



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Centro de Tecnologia
Departamento de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



TESE DE DOUTORADO

RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO “TIPO
COALHO” USANDO CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA E INTERAÇÃO
HIDROFÓBICA EM LEITO NA FORMA EXPANDIDA

Jorge dos Santos Cavalcanti

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gorete Ribeiro de Macedo

Natal/RN
Junho/2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Jorge dos Santos Cavalcanti

RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
DO SORO DE QUEIJO “TIPO COALHO”
USANDO CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA
E INTERAÇÃO HIDROFÓBICA EM LEITO NA
FORMA EXPANDIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor, sob a orientação do Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos e co-orientação da Profa. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo.

Natal / RN
Junho / 2010

Catálogo da Publicação na Fonte.
UFRN / CT / PPGEQ
Biblioteca Setorial "Professor Horácio Nicolas Solimo"

Cavalcanti, Jorge dos Santos.

Recuperação e purificação de proteínas do soro de queijo "tipo coalho" usando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica em leite na forma expandida / Jorge dos Santos Cavalcanti. - Natal, 2010.

129 f. : il.

Orientador: Everaldo Silvino dos Santos.

Co-orientadora: Gorete Ribeiro de Macedo.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1. Soro de queijo – Recuperação de proteínas - Tese. 2. Soro de queijo - purificação de proteínas - Tese. 3. Soro de leite - Tese. I. Santos, Everaldo Silvino dos. II. Macedo, Gorete Ribeiro de. III. Título.

RN/UF/BSEO

CDU 637.344(043.2)

Jorge dos Santos Cavalcanti

Recuperação e purificação de proteínas do soro de queijo “tipo coalho” usando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica em leite na forma expandida

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.


Aprovado em 22 de junho de 2010



Prof. Dr Everaldo Silvino dos Santos
Orientador – UFRN



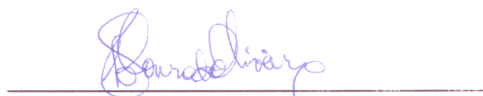
Prof (a) Dr (a) Gorete Ribeiro de Macedo
Co-orientadora - UFRN



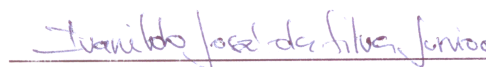
Prof (a) Dr (a) Ana Lúcia M. L. da Mata
Membro Interno – UFRN



Prof (a) Dr (a) Cristiane Fernandes de Assis
Membro Interno - UFRN



Prof (a) Dr (a) Líbia de Sousa Conrado
Oliveira
Membro Externo –UFCG



Prof. Dr Ivanildo José da Silva Junior
Membro Externo –UFC

Dedico com amor

A minha mãe Zeneide Cavalcanti pelo amor, apoio incondicional e exemplo de determinação e coragem, que nunca mediu esforços para termos acesso a educação, e graças a ela consegui chegar até onde cheguei. Agradeço por todo o carinho e amor que sempre me dedicou e principalmente por acreditar em mim.

Ao meu pai Francisco Cavalcanti, ao meu irmão Mario e as minhas irmãs Vera, Célia e Cristina, por (junto com minha mãe), servirem de espelho para minha educação e pelo incentivo ao estudo continuado.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos, pela orientação e demonstração de paciência e compreensão durante este período de convívio e confiança na minha pessoa, durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

As Professoras Dr^a Margarida Maria dos Anjos Magalhães e Gorete Ribeiro de Macedo por ter me incentivado e auxiliado no ingresso do meu doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRN pelos conhecimentos transmitidos.

A minha amiga Andréa Farias pela amizade e disposição de sempre me ajudar, desde o início deste Doutorado.

A minha amiga Michelle Rossana pela valiosa colaboração nas análises de eletroforese.

Aos alunos de iniciação científica do Grupo de Pesquisa do Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFRN, principalmente àqueles que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, Bruna e Jardelson.

A todos os amigos da pós-graduação pelo companheirismo.

Aos funcionários da pós-graduação Mazinha, Medeiros e Thyrone, pelo pronto atendimento e a disposição de sempre nos atender bem.

A todos os meus sobrinhos, em especial a Tatiana e a Daliana, pela ajuda fundamental para formatação desta Tese.

A Risolaine pela ajuda incansável no Laboratório, na digitação de trabalhos, pela compreensão e amizade. Serei sempre grato a você.

A Sra. Adalgiza pelo fornecimento do soro de queijo de coalho.

