-1} fazem o mesmo efeito que 0,05 e 0,6 mol L^{-1} a 35° C, mas o aumento da concentração para 0,6 ou para 0,8 mol L^{-1}, nesta temperatura, acaba destruindo a camada interna da dupla camada elétrica diminuindo, assim, a contribuição do aumento entrópico advindo da liberação das moléculas de água adsorvidas na interface da proteína. Assim, com a adsorção da proteína, ocorre uma redução no grau de liberdade translacional deste biopolímero e, conseqüentemente, uma redução na entropia de adsorção.

A Tabela 1 lista os dados das variações de energia livre de Gibbs. Observa-se que esta energia diminui com o aumento da temperatura para todos os casos, mas o processo não é entropicamente dirigido para todas as condições estudadas. Veriifca-se que para algumas condições o processo é entalpicamente dirigido.

Tabela 1. Valores da energia livre de Gibbs de adsorção ($\Delta_{ads}G$ kJ/mol) para diferentes temperaturas.

Na_2SO_4	25°C	35°C	45°C
0,05	-5356,954	-7565,1502	-9649,7674
0,3	-7066,2840	-7701,6435	-9510,3158
0,6	-7946,4554	-7850,0000	-1173,6780
0,8	-8580,1663	-8890,5990	-7858,2345

5. CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou as características das ligações entre a proteína GMP e um absorvente hidrofóbico. Os resultados mostraram que os processos de adsorção do GMP na resina Streamline Phenyl são dependentes da concentração do sal e da variação da temperatura. Os valores de $\Delta_{ads}H$, $\Delta_{ads}S$ e $\Delta_{ads}G$ apresentados neste estudo mostram que o processo é espontâneo e entalpicamente dirigido.

6. NOMENCLATURA

Símbolo	Descrição
B	Constante de equilíbrio de adsorção
C	Concentração de proteína no equilíbrio
C_0	Concentração inicial de proteína
C_b	Concentração final de proteína
$\Delta_{ads}H$	Variação da entalpia de adsorção
$\Delta_{ads}S$	Variação da entropia de adsorção
$\Delta_{ads}G$	Variação da energia livre de Gibbs
k_d	Constante de dissociação
q	Quantidade de proteína adsorvida
q_m	Quantidade máxima de proteína adsorvida
Q_{ads}	Energia de adsorção
V	Volume de proteína na alimentação
v	Volume de resina no processo

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAKAWA, T. Thermodynamic analysis of the effect of concentrated salts on protein interaction with hydrophobic and polysaccharide columns. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V. 248 (1), p. 101-105, 1986.

BONOMO, R.C.; MINIM, L. A., COIMBRA, J. S. R.; FONTAN, R. C. I.; MENDES DA SILVA, L. H.; MINIM, V. P. R. Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: Effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis. **Journal of Chromatography B.** V. 844, p 6-14, 2006.

BOYSEN, R. I., WANG, Y., KEAH, H. H., HEARN, M. T. W. Observations on the origin of the non-linear van't Hoff behaviour of polypeptides in hydrophobic environments. **Biophysical Chemistry.** V. 77, p. 79-97, 1999.

CHEN, J.; LUO Q.; BRENEMAN C. M.; CRAMER S. M. Classification of protein adsorption and recovery at low salt conditions in hydrophobic interation chromatography systems. **Journal of Chromatography A.** No. 1139, 236-246, 2007.

CHEN, J.; SUN, Y. Modeling of the salt effects on hydrophobic adsorption equilibrium of protein. **Journal of Chromatography A.** V. 992, p. 29-40, 2003.

CHEN, W-Y., HUANG, H-M., LIN, C-C., LIN, F-Y., CHAN, Y-C. Effect of temperature on hydrophobic interaction between proteins and hydrophobic adsorbents: Studies by isothermal titration calorimetry and the van't Hoff equation. **Langmuir.** V. 19, p. 9395-9403, 2003.

DILL, K. A.. The mechanism of solute retention in reversed-phase liquid chromatography. **Journal Physical Chemistry**. V. 91, p. 1980-1988, 1987.

FERREIRA, R. C. **Separação de *a* -lactoalbumina e *b* -lactoglobulina de proteínas do soro de queijo por adsorção em colunas de leito fixo.** Viçosa, MG: UFV, 2001. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa.

GOHEEN, S. C.; ENGELHORN, S. C. Hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography of proteins. **Journal of Chromatography A**. V. 317, No. 28, p. 55-65, 1984.

HEINITZ, M. L.; KENNEDY, L.; KOPACIEWICZ, W.; REGNIER, F. E. Chromatography of proteins on hydrophobic interaction and ion-exchange chromatographic matrices: mobile phase contributions to selectivity. **Journal of Chromatography A**. V. 443, No. 29, p. 173-182, 1988.

HJERTÉN, S., ROSENGREN, J., PAHLMAN, S. Hydrophobic interaction chromatography. The synthesis and the use of same alkyl and aryl derivatives of agarose. **Journal of Chromatography**. V. 101, p. 281-288, 1974.

INGRAHAM, R. H.; LAU, S. Y. M.; TANEJA, A. K.; HODGES, R. Denaturation and the effects of temperature on hydrophobic-interaction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of proteins : Bio-gel tsk-phenyl-5-pw column. **Journal of Chromatography A**. V. 327, No. 26, p. 77-92, 1985.

JACOBSON, J., FRENZ, J., HORVÁTH, C. Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography. **Journal of Chromatography.** V. 316, p. 53-68, 1984.

LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. **Journal of American Chemical Society**. V.30, p.2263-2295, 1916.

MAHN, A.; ZAPATA-TORRES, G.; ASEJO, J. A. A theory of protein-resin interation in hydrophobic interation chromatography. **Journal of Cromatography A.** No. 1066, 81-88, 2005.

QUEIROZ J.A., TOMAZ C.T., CABRAL J.M.S. Hydrophoic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotecnology**, 87, 143-159, 2001.

TONG, X-D., XUE B., SUN Y. Modeling of expanded-bed protein adsorption by taking into account the axial particle size distribution. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 265-272, 2003.

ZHANG, S. P.; SUN, Y. Ionic strength dependence of protein adsorption to dye-ligand adsorbents. **Aiche Journal**. 48 (1), 178-186, 2002.

III. ADSORÇÃO DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA DA PROTEÍNA GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) EM TANQUES AGITADOS

RESUMO

Os dados de equilíbrio de adsorção hidrofóbica para a proteína GMP foram obtidos em um sistema batelada a três temperaturas, três velocidades de agitação e duas concentrações de sal (Na_2SO_4), usando-se a resina Streamline Phenyl como adsorvente. Pode-se observar que com o aumento da temperatura e o aumento da concentração de sal não houve diferença nos tempos em que se alcança o equilíbrio da adsorção. O modelo de Langmuir ajustou-se bem às isotermas de adsorção de GMP na resina Streamline Phenyl, e o modelo de transferência de massa aplicado se ajusta bem à cinética de adsorção de proteína sob as condições estudadas.

1. INTRODUÇÃO

O glicomacropepitídeo (GMP) é um dos peptídeos bioativos do soro de queijo, derivado da caseína e resultante da produção de queijos pela via da renina com concentração estimada de 1,2 a 1,5 g/L. Este valor corresponde a cerca de 15% a 25% do total das proteínas presentes no soro de queijo doce (DZIUBA; MINKIEWICZ, 1996).

Algumas atividades biológicas e fisiológicas potenciais relacionadas ao GMP contribuem para: a) reduzir desordens estomacais ao possibilitar a regulação de respostas imunológicas, bem como na prevenção da azia, por levar à diminuição da secreção gástrica [(EL-SALAM et al., 1996; IDOTA et al., 1994); b) minorar o risco de ataques cardíacos ao induzir a inibição da agregação de plaquetas (WHEYPROTEIN, 2005; EL-SALAN et al., 1996; DZIUBA; MINKIEWICZ, 1996); c*)* diminuir o apetite ao estimular a liberação de colecistoquina, um hormônio que promove a sensação de saciedade (YVON et al., 1994); d*)* inibir a adesão de

microrganismos em polímeros, sugerindo o uso do GMP como inibidor de placas bacterianas e de cáries dentárias (NEESER et al., 2000).

Devido às funções biológicas, grande atenção tem sido dada às técnicas de isolamento e purificação do GMP, sendo considerado um ingrediente potencial para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Como o GMP contendo resíduos de aminoácidos 106-169 não contém aminoácidos aromáticos, também pode ser utilizado em alimentos para o tratamento da fenilcetonúria, pois o GMP é uma das únicas proteínas naturais livres da fenilalanina (NAKANO; OZIMEK, 1998).

O GMP pode ser isolado por diferentes técnicas, como a de adsorção cromatográfica usando leito fixo ou expandido fazendo desta uma técnica atrativa para a separação molecular ou macromolecular, e a eliminação de contaminantes indesejáveis.

Para realizar o desenho de processos de separação por adsorção em sólidos porosos mediante uma técnica determinada, é necessário conhecer a etapa de transferência de massa que determina a velocidade do processo. Portanto, faz-se necessário determinar os parâmetros cinéticos relacionados com os processos de transporte de massa externa até às partículas adsorventes, e com os processos difusionais e de equilíbrio que ocorrem no interior dos poros. Os experimentos baseados em tanques agitados em batelada permitem o estudo e a determinação destes parâmetros de forma simples já que permitem eliminar o controle da transferência de massa externa.

Neste trabalho, objetivou-se a determinação da cinética de adsorção do GMP em resina de interação hidrofóbica, empregando-se tanques agitados, sob diferentes condições de temperatura, velocidades de agitação e concentração inicial de GMP, permitindo a determinação dos parâmetros que descrevem o processo.

2. ADSORÇÃO EM TANQUES AGITADOS

Um sistema de adsorção em batelada equipado com um dispositivo de agitação constitui um tanque agitado. O volume total do tanque é V (mL). Neste tanque, um volume de adsorvente v (mL) pode ser colocado em contato com um volume de solução protéica de concentração C_o ($mg.mL^{-1}$). A concentração de

proteína na fase líquida diminui com o tempo e, após um período de tempo, será estabelecido um equilíbrio entre a concentração de proteína na fase líquida (solução protéica) e na fase sólida (adsorvente). Para um intervalo de tempo Dt (min) medido a partir do tempo $t = 0$, a concentração de adsorvato (proteína) no adsorvente pode ser calculada através de um balanço de massa no tanque, o qual resulta:

$$q = \frac{V}{v}(C_0 - C_b) \qquad (1)$$

Em que C_b (mg.mL^{-1}) é a concentração de adsorvato em solução no final do intervalo de tempo considerado.

Arves e Liapis (1987) apresentaram um modelo geral para predizer o comportamento dinâmico da adsorção em tanques agitados. Este modelo leva em consideração a difusão dentro dos poros da partícula e a resistência à transferência de massa no filme líquido na superfície da partícula. Utilizaram um modelo similar para a adsorção de proteínas com resinas trocadoras de íons. As equações do modelo englobam um balanço de massa sobre a partícula e um balanço de massa na fase líquida externa à partícula. As seguintes considerações básicas foram utilizadas para a formulação do modelo (HORSTMANN; CHASE, 1989):

1. O processo de adsorção é considerado isotérmico.
2. Os adsorventes porosos são esféricos e uniformes em relação ao tamanho.
3. Existe equilíbrio local para cada componente entre a superfície do poro e o líquido estagnado dentro dos poros.
4. Os coeficientes de difusão e de transferência de massa são constantes e independentes dos efeitos das misturas dos componentes.

Com essas considerações, as seguintes equações podem ser formuladas a partir do balanço de massa para cada componente nas fases extrapartícula e intrapartícula, respectivamente.

Apresentamos as equações diferenciais parciais em forma adimensional dos balanços de massa, com os términos adimensionais seguintes:

$$c_{bi} = \frac{C_{bi}}{C_{0i}}; \qquad c_{pi} = \frac{C_{pi}}{C_{0i}}; \qquad r = \frac{R}{R_p}; \qquad t = \frac{tD_{pi}}{R_p^2}; \qquad B_i = \frac{k_i R_p}{e_p D_{pi}}$$

$$\frac{\partial c_{bi}}{\partial t} = -\frac{3V_p}{V_b} Bi\left(c_{bi} - c_{pi,r=1}\right) \tag{2}$$

$$\frac{\partial}{\partial t}\left[\left(1 - e_p\right)c_{pi}^s + e_p c_{pi}\right] - e_p\left[\frac{1}{r^2}\frac{\partial}{\partial r}\left(r^2 \frac{\partial c_{pi}}{\partial r}\right)\right] = 0 \tag{3}$$

Com as seguintes condições iniciais e de contorno adimensionalizadas:

$$t = 0 \Rightarrow c_{bi} = 1 \tag{4}$$

$$t = 0 \Rightarrow c_{pi} = 0 \tag{5}$$

$$r = 0 \Rightarrow \frac{\partial c_{pi}}{\partial r} \tag{6}$$

$$r = 1 \Rightarrow \frac{\partial c_{pi}}{\partial r} = Bi\left(c_{bi} - c_{pi,r=1}\right) \tag{7}$$

As Equações (2) e (7) são acopladas via $C_{pi,R=Rp}$ que é a concentração do componente i na fase sólida do adsorvente com base na unidade de volume do sólido, excluindo os poros. Ela está diretamente associada à isoterma de adsorção podendo ser representada pelo modelo de Langmuir (equação 8)

$$q = q_m \frac{bC}{1 + bC} \tag{8}$$

As concentrações C_{bi} e C_{pi} são baseadas na unidade de volume da fase móvel.