Certamente, nestes parágrafos não contêm os nomes de todos que fizeram parte desta 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.

"Para alcançar um ideal é necessário ter ambição, e ter ambição é perder de vista o ideal."

Carlos Drummond de Andrade

CAVALCANTI, Jorge dos Santos – Recuperação e purificação de proteínas do soro de queijo “tipo coalho” usando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica em leito na forma expandida. Tese de Doutorado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos, catalíticos e biotecnológicos, Natal/RN, Brasil.

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gorete Ribeiro de Macedo

Resumo: A adsorção em leito expandido vem se destacando como uma técnica promissora dentro do “*downstream processing*” por ser de fácil manuseio, baixo custo, diminuir etapas de processamento e utilizar o material particulado no seu estado natural. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo recuperar e purificar proteínas presentes no soro de queijo tipo coalho, através da técnica de adsorção em leito expandido, utilizando resinas de troca aniônica Streamline DEAE e troca catiônica Streamline SP e interação hidrofóbica Streamline™ *Phenyl*. Foi utilizada uma coluna de 2,6 cm de diâmetro interno por 30 cm de altura, acoplada a uma bomba peristáltica. Para o estudo do sistema foram realizados testes de hidrodinâmica e corridas de adsorção, com as três resinas, na presença de tampões Tris-HCl nas concentrações 30, 50 e 70 mM, com pHs ajustados usando HCl para 7,0; 7,5 e 8,0. Para os testes hidrodinâmicos foram estudados a expansão do leito e a Distribuição do Tempo de Residência (DTR). Na etapa de recuperação e purificação, uma amostra de solução de soro de 200 mL foi aplicada, a temperatura ambiente, a uma coluna contendo resina (25 mL) previamente equilibrada em tampão Tris/HCl (50 mM e pH 7,0), após lavagem efetuou-se a eluição de acordo com o tipo de técnica utilizada. Dessa forma, para adsorção com troca iônica a eluição ocorria com adição do eluente 100 mL Tris/HCl (50 mM, pH 7,0 em NaCl 1M). No caso de interação hidrofóbica, o eluente consistia de Tris/HCl (50 mM e pH 7,0). Os ensaios de adsorção foram realizados com as resinas Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl* e suas combinações. Os resultados mostraram que para as condições em que foram realizados os ensaios fluidodinâmicos e para o tipo de coluna utilizada, houve uma tendência a linearidade, o coeficiente de correlação (R^2) foi da ordem de 0,9 e que a resina Streamline *Phenyl* obteve um maior grau de expansão que as outras resinas, chegando a uma relação H_0/H de 2,2. A porosidade do leito usando as resinas DEAE e SP foi de 0,70 e da resina *Phenyl* foi um pouco maior, em torno de 0,75. O número de pratos teóricos

foi 109, 41,5 e 17,8 e o coeficiente de dispersão axial (D_{axial}) foi de 0,5, 1,4 e 3,7 x 10⁻⁶ m²/s, para as resinas Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*, respectivamente. As proteínas do soro são adsorvidas nas três resinas e a concentração de proteína em solução diminui rapidamente nos primeiros instantes do processo de adsorção, sendo o equilíbrio alcançado nos primeiros 10 minutos. Ao se aplicar o soro bruto sem tratamento para as três resinas até a saturação (ruptura), embora exista adsorção das proteínas para essas resinas, perde-se grande parte dessas proteínas nas etapas de passante e lavagem. Essas perdas somam 84, 77 e 96%, para as resinas Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*, respectivamente. Entretanto, pode-se recuperar 16, 23 e 4%, respectivamente, para as três resinas. As três resinas estudadas apresentaram picos de proteínas na eluição. De acordo com esses picos, foram identificadas 6 bandas de proteínas. Provavelmente essas proteínas sejam: albumina (69 KDa), lactoferrina (76 KDa) e lactoperoxidase (89 KDa), β -lactoglobulina (18,3 KDa) e α -lactoalbumina (14 KDa), dímero da β -lactoglobulina. Portanto, as resinas estudadas são compatíveis para serem utilizadas em leito expandido. O sistema formado pela eluição da Streamline DEAE quando foi aplicada na resina Streamline SP, tende a uma melhor purificação das proteínas do soro, principalmente da α -lactoalbumina.

Palavra chave: Proteína do soro, adsorção em leito expandido, cromatografia, soro de leite.