O coeficiente de transferência de massa para o sistema de adsorção em tanques agitados pode ser calculado pela seguinte equação:

$$k_f = \frac{2D_{AB}}{d_p} + 0{,}31\left(\frac{m}{\rho D_{AB}}\right)^{-2/3}\left(\frac{\Delta \rho m g}{\rho^2}\right)^{1/3} \tag{9}$$

O coeficiente de difusão da proteína livre na solução, D_{AB}, foi obtido usando-se a correlação de Polson, dada pela equação 10, em que D_{AB} (m^2/s) é uma função da massa molecular da proteína.

$$D_{AB} = 2{,}74x10^{-9}(M_r)^{-\frac{1}{3}} \tag{10}$$

O modelo de difusão do poro para adsorção em batelada dado pelas equações (2) e (3) com as condições iniciais e de contorno, equações (4-7), foi reduzido a um sistema de equações algébricas usando-se o método implícito de diferenças finitas com um passo à frente. Estas equações algébricas e diferenciais foram resolvidas simultaneamente pelo método de Gauss-Seidel (SARAIVA, 2003). O coeficiente de difusividade no poro D_p, foi estimado por ajuste dos dados experimentais para o modelo de difusão do poro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

O GMP foi adquirido da Davisco Foods International, Inc. (Minnesota, EUA). O GMP tem uma massa molecular de 7000 Da e ponto isoelétrico (pI) de 4.3. O solvente foi Streamline Phenyl adquirido de Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia), cuja densidade média de partícula é 1,2 g/mL Possui tamanho médio de partícula de 200 mm, porosidade de 0,60, forma esférica e matriz com núcleo de quartzo cristalino. O fosfato de sódio (monobásico e dibasico) e sulfato de sódio foram de grau analítico.

Os dados cinéticos de adsorção foram determinados empregando-se um tanque de vidro encamisado (para o controle de temperatura) com capacidade para 300 mL, composto por chicanas para evitar a formação de vórtex e aumentar a turbulência das linhas de corrente de fluido. Utilizou-se um sistema de agitação constituído por um controlador de agitação (Servodyne Eletronic Mixer, Modelo KH-50003-30, Cole-Parmer) e impelido de agitação tipo turbina de quatro pás.

3.2. PROCEDIMENTO

3.2.1 Determinação dos dados de equilíbrio

Os dados de equilíbrio de adsorção do GMP foram determinados seguindo a metodologia para a adsorção descrita na literatura (TONG et al., 2003). Assim, para equilibrar a resina Streamline Phenyl em um tubo de ensaio com 0,1 g do adsorvente, foram adicionados 1,8 mL de tampão fosfato (20 mM e pH 7,0) contendo Na_2SO_4 em concentrações pré-definidas (0,05; 0,3; 0.6; e 0,8 M). Após 12 h, a solução tampão foi separada da resina e, à mesma, foram adicionados 1,8 mL da solução protéica nas concentrações conhecidas. A faixa de concentração da proteína na solução variou de 0 a 80 mg/mL. A mistura foi agitada por 12 h (TONG et al., 2003) e mantida a 10^{o}C, 25^{o}C, 35^{o}C e 45^{o}C em uma estufa (DBO Mod.101M\3Eletrolab, Brasil). Em seguida, as soluções foram centrifugadas e a concentração de proteína do sobrenadante foi determinada usando-se espectrofotometria (espectrofotômetro Cary 50 Probe Varian, Austrália) a 240 nm. A quantidade de proteína adsorvida na resina foi calculada por um balanço de massa.

3.2.2 Determinação dos dados da cinética de adsorção

Mediu-se uma massa de 14,44 g (precisão ±10 mg) de resina semi-úmida. Adicionou-se 300 mL de solução tampão fosfato (20 mM e pH 7,0) contendo o GMP e Na_2SO_4 nas concentrações pré-determinadas. Quando a temperatura desejada foi atingida, a resina foi adicionada ao sistema, iniciando-se a cronometragem do processo.

Inicialmente, em intervalos de aproximadamente 2 min, coletou-se 5 mL da solução sob agitação, usando uma seringa. Realizou-se a filtração da amostra (diâmetro de poro 5,0 µm; Millex-SV, Syringe Driven Filter Unit, Millipore, Irlanda) para retenção da resina. Injetou-se a solução na cubeta do espectrofotômetro e determinou-se a concentração de GMP por análise espectrofotométrica (Cary 50 Probe, Varian, EUA) no comprimento de onda de 240 nm. Foi utilizada uma curva analítica para correlacionar a absorbância neste comprimento de onda com a concentração de proteína. Por fim, retornou-se com a solução e a resina retiradas anteriormente para o tanque agitado.

Após 10 min de processo, recolheram-se as alíquotas para a determinação da concentração de GMP em intervalos de tempos maiores (5 min) e, no decorrer do experimento, estes intervalos foram aumentados uma vez que a variação da concentração de GMP tornou-se menor. Cada um destes experimentos foi conduzido por 2 h.

3.2.3 Determinação da viscosidade (m)

A viscosidade da fase móvel foi determinada em um viscosímetro de tubo capilar Cannon-Fenske (Schott-Geräte, Hofheim, Alemanha), para as temperaturas de análises, de acordo com a norma internacional ISSO/DIS 3105 (Modelos dos viscosímetros: 513 01/75; 513 10/100; 513 20/200).

Antes de cada análise, o viscosímetro foi equilibrado por 30 min na fase móvel nas temperaturas de análises (288,15 K; 303,15 K; 318,15 K), em um banho criostático, com uma precisão na temperatura de ± 0,01 K. Em seguida, a viscosidade foi medida segundo as normas referidas.

A massa específica da fase fluida foi determinada utilizando-se o método de picnômetro, empregando-se um picnômetro de 25 mL (Pirex, Brasil).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos de adsorção foram conduzidos com quatro concentrações de sulfato de sódio às seguintes temperaturas: 283,15K; 298,15K; 308,15K e 318,15K. As representações gráficas de Q (mg de proteína adsorvida/g de resina), versus C_p (concentração de proteína na fase líquida, mg proteína/mL) são mostradas nas Figuras 1-4.

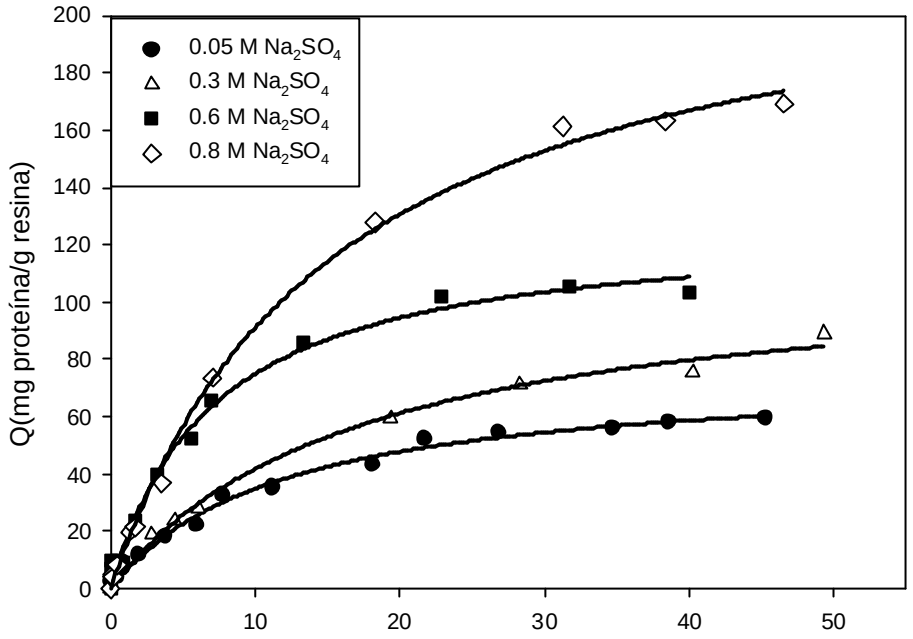


Figura 1. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4, e temperatura de 10°C**.**

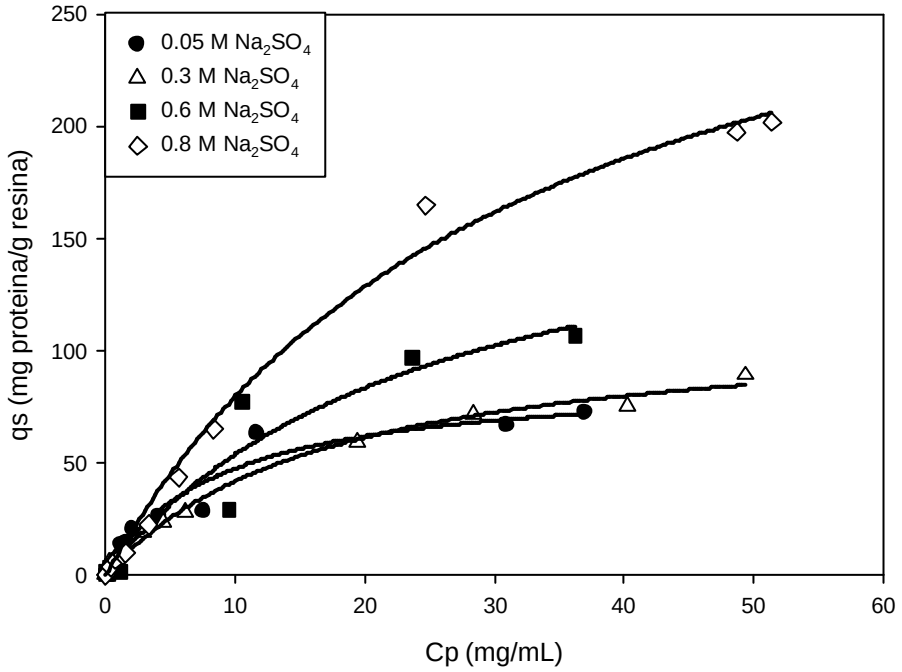


Figura 2. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4, e temperatura de 25°C**.**

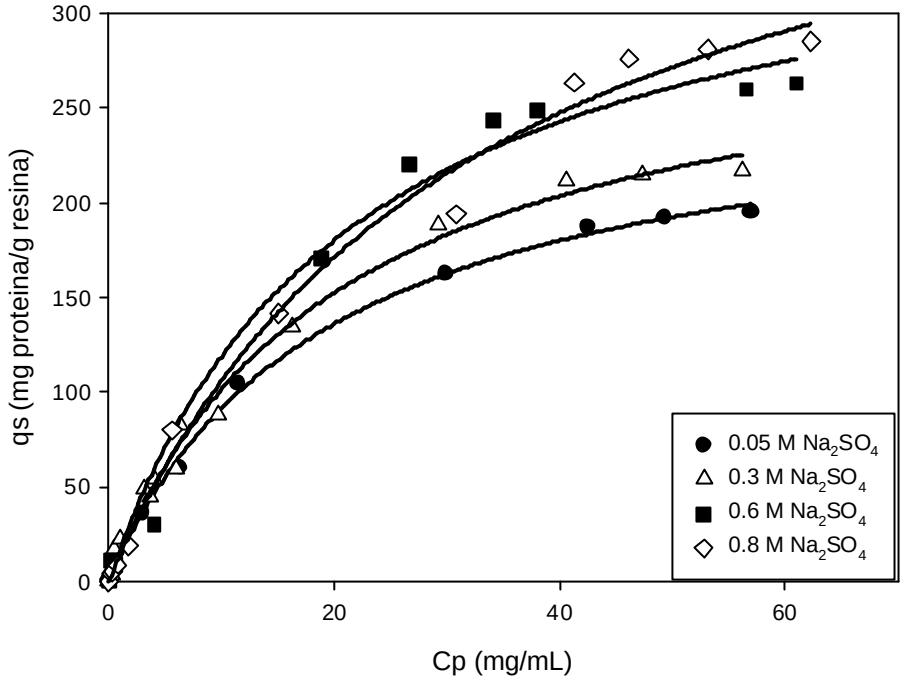


Figura 3. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4, e temperatura de 35°C**.**

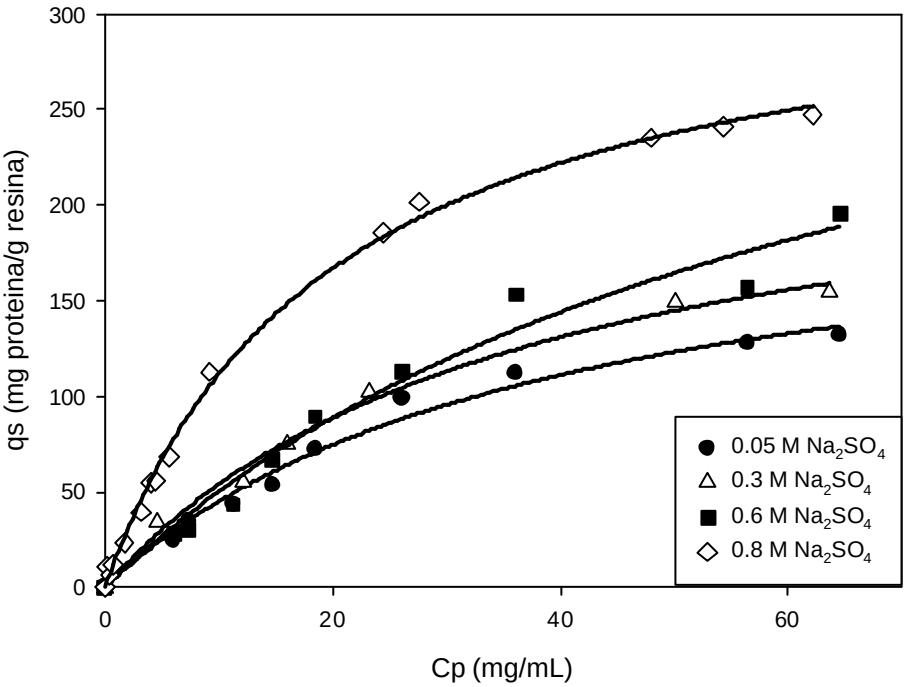


Figura 4. Isotermas de GMP a diferentes concentrações de Na_2SO_4, e temperatura de 45°C.