CAVALCANTI, Jorge dos Santos – RECOVERY AND PURIFICATION OF WHEY PROTEINS OF “COALHO” CHEESE USING IONIC AND HYDROPHOBYC CHROMATOGRAPHY IN EXPANDED BED MODE

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Co-Orientadora: Prof^{ca}. Dr^a. Gorete Ribeiro de Macedo

Abstract: Expanded Bed Adsorption plays an important role in the downstream processing mainly for reducing costs as well as steps besides could handling cells homogenates or fermentation broth. In this work Expanded Bed Adsorption was used to recover and purify whey proteins from coalho cheese manufacture using Streamline DEAE and Streamline SP both ionic resins as well as a hydrophobic resin Streamline™ Phenyl. A column of 2.6 cm inner diameter with 30 cm in height was coupled to a peristaltic pump. Hydrodynamics study was carried out with the three resins using Tris-HCl buffer in concentration of 30, 50 and 70 mM, with pH ranging from 7.0 to 8.0. In this case, assays of the expansion degree as well as Residence Time Distribution (RTD) were carried out. For the recovery and purification steps, a whey sample of 200 mL, was submitted to a column with 25 mL of resin previously equilibrated with Tris/HCl (50 mM, pH 7.0) using a expanded bed. After washing, elution was carried out according the technique used. For ionic adsorption elution was carried out using 100 mL of Tris/HCl (50 mM, pH 7.0 in 1M NaCl). For Hydrophobic interaction elution was carried out using Tris/HCl (50 mM, pH 7.0). Adsorption runs were carried out using the three resins as well as theirs combination. Results showed that for hydrodynamics studies a linear fit was observed for the three resins with a correlation coefficient (R^2) about 0.9. In this case, Streamline Phenyl showed highest expansion degree reaching an expansion degree (H_0/H) of 2.2. Bed porosity was of 0.7 when both resins Streamline DEAE and Streamline SP were used with Streamline Phenyl showing the highest bed porosity about 0.75. The number of theoretical plates were 109, 41.5 and 17.8 and the axial dispersion coefficient (D_{axial}) were 0.5, 1.4 and $3.7 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$, for Streamline DEAE, Streamline SP and Streamline Phenyl, respectively. Whey proteins were adsorbed fastly for the three resins with equilibrium reached in 10 minutes. Breakthrough curves showed that most of proteins stays in flowthrough as well as washing steps with 84, 77 and

96%, for Streamline DEAE, Streamline SP and Streamline Phenyl, respectively. It was observed protein peaks during elution for the three resins used. According to these peaks were identified 6 protein bands that could probably be albumin (69 KDa), lactoferrin (76 KDa), lactoperoxidase (89 KDa), β -lactoglobulin (18,3 KDa) e α -lactoalbumin (14 KDa), as well as the dimer of beta-lactoglobulin. The combined system compound for the elution of Streamline DEAE applied to the Streamline SP showed the best purification of whey proteins, mainly of the α -lactoalbumina.

Key word: When protein, expanded bed adsorption, chromatography, when milk.

Sumário

Lista de figuras.....
Lista de tabelas.....
Lista de Abreviaturas e siglas.....
1. INTRODUÇÃO	2
2. ESTADO DA ARTE.....	7
2.1.2- Soro de leite bovino	7
2.1.3- Proteínas do soro de leite bovino	8
2.1.3.1- β -Lactoglobulina (β -Lg).....	10
2.1.3.2- α -Lactoalbumina (α -La)	11
2.1.3.3- Albumina do Soro Bovino (BSA)	11
2.1.3.4- Lactoferrina	12
2.1.3.5- Lactoperoxidases	12
2.2- RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	13
2.2.1- Fator de recuperação e purificação de proteínas	13
2.1- ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO (ALE)	14
2.1.1- Considerações iniciais.....	14
2.1.2.- Hidrodinâmica.....	18
2.1.3- Troca iônica.....	21
2.1.3.1- Aplicação da ALE utilizando Troca iônica	23
2.1.4- Interação hidrofóbica	27
2.1.4.1- Aplicação da ALE utilizando interação hidrofóbica	28
2.1.5- Uso de ALE para recuperação e purificação de proteínas do soro de leite.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1- SORO DE LEITE.....	34
3.2- COLUNA	34
3.3-BOMBA.....	34
3.3.1-Calibração da bomba.....	35
3.4-ADSORVENTE	35