A adsorção de GMP na resina aumenta com o incremento da concentração de sulfato de sódio. Estes resultados são consistentes com os encontrados, por Chen et al

(2003) e Arakawa (1986), na interação de proteína em colunas hidrofóbicas de octil-sepharose e polissacarídeo, respectivamente, em solução com sulfato de amônio, e com os de Ferreira (2005), na interação de proteína com resina hidrofóbica Streamline Phenyl em coluna empacotada de leito fixo, em solução de fosfato de sódio.

Algumas considerações podem ser feitas visando explicar as fortes interações hidrofóbicas em altas concentrações de sal nos sistemas de interação hidrofóbica. De acordo com Lin et al. (2001), a água ligada às proteínas impede que as mesmas possam adsorver na superfície do ligante do adsorvente hidrofóbico. Porém, na presença de sal, a proteína pode ser desidratada devido à influência das moléculas de sal em sua vizinhança. Assim, as zonas hidrofóbicas da proteína podem ser gradualmente expostas com o incremento da concentração de sal, fortalecendo a interação hidrofóbica entre a proteína e a superfície adsorvente.

Na Tabela 1, apresentam-se os parâmetros obtidos, coeficiente de dissociação (kd) e capacidade máxima de adsorção (q_m), de acordo com o modelo de isoterma de Langmuir. As equações 11 (R^2=0,90) e 12 (R^2=0,80) que correlacionam temperatura e concentração de Na_2SO_4 com os parâmetros q_m e kd respectivamente, foram ajustados com base nos dados experimentais obtidos, empregando-se o procedimento REG do pacote estatístico SAS.

$$\boldsymbol{q_m = -27950{,}6 + 182{,}5T + 260{,}4C_s - 0{,}2954T^2 - 55{,}7991C_s^2 + 0{,}0679TC_s} \quad (11)$$

$$\boldsymbol{k_d = 3055{,}0 - 21{,}0450T + 46{,}5610C_s + 0{,}0363T^2 - 44{,}6505C_s^2 - 0{,}0190TC_s} \quad (12)$$

Em que T é a temperatura em kelvin e C_s é a concentração molar de Na_2SO_4.

Tabela 1. Valores do coeficiente de dissociação (k*d*) e capacidade máxima de adsorção (*qm*).

T	C	Q
288,15	0,05	75,92
	0,30	114,28
	0,60	127,85
	0,80	230,85
298,15	0,05	88,71
	0,30	114,27
	0,60	186,44
	0,80	333,56
308,15	0,05	266,46
	0,30	306,68
	0,60	373,13
	0,80	446,78
318,15	0,05	218,08
	0,30	250,44
	0,60	381,46

4.1. CINÉTICA DE ADSORÇÃO

A Figura 5 mostra os dados obtidos nos testes de velocidade de agitação, e como a velocidade influencia na adsorção da proteína GMP na resina Streanline Phenyl. Houve uma diferença marcante entre a taxa de adsorção do GMP para as velocidades de rotação de 400 rpm, 600 rpm, 800 rpm e 1000 rpm.

Na velocidade de 400 rpm, a adsorção foi um pouco mais lenta do que as outras velocidades testadas, mas a velocidade de 1000 rpm teve a formação de espuma e desnaturação da proteína, o que acarreta mudanças nas características da fase fluida podendo dificultar a transferência de massa; assim, a velocidade de 800 rpm foi selecionada para os experimentos de cinética de adsorção em tanques agitados.

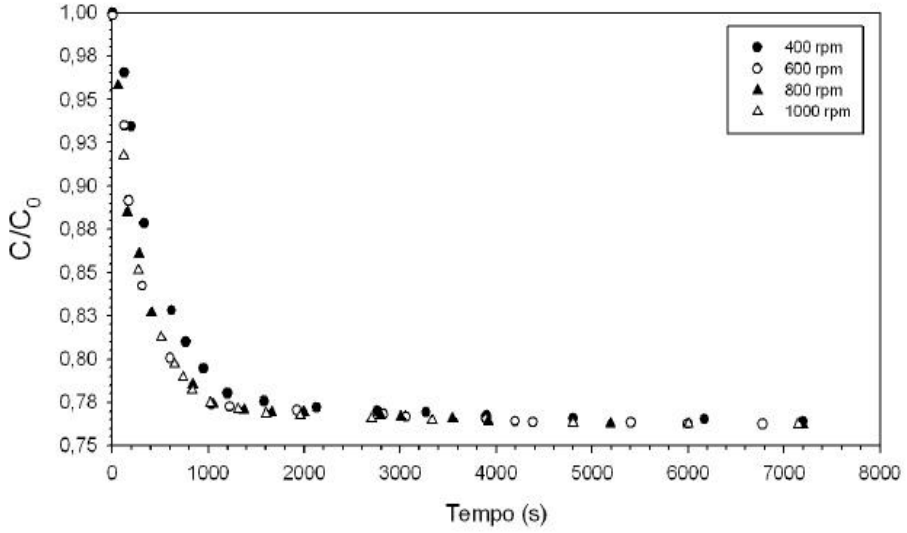


Figura 5. Dados experimentais obtidos da adsorção nos testes de velocidade. C/C_0 é a relação entre a concentração de GMP na fase fluida no tempo (s) e a concentração inicial de GMP na mesma fase C_0.

As curvas obtidas por simulação confirmam que o modelo de difusão do poro ajusta-se corretamente aos dados experimentais. Os dados cinéticos da adsorção hidrofóbica de GMP, às condições de 318,15 K, 2 mg/mL, 800 mM de Na_2SO_4 e 318,15 K, 1 mg/mL, 800 mM de Na_2SO_4 são mostrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

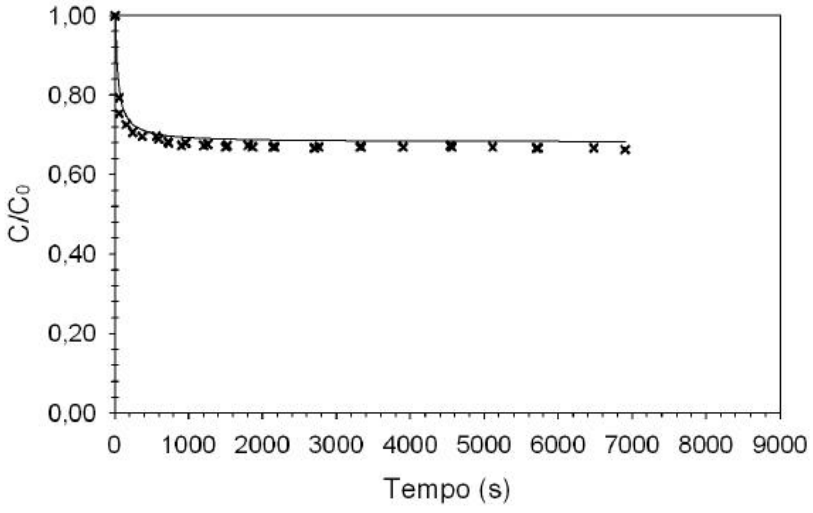


Figura 6. Exemplo de modelo ajustado. Condições: 318,15 K, 2 mg/mL de GMP e 800 mM de Na_2SO_4. Dados experimentais (x); Modelo ajustado (-).

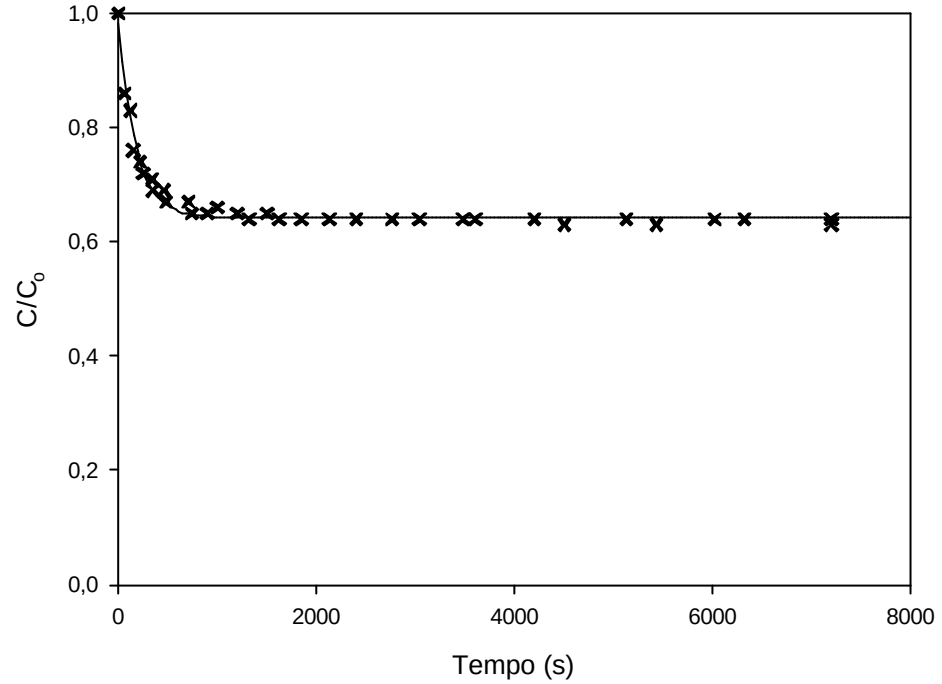


Figura 7. Exemplo de modelo ajustado. Condições: 318,15 K, 1 mg/mL de GMP e 800 mM de Na_2SO_4. Dados experimentais (x); Modelo ajustado (-).

A Figura 8 apresenta os resultados obtidos para a cinética de adsorção nas diferentes condições estudadas. Nota-se que a elevação da concentração de sulfato de sódio ocasiona um aumento da quantidade de proteína adsorvida, estando assim de acordo com os dados de Bonomo et al. (2006).

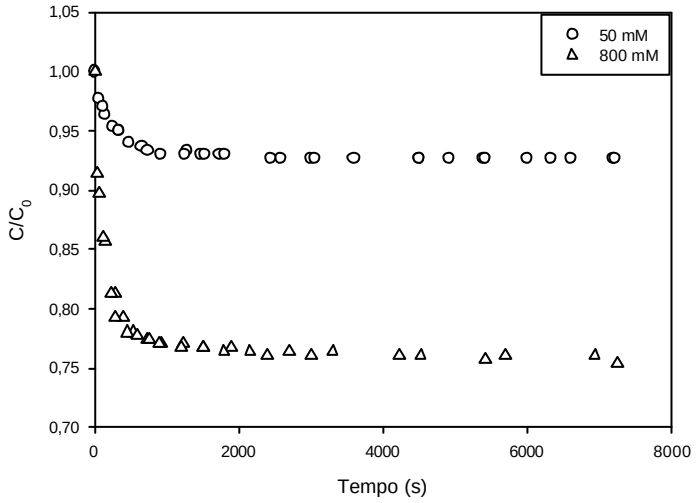


Figura 8. Dados experimentais obtidos da cinética de adsorção do GMP. Concentração de proteína 3 mg/mL, temperatura de 288,1 K e concentração de Na_2SO_4 de 50 e 800 mM

Na Figura 9 (A e B) pode ser observado que o aumento da temperatura não tem influência na cinética de adsorção, já que o tempo no qual se alcança o equilíbrio cinético é o mesmo. Pode-se falar que a velocidade de transferência de matéria é maior a temperaturas maiores, no entanto, pode-se observar que com o aumento da temperatura há um aumento na adsorção do GMP na resina Streamline Phenyl. Este fator pode ser atribuído à viscosidade da solução que diminui com o aumento da temperatura.

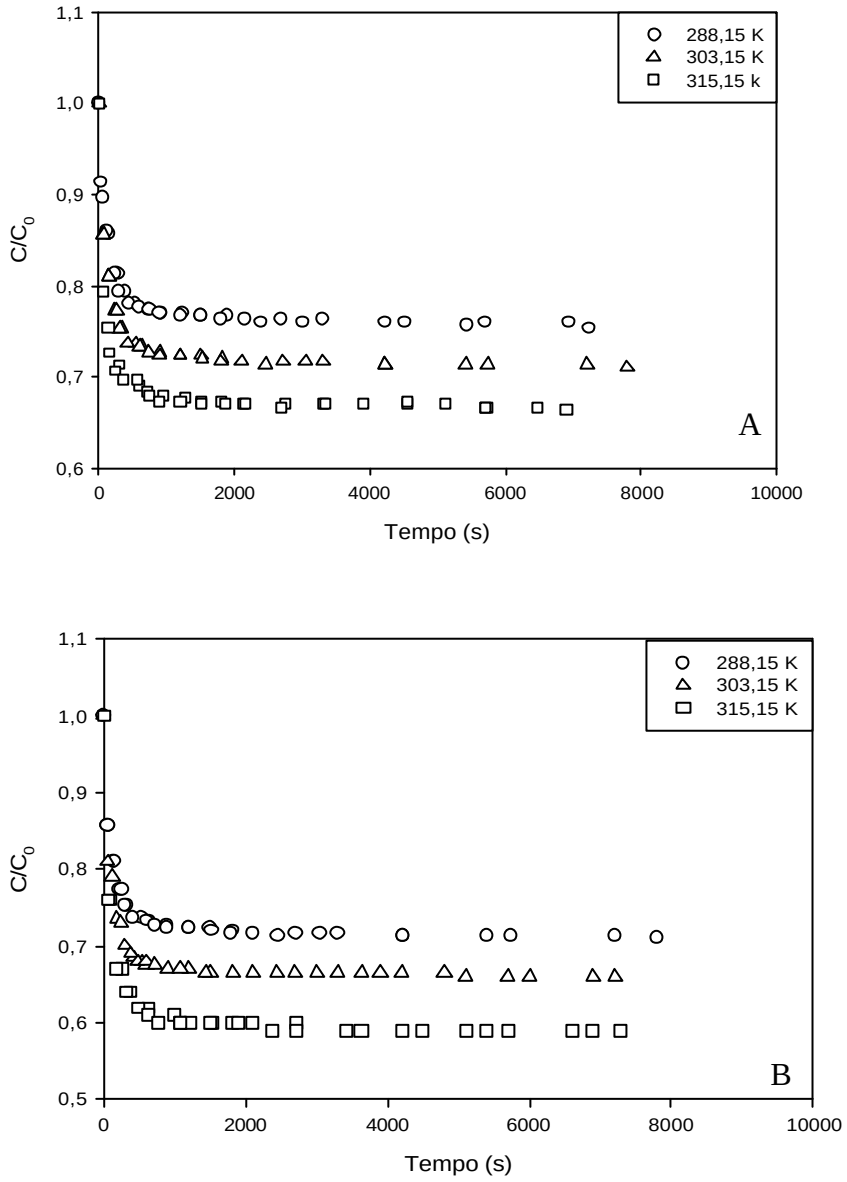


Figura 9. Dados experimentais obtidos da cinética de adsorção do GMP em diferentes temperaturas e concentração de GMP de 3 mg/mL. A) Concentração de Na_2SO_4 de 800 mM. B) Concentração de Na_2SO_4 de 50 mM.

Na Figura 10 (A e B) pode ser observado que o aumento da concentração inicial não influencia na cinética de adsorção, já que o tempo no qual se alcança o equilíbrio cinético é o mesmo. Pode-se dizer que a velocidade de transferência de massa é maior em menores concentrações iniciais. Observa-se também o aumento da concentração inicial acarreta um decréscimo na adsorção do GMP na resina Streamline Phenyl.

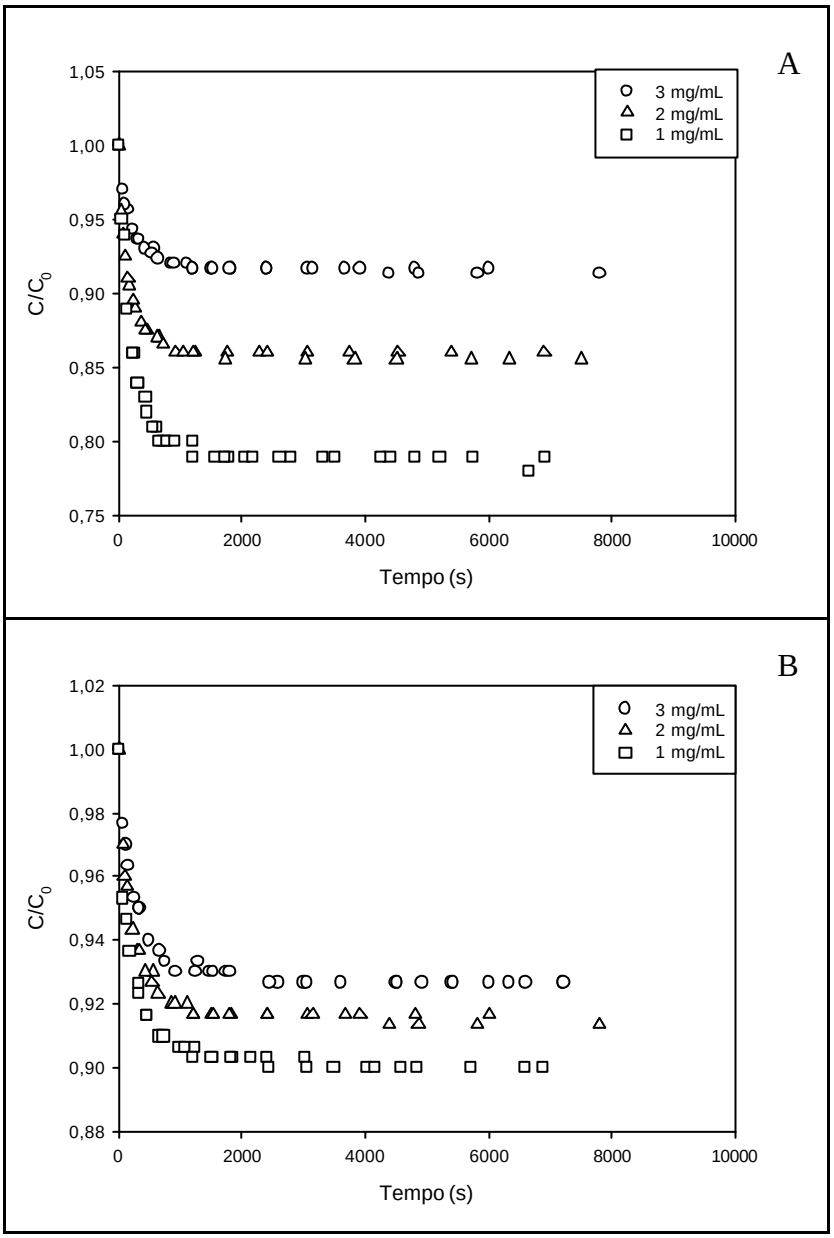


Figura 10. Dados experimentais obtidos da cinética de adsorção do GMP em diferentes concentrações de proteína a 303,1 K e concentração de Na_2SO_4. A) 800 mM; B) 50 mM.

Este fator pode ser atribuído ao aumento da viscosidade da solução, já que altas viscosidades podem levar à aglomeração das moléculas de proteína nos poros das partículas do adsorvente, apresentando dificuldade na difusão da proteína na resina. Chang e Chase (1996a), Tong et al. (2003), GARCIA et al. (2006) descrevem um comportamento similar da cinética de adsorção para lysozyme na resina Streamline DEAE, BSA na resina Streamline SP e albumina, conalbumina e lysozyme em resina Streamline Phenyl, respectivamente.

Os valores dos parâmetros D_p e k_f usados no modelo de transferência de massa são mostrados na Tabela 2. Os valores de D_p e k_f para o estudo da proteína GMP variam de $1{,}45 \times 10^{-11}$ a $1{,}96 \times 10^{-11}$ m^2/s e $4{,}85 \times 10^{-6}$ a $19{,}9 \times 10^{-6}$ m/s, respectivamente. Resultados similares nesta mesma faixa foram reportados na literatura para partículas macroporosas por (WRIGHT e GLASSE, 2001; WRIGHT et al., 1998; SPIEKER e KLOPPENBURG, 1998). De acordo com GUIOCHON et al., (1994) e GARCIA et al., (2006), a espessura do filme e o coeficiente de transferência de massa são determinados pelas condições hidrodinâmicas e dependem do fluxo de líquido ao redor das partículas.

O número de Biot (Bi) é usado em uma resina macroporosa para avaliar o significado da transferência de massa da película contra a resistência de transferência de massa intrapartícula [20]. O numero de Biot foi calculado pela equação 3 e os resultados são fornecidos na Tabela 2.

$$Bi = \frac{k_f R_p}{D_p} \tag{3}$$

Os valores de Bi para a adsorção de GMP foram superiores a 45 na maioria dos casos estudados, o que indica que a curva do *uptake* esteve dominada pela resistência de transferência de massa intrapartícula embora as resistências mássicas de transferência do filme não pudessem ser completamente desprezadas na simulação. Para os casos nos quais foram inferiores a 45, a transferência de massa foi dominada pelo filme, possivelmente, devido ao aumento da viscosidade com o aumento da concentração de sal (WRIGTH et al.; 1999; ZHANG; SUN, 2002; GARCIA et al., 2006).

Tabela 2. Parâmetros de transferência de massa.

Na_2SO_4 (mM)	C_0 (mg/mL)	T (K)	D_p ($10^{-11}m^2/s$)	k_f (10^{-6} m/s)	Bi
50	1,00	288,1	1,70	7,92	46,60
		303,1	1,83	8,12	44,40
		318,1	1,96	9,32	47,50
	2,00	288,1	1,69	5,20	30,80
		303,1	1,81	6,84	37,80
		318,1	1,93	7,78	40,30
	3,00	288,1	1,68	4,85	28,90
		303,1	1,81	5,54	30,61
		318,1	1,93	8,07	41,80
800	1,00	288,1	1,46	12,3	84,20
		303,1	1,56	16,5	105,80
		318,1	1,66	19,9	119,90
	2,00	288,1	1,46	9,23	63,20
		303,1	1,56	11,9	76,30
		318,1	1,66	13,1	78,90
	3,00	288,1	1,45	7,45	51,40
		303,1	1,55	9,48	61,20
		318,1	1,65	12	72,70

5. CONCLUSÕES

Os dados de equilíbrio cinético do GMP em adsorção em batelada para diferentes condições de temperatura e concentração de sal não apresentaram variações nos tempos em que o equilíbrio foi alcançado. No entanto, a adsorção de GMP foi afetada pela elevação da concentração de sal no sistema observando-se que o incremento da concentração de sal aumentou a adsorção da proteína. O modelo de Langmuir ajustou-se bem às isotermas de adsorção de GMP na resina Streamline Phenyl. O modelo de transferência de massa aplicado ajustou-se bem à cinética de adsorção da proteína sob as condições usadas.

6. NOMENCLATURA

Símbolo	Descrição
Bi_i	Número de Biot de transferência de massa para o componente i
C_{bi}	Concentração do componente i na fase extrapartícula
C_{0i}	Concentração inicial da fase líquida
C_{pi}	Concentração do componente i na fase líquida intrapartícula
C_{pi}^{s}	Concentração do componente i na fase sólida da partícula
c_{bi}	Concentração adimensional do componente i na fase líquida
c_{pi}	Concentração adimensional do componente i na fase líquida intrapartícula
c_{pi}^{s}	Concentração adimensional do componente i na fase sólida da partícula
D_{AB}	Coeficiente difusão livre no fluido
D_{pi}	Coeficiente de difusão do componente i
d	Diâmetro da partícula
g	Aceleração da gravidade
k_d	Constante na isoterma de Langmuir
k_f	Coeficiente de transferência de massa para o componente i
M_r	Massa molecular da proteína
n	Número de nós em r
q	Quantidade de proteína adsorvida
q_m	Constante da isoterma de Langmuir (adsorção de proteína máxima)
R	Coordenada radial para a partícula
R_p	Raio da partícula
r	Coordenada radial adimensional para a

	partícula
t	Tempo
V_b	Volume de líquido no tanque
V_p	Volume de adsorvente no tanque
Δr	Incremento na direção radial
C_0	Concentração inicial de proteína
C_b	Concentração final de proteína
V	Volume de proteína na alimentação (isoterma)
v	Volume de resina no processo (isoterma)

Símbolos Gregos

e_p	Porosidade da partícula
t	Tempo adimensional
Δt	Incremento de tempo adimensional
r_s	Densidade do sólido
r	Densidade do líquido
m	Viscosidade do líquido

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAKAWA, T. Thermodynamic analysis of the effect of concentrated salts on protein interaction with hydrophobic and polysaccharide columns. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v. 248 (1), p. 101-105, 1986.