3.5- SISTEMAS TAMPONANTES	38
3.6-EXPANSÃO DO LEITO	40
3.7- DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR)	40
3.8- AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE ADSORÇÃO DAS RESINAS	41
3.9- EXPERIMENTOS DE ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO	42
3.10-DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	43
3.11 – ELETROFORESE	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1- EXPANSÕES DO LEITO	48
4.2- DISTRIBUIÇÕES DO TEMPO DE RESIDÊNCIA	53
4.3- AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE ADSORÇÃO DAS RESINAS	57
4.4- ENSAIOS DE ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO	60
5. CONCLUSÕES.....	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXO I-Grau de expansão do leito.....	94
ANEXO II- Porosidade do leito.....	107
ANEXO III- Determinação do tempo de residência.....	118
ANEXO IV- Ensaio cinéticos.....	121

Lista de Figuras

Figura 01: Esquema dos passos na adsorção em leito expandido, onde as colunas mostram os diferentes estágios de operação do sistema. As setas indicam a direção do escoamento (Pharmacia Biotech).....	16
Figura 02: Pulso em degrau para determinação do tempo de residência.....	21
Figura 03: Aparato experimental.....	35
Figura 04: Curva de expansão do leito utilizando as resinas Streamline DEAE, SP e <i>Phenyl</i> . ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0)	50
Figura 05: Curva de expansão do leito utilizando as resinas Streamline DEAE, SP e <i>Phenyl</i> . ($H_0= 10,0$ cm, 50 mM, pH 7,0)	51
Figura 06: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e <i>Phenyl</i> ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0).....	52
Figura 07: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e <i>Phenyl</i> ($H_0= 10,0$ cm, 50 mM, pH 7,0).....	53
Figura 08: Determinação do Tempo de Residência para a resina Streamline DEAE ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).....	54
Figura 09: Determinação do Tempo de Residência para a resina Streamline SP ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).....	55
Figura 10: Determinação do Tempo de Residência para a resina Streamline <i>Phenyl</i> ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).....	57
Figura 11: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline DEAE e solução tampão Tris/HCl 50 mM e pH 7,0.....	58
Figura 12: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline SP e solução tampão Tris/HCl 50 mM e pH 7,0.....	58
Figura 13: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline <i>Phenyl</i> e solução tampão Tris/HCl 50 mM e pH 7,0.....	61
Figura 14: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline DEAE ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).....	61
Figura 15: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline SP ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).....	62
Figura 16: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina	

Streamline <i>Phenyl</i> ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).....	62
Figura 17: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline DEAE com passante da eluição da resina Phenil ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).....	64
Figura 18 Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline SP com passante da eluição da resina Phenil ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).....	64
Figura 19: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline Phenilcom passante da eluição da resina DEAE ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).....	65
Figura 20: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline Phenil com passante da eluição da resina SP ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).....	65
Figura 22: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline SP com passante da eluição da resina DEAE ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).....	66
Figura 22: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline DEAE com passante da eluição da resina SP ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).....	66
Figura 23: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) quando a eluição da Streamline <i>Phenyl</i> foi aplicada na resina Streamline DEAE. (P) – Padrão de proteínas (Marcador); (1) Eluição DEAE; (2) Eluição <i>Phenyl</i> ; (3) Lavagem <i>Phenyl</i> ; (4) Passante <i>Phenyl</i> ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).....	70
Figura 24: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para Streamline SP (1) Eluição SP; (2) Lavagem SP; (3) Passante SP ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).	71
Figura 25: Gel de policrilamida (SPS-PAGE) quando a eluição da Streamline DEAE foi aplicada na resina Streamline <i>Phenyl</i> (P) Padrão de proteínas; eluição <i>Phenyl</i> ; Passante <i>Phenyl</i> ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0; $U = 300$ cm/h).....	72
Figura 26: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) quando a eluição da Streamline <i>phenyl</i> foi aplicada na resina Streamline SP (P) – Padrão de proteínas (Marcador); (1) Eluição SP; (2) Lavagem SP; (3) Passante SP ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).....	73
Figura 27: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) quando a eluição da Streamline	

DEAE foi aplicada na resina Streamline SP (P) – Padrão de proteínas (Marcador);
(1) Eluição SP; (2) Lavagem SP; (3) Passante SP (Ho= 5,0 cm, 50 mM, pH 7,0,
U= 300 cm/h..... 74

Lista de Tabelas

Tabela 01- Composição típica do leite e do soro de leite.....	8
Tabela 02: Propriedade química e físico-química das proteínas do soro.....	10
Tabela 03: Características