ARVES, B. H., LIAPIS, A. I. The modeling and analysis of the elution stage of biospecific adsorption in fixed beds. **Biotecnology and bioengineering,** New York. Vol. 30, 638-649, 1987.

BONOMO, R. C. F., MINIM, L. A. M., COIMBRA, J. S. R. Hydrophobic interation adsorption of whey proteins: effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis. **Journal of Chromatography B.** 844, 6-14, 2006.

CHANG, Y. K. CHASE, H. A., Development of operating conditions for protein using expanded bed techniques: The effect oh the degree of bed expantion on adsorption performance. **Biotechnology and Bioengineering,** vol. 49, 512-526, 1996 (a).

CHEN, W., TONG X., DONG X., SUN Y., Expanded bed adsorption of protein with DEAE Spherodex M. **Biotechnol.** Prog. 2003, vol. 19, 880-886, 2003.

DZIUBA, J.; MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow´s k-casein. **Int. Dairy J.**, 6, 1017-1044, 1996.

EL-SALAM, A.M. H.; EL-SHIBINY, S.; BUCHHEIM, W. Characteristics and potential uses of the casein macrompeptide. **Int. Dairy J**.. Vol. 6:327-341. 1996.

FERREIRA, G. M. **Separação de *a* -lactoalbumina e *b* -lactoglobulina de proteínas do soro de queijo por adsorção em colunas de leito fixo.** Viçosa, MG: UFV, 2001. 81 f. Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FERREIRA, G. M. **Termodinâmica, modelagem e simulação do processo de adsorção e desorção de BSA e *b* -lactoglobulina em cromatografia de interação hidrofóbica.** Viçosa, MG: UFV, 2005. 117 f Tese Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GARCIA, R. E. E.; DOS REIS COIMBRA, J. S.; MINIM, L. M.; SARAIVA, S. H.; SADRÉ DA SILVA, C. A. Hydrophobic interation adsorption of hen egg white proteins albumin, conalbumin, and lisozyme. **Journal of Chromatography B**. 840, 85-93, 2006

GUIOCHON, G.; SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. **Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography**. Academic Press, New York, 700p., 1994.

HORTMANN, B. J., CHASE, H. A. Modelalling the affinity adsorption of immunoglobulin g to protein a immobilized to agarose matrices. **Chemical engineering research and design,** Warwickshire. Vol. 67, n.3, 243-254, 1989.

IDOTA, T.; KAWAKAMI, H.; NAKAJIMA, I. Bifidobacterium growth promoting activity effect on N-acetylneuraminic acid containing substances. **Biosci. Biotech. Biochem.** Vol. 58, 1720-1722, 1994.

LIN, F-Y., CHEN, C-S., CHEN, W-Y., YAMAMOTO, S. Microcalorimetric studies the interaction mechanisms between proteins and Q-Sepharose at pH near the isoelectric point (pI). Effects of NaCl concentration, pH value, and temperature. **Journal of Chromatography A**. 912, 281-289, 2001.

NAKANO, T.; OZIMEK, L. Gel chromatography of glycomacropeptide (GMP) from sweet whey on Ssphacryl S-200 at different pH's and on Sephadex G-75 in 6M guanidine hydrochloride. **Milchwissenschaft.** Vol. 53, n. 11, 629-632, 1998.

NEESER, JR. Milk protein hydrolysate for addressing a bone or dental disorder. **Int. Pat., n WO** 00/49885, 2000.

SARAIVA, S. H. **Modelagem e simulação de processos de cromatografia preparativa.** Viçosa, MG: UFV, 2003. 81 f. Teses: Doctorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SPIEKER, A. e KLOPPENBURG, C. GUILLES, E.-D. **Bioseparation and Bioprocessing**. Wiley-VCH Inc.: Subramanian, 1998, 329 p.

TONG,X-D, XUE, B, SUN Y. modeling of expanded-bed protein adsorption by taking into account the axial particle size distribution. **Biochemical Engineering Journal.** 16, 265-272, 2003.

WHEYPROTEIN. Disponível em: www.wheyprotein.com. Acesso em: dezembro, 2005.

WRIGHT, P. R., GLASSE, B. J. Modeling mass tnansfer and hydrodynamics in fluidized-bed adsorption of proteins. **AIChe J.** 47, 474-488, 2001.

WRIGHT, P. R.; MUZZIO, F.J.; GLASSER, B. J.; Effect of resin characteristics on fluidized bed adsorption of proteins. **Biotechnology Progress.** 15, 932-940, 1999.

YVON, M.; BEUCHER, S.; GUILLOTEAU, P.; LE HUEROU- LURON I; CORRING, T. Effects of caseinomacropeptide (CMP) on digestion regulation. **Reprod Nutr Dev**. Vol. 34, nº 6:527-37, 1994.

ZHANG, S. P.; SUN, Y. Ionic strength dependence of protein adsorption to dye-ligand adsorbents. **Aiche Journal**. 48 (1), 178-186, 2002.

IV. ADSORÇÃO DE GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) EM LEITO EXPANDIDO POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA

RESUMO

Neste artigo analisou-se a aplicação da técnica de cromatografia de leito expandido, em cromatografia preparativa, para obtenção das condições de processo mais adequadas à separação da proteína GMP do soro de queijo. Foram testadas três velocidades lineares e três concentrações iniciais de GMP. Para os dados da curva de ruptura em adsorção hidrofóbica de GMP usou-se a resina Streamline Phenyl como adsorvente. A influência da concentração inicial de proteína e a velocidade linear do processo foram avaliadas. O aumento da velocidade linear em associação com a elevação da concentração inicial de proteína diminuiu a eficiência da coluna. O comportamento hidrodinâmico no interior da coluna foi aproximado ao de um fluxo pistonado. O leito apresentou uma boa estabilidade e os resultados foram comparados em termos de R^2.

1. INTRODUÇÃO

A adsorção em leito expandido é uma técnica baseada na fluidização. Embora utilizada inicialmente na década de 70 como ferramenta para a recuperação de proteínas, os leitos fluidizados não despertaram na época muito interesse, principalmente, pelas dificuldades técnicas existentes como, por exemplo, a limitação das propriedades físicas das matrizes adsorventes (DASARI et al., 1993). É notável, porém, o crescente interesse recente dos pesquisadores CHASE (1994), CHASE e DRAEGER (1992), CHANG et al. (1993), DASARI et al. (1993), DE LUCA et al. (1994), McCREATH et al. (1995), FREJ et al. (1994), BATT et al. (1995), CHANG e CHASE (1996a), FREJ et al. (1999), LEVISON et al. (2000),

SANTOS et al. (2000), CONRADO (2003) e TONG et al. (2003) pela técnica de adsorção em leito expandido para recuperar e purificar proteínas de soluções contendo ou não material particulado.

A técnica de adsorção em leito expandido (ALE) está sendo usada em processos com alimentação contendo células (material particulado) rompidas ou não. Desde que o leito opere na forma expandida, não existe um bloqueio da coluna pelo material particulado em suspensão, e esses passarão preferencialmente pelos espaços vazios de leito.

O conhecimento do comportamento do leito em função das propriedades físicas das partículas e do fluido é de fundamental importância para as operações usando leito expandido. Essa caracterização ocorre, principalmente, medindo-se a expansão do leito em função da velocidade do fluido, ou observando-se a influência de outros fatores, como a distribuição do tamanho das partículas e a viscosidade do fluido. CHASE e DRAEGER (1992) mencionam que o sucesso da purificação de proteínas usando a adsorção em leito expandido depende, principalmente, da habilidade do sistema em produzir um leito com expansão estável. Essa condição é fundamental para que se possa realizar um aumento de escala, partindo-se de resultados obtidos em escala de laboratório.

A cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) é uma técnica muito utilizada para a separação de proteínas, baseada na interação reversível entre as zonas hidrofóbicas da superfície da proteína e o ligante hidrofóbico de uma resina cromatográfica (MAHN et al., 2005). A CIH alcança separações rápidas, com pequenas degradações do produto, baixas exigências de solventes e níveis de purificação muito bons (QUIERIOZ et al., 2001). O mecanismo de interação hidrofóbica entre solutos pode ser estudado por causa da importância na precipitação das proteínas por *"salting-out"* (CHEN; SUN, 2003). A CIH é fortemente influenciada pela temperatura, tipo e concentração de sal.

A proteína aqui estudada é o glicomacropeptídeo (GMP) que é um dos peptídeos bioativos do soro de queijo, derivado da caseína e resultante da produção de queijos pela via da renina com concentração estimada entre 1,2 a 1,5 g/L. Este valor corresponde a cerca de 15% a 25% do total das proteínas presentes no soro de queijo doce (DZIUBA; MINKIEWICZ, 1996).

No presente trabalho, foram estudadas a hidrodinâmica para determinar a estabilidade do processo de adsorção em leito expandido, e também a adsorção da proteína glicomacropeptido (GMP), usando-se uma resina hidrofóbica (Streamline Phenyl). Os experimentos em leito expandido foram conduzidos em diferentes concentrações de proteínas e vazão, estudando-se o comportamento da curva de ruptura do glicomacropeptídeo (GMP).

2. ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO

A necessidade de se usar uma solução clarificada em um processo cromatográfico ocorre, principalmente, para impedir o bloqueio da coluna pelo material particulado em um processo tradicional, aumentando, assim, a queda de pressão na coluna e acarretando interrupção do processo.

A técnica de adsorção em leito expandido (ALE) está sendo usada com esse intuito, podendo ser a mesma aplicada em processos com alimentação contendo material particulado. Desde que o leito opere na forma expandida, não existe um bloqueio da coluna pelo material particulado em suspensão, e esses passarão preferencialmente pelos espaços vazios de leito.

A grande vantagem de se usar o leito expandido na estratégia de purificação é a diminuição do número de operações unitárias usadas no processamento, principalmente nas etapas iniciais de centrifugação e filtração (BASCOUL et al. 1993; CARRERE 1993; JAMES 1994; CONRADO 2003). Como conseqüência, os custos na produção e na obtenção da proteína de interesse, com elevado grau de pureza, são diminuídos.

Para se conhecer o comportamento fluidodinâmico do leito expandido devem-se estudar o regime de escoamento do fluido, o grau de mistura do fluido na coluna e a possibilidade de existência de uma região estagnada entre o fluido e o adsorvente. Deve-se ressaltar que a adsorção em leito expandido está baseada no controle da fluidização estável, na qual se combinam as propriedades fluidodinâmicas do leito fluidizado com as propriedades cromatográficas do leito fixo (CONRADO et al., 2000).

A porosidade do leito pode ser dada em termos do grau de expansão do leito (H_o/H) de acordo com a equação 1.

$$e = 1 - (1 - e_o)\frac{H_0}{H} \quad (1)$$

Sendo e_o a porosidade do leito fixo, H_0 altura do leito sedimentado e H altura final do leito após a expansão.

Segundo Richardson e Zaki (1954), para partículas esféricas rígidas a relação entre a velocidade linear (U) e a velocidade terminal (U_t) é dada por:

$$\ln U = \ln U_t + n \ln e \quad (2)$$

O valor de n é função do número de Reynolds terminal (Re_t) e da relação entre o diâmetro da partícula (d) e da coluna (D), (equações de 3 a 7).

$$n = 4{,}65 + 20(d / D) \qquad (Re_t < 0{,}2) \quad (3)$$

$$n = 4{,}40 + 18(d / D)\, Re_t^{-0{,}03} \qquad (0{,}2, < Re_t < 1{,}0) \quad (4)$$

$$n = 4{,}40 + 18(d / D)\, Re_t^{-0{,}1} \qquad (1{,}0 < Re_t < 200) \quad (5)$$

$$n = 4{,}40\, Re_t^{-0{,}1} \qquad (200 < Re_t < 500) \quad (6)$$

$$n = 2{,}40 \qquad (Re_t > 500) \quad (7)$$

$$Re_t = \frac{v_t\, r\, d}{m_l} \quad (8)$$

Sendo d é o diâmetro da partícula, r a densidade do líquido, m_l a viscosidade do líquido e v_t a velocidade terminal ou de Stokes apresentada na seguinte equação:

$$v_t = \frac{d^2 g}{18 m_l}(r_s - r) \quad (9)$$

Sendo r_s a densidade do sólido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

O GMP foi adquirido da Davisco Foods International Inc. (Minnesota, EUA). O GMP tem uma massa molecular de 7000 Da e ponto isoelétrico (pI) de 4.3. O adsorvente foi Streamline Phenyl, adquirido da Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia), cuja densidade média de partícula é 1,2 g/mL. Possui tamanho de partícula entre 100 a 300 μm, porosidade de 0,60, forma esférica e matriz com núcleo de quartzo cristalino. Trata-se de um material empregado para a adsorção em leito expandido, uma vez que é resistente a elevados fluxos de líquidos, e que foi empacotado em uma coluna XK 16/20 com 1,6 cm de diâmetro da Pharmacia Biotech. O fosfato de sódio (monobásico e dibásico) e sulfato de sódio foram de grau analítico.

3.2. EQUIPAMENTO

Foi utilizado um cromatógrafo Äkta (MOD 10X) de Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) com detector UV fixado a 210 nm. O equipamento foi controlado usando-se o software Unicorn v.5.01 (Amersham Biosciences). O sistema de temperatura foi controlado por um banho termostático (Quimis, precisão de 0.1 K).

3.3. PROCEDIMENTOS DOS EXPERIMENTOS

3.3.1 Determinação das curvas de rupturas

Uma coluna XK 16/20 foi empacotada de Streamline Phenyl e, inicialmente, equilibrada com 5 volumes de colunas (VC) com tampão fosfato 20 mM, pH 7,0 contendo sulfato de sódio a uma concentração de 0,45 M e temperatura de 27 $^{\circ}$C. Em seguida, a mesma fase móvel contendo a proteína em diferentes concentrações (10,0 12,5 e 15,0 mg/mL), foi bombeada para a coluna em diferentes vazões (30, 60, 90 mL/min) até a obtenção das curvas de rupturas, sendo que a absorbância foi registrada na faixa de UV (210 nm).

Após a obtenção da curva de ruptura, foi realizada a limpeza do leito, trocando-se a fase móvel por outra isenta de proteína. Posteriormente, o escoamento foi interrompido pela sedimentação do leito. O fluxo pela coluna foi invertido e a eluição de proteína foi efetuada usando-se na fase móvel tampão fosfato a 20 mM e pH 7,0. Os experimentos foram realizados com repetições, seguindo um planejamento fatorial do tipo 3 x 3. No final de cada experimento, a coluna foi regenerada com 25 VC de tampão fosfato 20 mM, pH 7,0.

3.3.2 Distribuição do tempo de residência (DTR)

Determinações experimentais de DTR para o leito expandido foram levadas a cabo para se determinar o coeficiente de dispersão axial (D_{axi}) do líquido para diferentes fluxos usados neste trabalho. Acetona a 1% (v/v) em tampão fosfato 20 mM, pH 7,0 a 25 ^{o}C, foi utilizada como traçador, usando-se a técnica frontal com sinal negativo para se obter o número de pratos teóricos (N). A DTR foi determinada pela metodologia proposta por Dos Santos et al., (2002), os quais relacionam o número de pratos teóricos da coluna (N) com a distribuição do tempo de residência. O procedimento para determinar o DTR é descrito a seguir:

O tampão fosfato 20 mM e pH 7,0 foi bombeado pelo leito até a obtenção de uma resposta estável. O pistão móvel da coluna foi movido até a superfície do leito e o escoamento permaneceu até a estabilização da medida do detector. Em seguida, a fase móvel contendo o tampão fosfato e 1% (v/v) de acetona foi escoada pela coluna até a estabilização da leitura da absorbância máxima (etapa do sinal positivo).

Neste instante, trocou-se a fase móvel por uma isenta de acetona e estabeleceu-se este como tempo zero. O escoamento foi mantido até que verificou-se o registro da absorbância como zero. Definiu-se, então, o tempo de residência médio como o tempo gasto para que a absorbância fosse igual a 50% de seu valor máximo. O desvio padrão é dado como a metade do intervalo de tempo entre os valores relativos a 15,85% e 84,15% da absorbância máxima. O número de pratos teóricos (N) é determinado pela técnica de sinal negativa por:

$$N = \frac{t^2}{s^2} \tag{10}$$

Sendo s^2 é o desvio padrão e t é o tempo de residência na coluna.

A relação entre o coeficiente de dispersão do líquido (D_{axi}) e N é:

$$D_{axi} = (UH)/(2Ne) \quad (11)$$

Sendo U é a velocidade superficial, H é a altura do leito expandido, e e é a porosidade do leito, dado pela equação (1).

3.3.3 Determinação da viscosidade (m)

A viscosidade da fase móvel foi determinada em um viscosímetro de tubo capilar Cannon-Fenske (Schott-Geräte, Hofheim, Alemanha) para as temperaturas de análises, de acordo com a norma internacional ISSO/DIS 3105 (Modelos dos viscosímetros: 513 01/75; 513 10/100; 513 20/200).

Antes de cada análise, o viscosímetro foi equilibrado por 30 minutos, na fase móvel, nas temperaturas de análises (288,15 K; 303,15 K e 318,15 K), em um banho criostático com uma precisão na temperatura de $\pm 0{,}01$ K. Em seguida, a viscosidade foi medida, segundo as normas referidas.

As massas específicas da fase fluida foi determinada utilizando-se o método de picnômetro, empregando-se um picnômetro de 25 mL (Pirex, Brasil).

4. RESULTADOS E DISCUSÃO

Em todos os experimentos realizados, os leitos apresentaram, visualmente, uma boa estabilidade, sem que nenhum movimento característico de turbilhões fosse observado. Há uma relação linear entre o fator de expansão do leito e a velocidade (R^2>0,98) para as duas curvas, (ver Figura 1). Esse comportamento indica que na faixa de velocidade estudada a fluidização do leito é estável. Os experimentos foram realizados com água purificada (Milli-Q) e tampão.

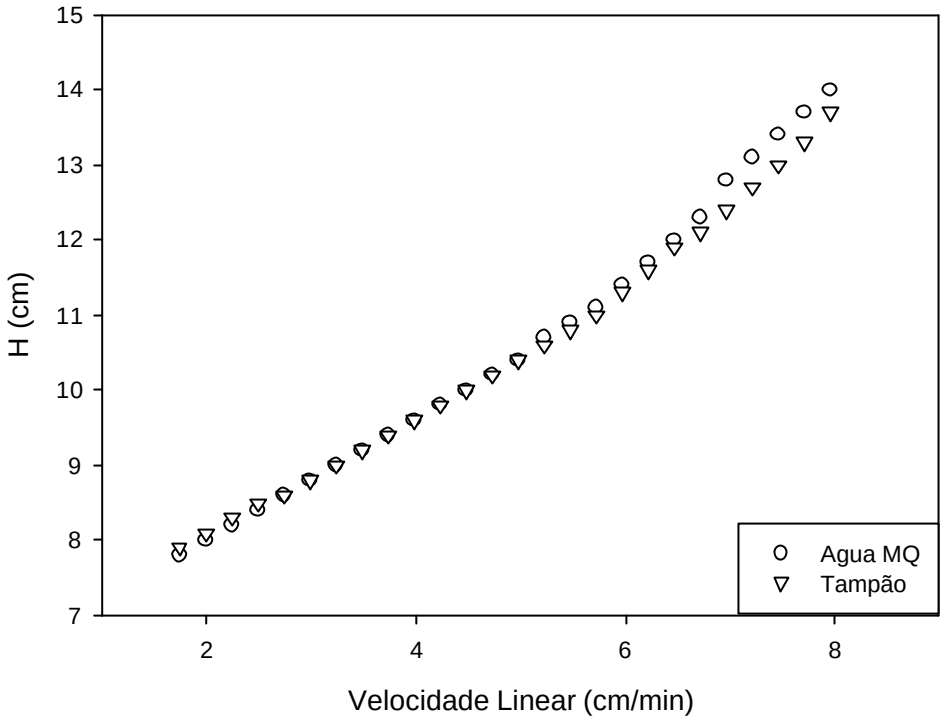


Figura 1. Expansão de leito (Streamline fenhyl) em função da velocidade.

4.1 ANÁLISES DA DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR)

A técnica de estímulo e resposta foi usada na análise da distribuição do tempo de residência para determinar o parâmetro $D_{axi,}$ que caracteriza o tipo de escoamento predominante na coluna (mistura ou empistonado). A acetona foi o traçador empregado na coluna XK 16/20 contendo o leito de resina hidrofóbica expandida com tampão.Observa-se na Figura 2, uma variação nos valores do coeficiente de dispersão axial ao mudar a velocidade da fase móvel, tendo-se uma aproximação a uma linha reta (R^2=0,989) que caracteriza o tipo de escoamento empistonado. Assim, o tipo de escoamento na coluna foi o empistonado e os valores de D_{axi} encontrados estão dentro do previsto na literatura para leito expandido.

Batt et al. (1995) encontraram valores de D_{axi} para uma série de experimentos realizados com resinas Streamline iguais a 1,86 x 10^{-6} $m^2.s^{-1}$, usando velocidades de 135 $cm.h^{-1}$ e altura de leito sedimentado de 8,6 cm. THÖMMES et al. (1996) encontraram valores de D_{axi} na faixa de 6 x 10^{-6} a 9 x 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ em coluna com altura de leito de 6,0 cm e velocidades lineares que variaram de 375 a 200 $cm.h^{-1}$.

TONG et al. (2003) pesquisaram o comportamento de dispersão axial da fase liquida (D_{exi}) em leito expandido com resina Streamline DEAE em função da vazão, e constataram que o valor de D_{exi} no leito aumentou com o incremento da vazão, apresentando valores de D_{exi} entre 2,2 x 10^{-6} e 1,1 x 10^{-5} $m^2.s^{-1}$ para velocidades do líquido de 60 a 470 $cm.h^{-1}$.

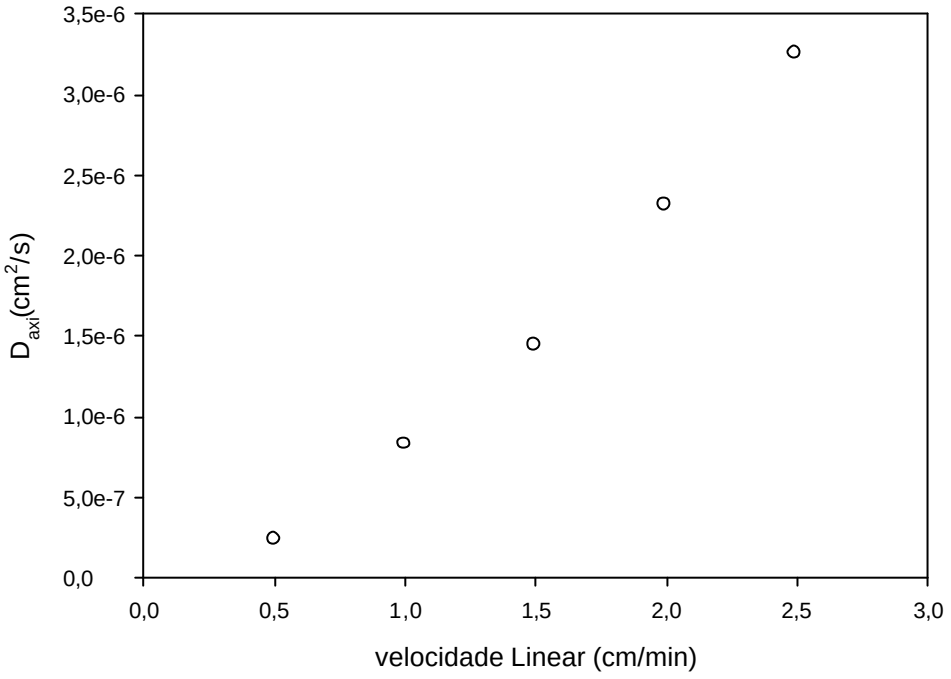


Figura 2. Coeficiente de dispersão axial em função da velocidade linear.

4.2 DETERMINAÇÕES DOS PARÂMETROS DE RICHARDSON E ZAKI

Para se determinar os parâmetros de Richardson e Zaki tem que se fazer uma regressão linear da relação do logaritmo natural da velocidade linear pelo logaritmo natural da porosidade do leito expandido. O parâmetro n está relacionado com o regime de fluxo do processo e U_t com a velocidade terminal de equilíbrio da equação (2).

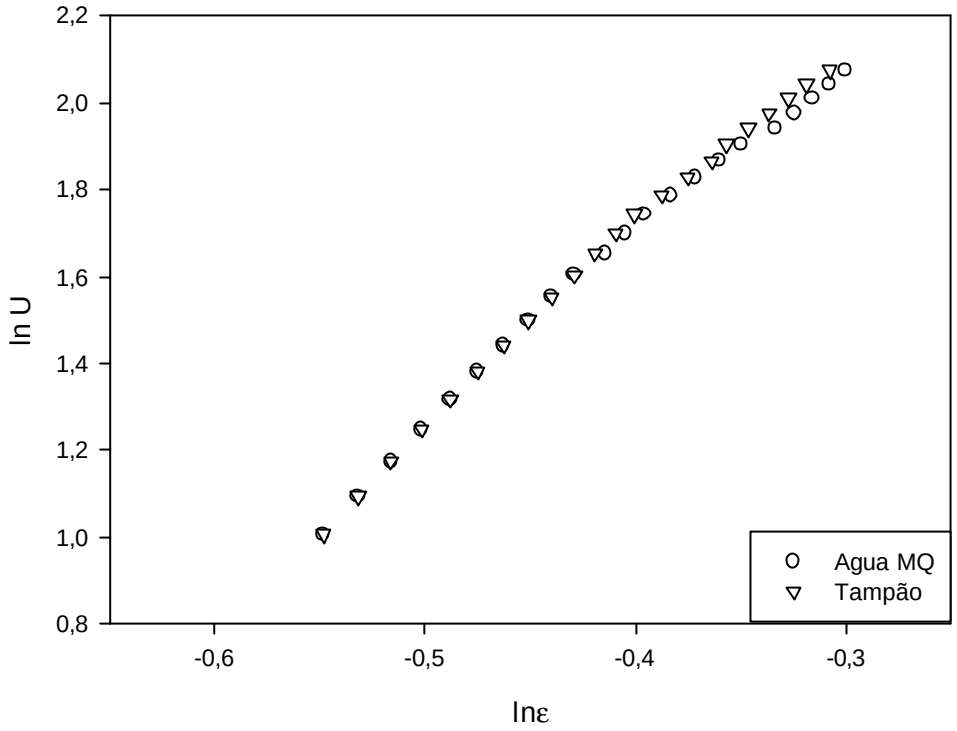


Figura 3. Linearização dos dados obtidos para velocidades lineares versus porosidade, objetivando a obtenção dos parâmetros de Richardson e Zaki.

A Tabela 1 mostra os valores calculados de *U* e *e* os resultados experimentais.

Tabela 1. Valores da porosidade e velocidade linear experimental

Água		Tampão	
e	U	e	U
0,58	2,74	0,58	2,74
0,59	2,99	0,59	2,99
0,60	3,23	0,60	3,23
0,61	3,48	0,61	3,48
0,61	3,73	0,61	3,73
0,62	3,98	0,62	3,98
0,63	4,23	0,63	4,23
0,64	4,48	0,64	4,48
0,64	4,73	0,64	4,73
0,65	4,98	0,65	4,98
0,66	5,22	0,66	5,22
0,67	5,47	0,66	5,47
0,67	5,72	0,67	5,72
0,68	5,97	0,68	5,97
0,69	6,22	0,69	6,22
0,70	6,47	0,69	6,47
0,70	6,72	0,70	6,72
0,72	6,97	0,71	6,97
0,72	7,21	0,71	7,21
0,73	7,46	0,72	7,46
0,74	7,71	0,73	7,71
0,74	7,96	0,74	7,96

A Tabela 2 mostra os parâmetros de Richardson e Zaki calculados neste trabalho. Os valores de n e U_t foram obtidos, através dos dados experimentais, aplicando-se a equação (2). O valor de n_{ts} foi obtido através da equação (4) levando-se em consideração o Reynolds terminal (Re_{ts}) obtido com o valor da velocidade terminal v_t, calculado com as equações (8) e (9).

Tabela 2. Parâmetros de Richardson e Zaki para a expansão da resina Streamline Phenyl obtidos com a solução tampão fosfato 20 mM, pH 7,0 e água MQ, T=25^{o}C.

n	**Ut (cm/min)**	**R^2**	**n_{ts}**	**v_{ts} (cm/min)**	**Re_{ts}**	**d (mm)**	m_l
4,5	33,2	0,99	4,6	16,3	0,6	200	0,96
4,8	38,4	0,99	4,4	29,8	1,1	200	0,89

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

igual a 5,6 e, para Reynolds terminal, na faixa de 0,004 a 0,7 para partículas de diâmetro entre 20 e 130 mm fluidizadas com água. Essa faixa de Re_{ts} é bem menor do que a considerada por Richardson e Zaki, no entanto, o autor supõe que o fluxo é laminar.

THEODOSSIOU et al. (2002) comparam valores de n experimental, obtidos para protótipos de adsorventes desenvolvidos em laboratório (até então não comerciais), com alta densidade, e diâmetro de partícula pequena (em torno de 24 a 45,5 mm) com o adsorvente comercial da linha Streamline (com diâmetro de partícula entre 70 a 260 mm). O valor de n experimental, obtido para o adsorvente não comercial variou entre 5,02 e 5,81; para valores de $Re_{ts,}$ entre 0,066 e 0,080. O valor de n experimental, obtido para o adsorvente da linha Streamline foi de 6,55 e o Reynolds terminal foi de 0,76. No entanto, apesar dos altos valores de n, esses autores consideram que o regime de fluxo é laminar.

Conrado (2003) encontrou valores para n igual a 4,9 e, para Reynolds terminal, de 0,70 , para o adsorvente Streamline fenil os quais estão dentro da faixa prevista por Richardson e Zaki (1954), considerando fluxo laminar. Observa-se na tabela 1 que os valores de n_s são próximos e estão dentro da faixa prevista por Richardson e Zaki (1954), Jottran (1954), Theodossiou et al., (2002) e Conrado (2003).

Desta forma, pode-se assegurar que na faixa de velocidade linear estudada, neste trabalho, o fluxo foi laminar quando o leito é fluidizado com a solução tampão de fosfato de 20 mM e água Milli-Q. O valor encontrado para U_t é menor do que o estabelecido pela equação de Stokes (v_t), indicando que a velocidade de equilíbrio não foi ultrapassada, ou seja, o leito possui uma fluidização estável.

4.3 ANÁLISES DAS CURVAS DE RUPTURA

Os ensaios de adsorção no leito expandido com a resina foram realizados em condições experimentais, de modo que a influência do grau de expansão, a concentração inicial de proteína alimentada à coluna e a interação entre ambas pudessem ser evidenciadas sobre a eficiência da coluna. Portanto, neste trabalho, a

eficiência é o principal fator em que se baseiam as análises comparativas entre as várias condições operacionais usadas para a obtenção das curvas de rupturas.

A Tabela 4 apresenta as condições de concentração inicial da proteína e vazão em que foram obtidas as curvas de rupturas e os respectivos valores de eficiência da coluna (E_f definida pela equação 12) de leito expandido em adsorver a proteína GMP.

$$E_f = \frac{m_{ads.ret.}}{m_{ads.apli.}} \text{ X } 100 \qquad (12)$$

Sendo $m_{ads.ret.}$ e $m_{ads.apli.}$ é a quantidade de adsorbato retido e aplicado no leito respectivamente.

A temperatura e a concentração de sulfato de sódio usadas no processo de adsorção em leito expandido foram de 300 K e 0,45 M, respectivamente, empregando o programa SAS (Statistical Analysis System-SAS Institute Inc. North Carolina, USA) com os dados de adsorção em tanques agitados.

Tabela 3. Condições operacionais das curvas de rupturas e os valores da eficiência da coluna.

Ensaios	C_0 Proteína(mg/mL)	Vazão (mL/min)	Ef (%)
1	10,16234	1	19,21
2	12,92925	1	17,2
3	13,42178	1	17,85
4	15,40487	1	15,03
5	16,45991	1	16,06
6	11,29324	1	11,02
7	11,15894	2	16,02
8	11,2044	2	16,08
9	12,93278	2	14,12
10	13,41116	2	13,67
11	11,13404	3	14,15
12	12,53734	3	13,24
13	12,8805	3	13,59
14	15,42571	3	11,63
15	17,35495	3	13,08
16	16,28302	3	12,27

A eficiência da coluna de adsorção é definida como o quociente da quantidade de adsorbato retido no leito, e a quantidade de adsorbato aplicado, vezes cem.

A Figura 4 (A e B) apresenta as curvas de ruptura nas condições de concentração constante e variando a vazão de alimentação, enquanto a Figura 5 (A e B) apresenta as curvas de ruptura nas condições de vazão constante e diferentes concentrações.

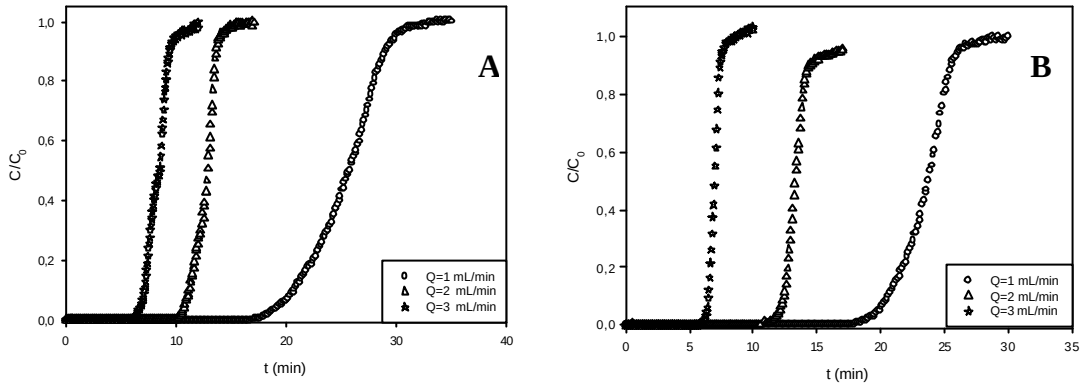


Figura 4. Curvas de rupturas com concentrações constante e diferentes vazões, A) 10 mg/mL, B) 15 mg/mL.

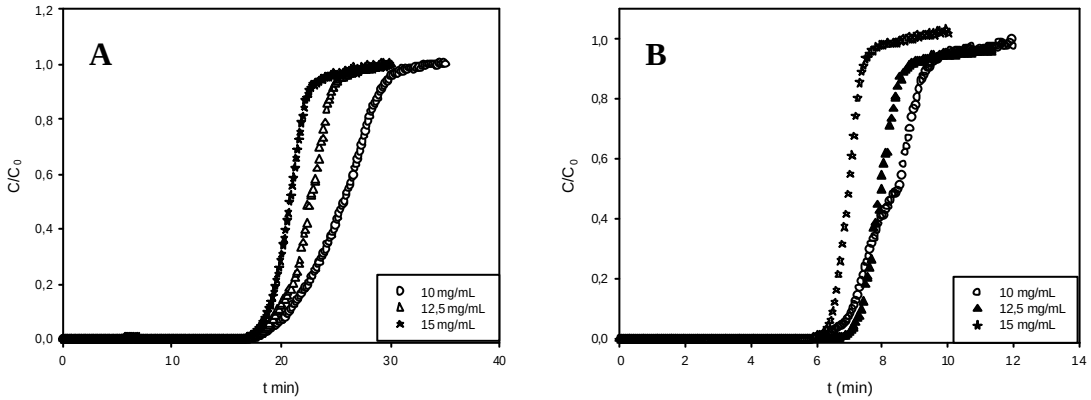


Figura 5. Curvas de rupturas com vazão constante e diferentes concentrações, A) 1 mL/min, B) 15 mL/min.

Dados os valores da Tabela 3 e observando-se as Figuras 4 e 5, verifica-se que o aumento da expansão do leito e da concentração de alimentação diminui a eficiência da coluna de adsorção. Os demais gráficos da curvas de rupturas são relacionados no apêndice.

Tong et al. (2003) estudaram a adsorção da proteína albumina de soro bovino (BSA) em leito expandido na resina Streamline DEAE, sob várias condições de operações, tais como diferentes concentrações de alimentação e vazão de alimentação, obtendo comportamentos similares aos encontrados neste trabalho. Kalil (2000) estudou a adsorção de inulinase em cromatografia de troca iônica, e concluiu que o aumento da expansão do leito diminui a massa adsorvida dessa enzima na coluna Streamline SP-25. Tong et al. (2002), Finette et al. (1998), Mullick et al. (1998), e Thömmes et al. (1995) estudaram as curvas de rupturas obtidas experimentalmente, mantendo-se constante a temperatura e analisando-se, principalmente, o efeito da variação da velocidade linear sobre a capacidade dinâmica da coluna de leito expandido, verificando que o aumento da velocidade linear diminui a capacidade dinâmica de adsorção das proteínas.

Veredas (2000) estudou a purificação da Alfa-Lactalbumina a partir do soro de leite em leito expandido de resinas (Streamline Phenyl) e obteve recuperação de até 16,26 %. Conrado (2003) estudou a influência da temperatura e grau de expansão sobre a recuperação e purificação da Alfa-Lactoalbumina a partir do soro de leite bovino em leito expandido de resina hidrofóbica (Streamline phenyl), encontrando rendimento de até 9,35 %. O rendimento do processo de recuperação de GMP neste trabalho foi de até 19,21 %, o que pode ser considerado baixo. Estes valores foram conseguidos com a saturação da resina C/C_0 próximo a 1, durante a obtenção das curvas de ruptura, o que levou a uma perda considerável de GMP nas etapas de adsorção e lavagem. Na prática industrial, o rendimento do processo é calculado na condição C/C_0 inferior a 0,1; com isto, é possível obter um melhor rendimento na recuperação das proteínas (CHASE, 1984a).

Um modelo polinomial (equação 13) foi usado para ajustar os dados de eficiência E_f em função de Q e C_p.

$$Ef = 47{,}1227 - 5{,}9792Q - 3{,}2164C_P + 0{,}7244Q^2 + 0{,}0942C_P^2 + 0{,}0828QC_P \quad (13)$$

Sendo Q a vazão de alimentação e C_P a concentração inicial de proteína.

A Figura 6 apresenta os pontos experimentais em boa concordância com os pontos previstos pelo modelo, indicando um bom ajuste do modelo com os dados experimentais (R^2=0,94).

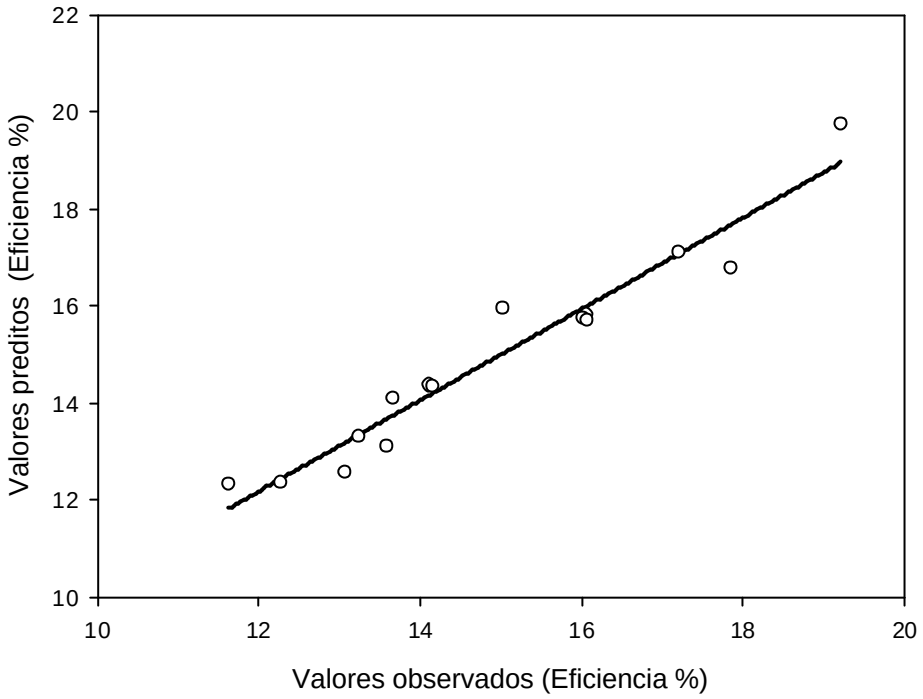


Figura 6. Valores observados versus valores preditos para a eficiência da coluna.

5. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados mostram que o aumento da velocidade linear e, conseqüentemente, o grau de expansão associado ao aumento da concentração diminuem a eficiência da coluna para adsorver a proteína de GMP, imprimindo uma fluidodinâmica estável, sob o ponto de vista do leito expandido, com coeficiente de dispersão axial dentro dos valores encontrados na literatura, indicando um comportamento ideal da coluna devido ao baixo grau de mistura.

A eficiência do processo de adsorção de GMP com a resina hidrofóbica apresenta-se baixa na condição de saturação do leito, uma vez que nesta condição há perdas elevadas de proteínas na etapa de adsorção e lavagem. Podem-se encontrar melhores resultados para o rendimento quando a concentração de saída na curva de ruptura atinge no máximo 10 % da concentração inicial.

6. NOMENCLATURA

Símbolo	Descrição
d	Diâmetro da partícula
D	Diâmetro de coluna
D_{axi}	Coeficiente de dispersão axial da fase líquida
E_f	Eficiência da coluna
$m_{ads.ret.}$	Massa de proteína retinida
$m_{ads.apli.}$	Massa de proteína alimentada a processo
Q	Vazão de alimentação
C_p	Concentração inicial de proteína
N	Número de pratos teóricos
Re_t	Número de Reynolds
U	Velocidade superficial do líquido
U_t	Velocidade de equilíbrio
v_t	Velocidade terminal

Símbolos Gregos

r_s	Densidade do sólido
r	Densidade do líquido
e	Porosidade do leito
e_0	Porosidade de leito fixo
m_l	Viscosidade do líquido
s	Desvio padrão

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTENNHÖNER. U., MEURER, M., JOCHEN, S., HENNER, S. T., Parameter estimation for the simulation of liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, 769, 59-68, 1997.

BASCOUL, A., BENAIJA, E, H., BERTHAUD, Y., TORRENTI, J. M., ZIZI, Z. Movents dês particules solids in fluidisation liquide sólido. **Chemical Engineering Journal**. 6, 1340-1350, 1993.

BATT, B. C., YABANNAVAR, V. M., SINGH, V. Expanded bed adsorption for protein recovery from whole mammalian cell culture broth. **Bioseparation.** 5, 41-52, 1995.

CARRERE, H. **Extraction des proteines du lactoserum par chromatographie D'echange D'ions en lit fluidese. Modelation et optimisation**. Toulouse: L'institut National Polytechnique de Toulouse 1993.

CHANG, Y. K., CHASE, H. A., Development of operating conditions for protein using expanded bed techniques: The effect oh the degree of bed expantion on adsorption performance. **Biotechnology and Bioengineering.** Vol. 49, 512-526, 1996 (a).

CHANG, Y. K., McCREATH, G. E., DRAEGER, N. M., CHASE, H. A., Novel technologies for direct extraction of proteins. Trans. **Inst. Chem. Engs.** vol. 71B, 299-303, 1993.

CHASE, H. A. DRARGER, N. M., Affinity purification of proteins using expanded beds. **Journal of Chromatpgraphy A.** vol. 597, 129-145, 1992.

CHASE, H. A. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. **Journal of Chromatography A.** 297, 179-202, 1984a.

CHASE, H. A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. **Tibtech.** Vol. 12, 296-303, 1994.

CHEN, J.; SUN, Y. Modeling of the salt effects on hydrophobic adsorption equilibrium of protein. **Journal of Chromatography A**. V. 992, p. 29-40, 2003.

CONRADO, L. S. VEREDAS, V. NÓBREGA. E. S., SANTANA, C. C. Expanded bed milk whey proteins. Pôster apresentado ao Third International Conference on Expanded Bed Adsorption. **Germisch-pPartenkirchen**, Germany, 2000.

CONRADO, L. S. **Influência da temperatura, grau de expansão e altura de leito sobre a recuperação e purificação de *a* -Lactalbumina a partir do soro de leite bobino em leito expandido de resina hidrofóbica.** Teses de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003, 134p.

DASARI, G., PRINCE, I., HEARN, M. T. W., High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins, CXXIV. Physical characterization of fluidized-bed behaviour of chromatographic packing materials. **Journal of Chromatography A**. vol. 631, 115-124, 1993.

DE LUCA, L., HELLENBROICH, D., TITCHENER-HOOKER, N. J., CHASE, H. A., A study of the expansion characteristics and transient behaviour of expanded beds of adsorbent particles suitable for bioseparations. **Bioseparation**. Vol. 4, 311-318, 1994.

DOS SANTOS, E. S., GUIRARDELLO, R., FRANCO. T.T. Preparative chromatography of xylanase using expanded bed adsorption. **Journal of Cromatography A,** vol. 944, 217-224, 2002.

DZIUBA, J., MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow´s k-casein. Int. **Dairy J.**, 6, 1017-1044, 1996

FINETTE, G. M. S., MÃO Q-M, HEARN, T. W. Examination of protein adsorption influidized bed and packed bed columns ay different temperatures using frontal chromatography methods. **Biothecnogy and Bioengineering.** 58, 35-46, 1998.

FREJ, A-K. B., HJORTH, R., HAMMARSTRÖM, A., Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified Escherichia coli homogenate using expanded bed adsorption. **Biotechnology and Bioengineering.** Vol. 44, 922-929, 1994.

FREJ, A-K. B., JOHANSSON, H. J., JOHANSSON, S., LEIJON, P., Expanded bed adsorption at production scale: scale-up verification, process example and sanitization of column and adsorbent. **Bioprocess Engineering.** Vol. 16, 57-63, 1997.

GERBERDING, S.J. BYERS, C.H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of Chromatography**, v. 808, p.141-151, 1998.

JAMES, E. A. **The application of multicomponent adsorption theory to an ion exchange chromatography system for recovery of whey proteins**. Brisbane: Department of Chemical Engineering, Thesis. The University of Queensland 1994

JOTTRAN, R. **Etude de quelques aspects de la fluidization dans les liquids**. Chemical Engineering Science. 3, 12-16, 1954.

KALIL, S. J. **Produção de inulinase por Kluyveromyces marximux e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido**. Tese. FEA, Unicamp, Campinas-SP, 2000.

LEVISON, P. R., HOPKINS, A. K., HATHI, P. BADGER, S. E., MANN, F., DICKSON, N., PURDOM, H. A., Suspended bed chromatography, a new approach in downstream processing. **Journal of Cromatography A** vol. 890, 45-51, 2000.

MAHN, A.; ZAPATA-TORRES, G.; ASEJO, J. A. A theory of protein-resin interation in hydrophobic interation chromatography. **Journal of Cromatography A**. 1066, 81-88, 2005.

McCREATH, G. E., CHASE, H. A. OWEN, R. O., LOWE, C. R. Expanded bed affinity chromatography of dehydrogenases from baker's yeast using dye-ligand perfluoropolymer supports. **Biotechnology and Bioengineering**. Vol. 48, 341-354, 1995.

MILLICK, A., COLLEEN, M. G., FLICKINGER, M. C. Expanded and packed bed albumin adsorption on fluoride modified zirconia. **Biotecnology and Biogineering.** 60, 333-340, 1998.

QUEIROZ, J. A., TOMAZ, C. T., CABRAL, J. M. S., Hydrophobic interaction chromatography of proteins, **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 143-159, 2001.

RICHARDSON, J. H. ZAKI, W. N. Sedimentation and fluidization: part I. **Trans. Instn. Engrs.** Vol. 32, 35-53, 1954.

ROJAS, E. E. G. **Separação e purificação de *a* -lactoalbumina e *b* -lactoglobulina pela cromatografia por exclusão molecular após a extração com sistemas aquosos bifásico**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 82 f. Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SANTOS, E. S., GUIRARDELLO, R., FRANCO T. T., **Distributor effect onexpanded bed adsortion**. Ion Exchange at the Millenium (proceedings of IEX 2000), ed. by J. A. Greig, SCI press, London, 408p., 2000.

THEODOSSIOU, I., ELSNER, THOMAS, R. T. O., TIMOTHY, J, H. Fluidisation and dispersion behaviour of small high density pellicular expanded bed adsorbents. **Journal of Chromatography** A. 964, 77-89, 2002.

THÖMMES, J., BADER, A., HALFAR, M., KARAU, A., M-R. Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein a coated adsorbent in expanded beds. **Journal Chromatography A.** 752, 111-122, 1996.

TONG,X-D, XUE, B, SUN Y. Modeling of expanded-bed protein adsorption by taking into account the axial particle size distribution. **Biochemical Engineering Journal.** 16, 265-272, 2003.

TONG, X-D, SUN, Y. Particle size and density distributions of two dense matrices in expanded bed system. **Journal Chromatography A**. 977, 173-183, 2002.

VEREDAS, V. **Purificação da *a* -lactoalbumina a partir do soro de leite em leito fixo e expandido de resinas**. Campinas, SP: UNICAMP, 2000. 91 f. Dissertação Mestrado em Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ZHIGUO L., YESONG G. and TINGYUE G. Mathematical modeling and scale-up of size-exclusion chromatography, **Biochemical Engineering Journal**, vol 2 p. 145-155, 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos por meio do estudo da adsorção de GMP com uma resina de interação hidrofóbica (Streamline Phenyl) foi possível observar que este processo é dependente da concentração de sal e o processo é espontâneo e entropicamente dirigido.

Na cromatografia líquida usada para separar o GMP pela técnica de leito expandido mostrou que o aumento da velocidade linear e o aumento da concentração inicial de proteína diminuem a eficiência da coluna.

As condições estudadas neste trabalho apresentaram uma boa estabilidade do leito, obtendo valores de coeficiente de difusão axial que concordam com os dados da literatura.

Observa-se uma variação por meio de cinética de adsorção, a qual consiste que, com o aumento da temperatura e da concentração de sal, tem-se um aumento da adsorção. Observa-se, também, um aumento na difusão intrapartícula.

O coeficiente de transferência de massa diminuiu com o aumento da concentração de sal; no entanto, aumentou com o aumento da temperatura. O modelo de transferência de massa, se aplicado, ajusta-se bem à cinética de adsorção da proteína.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo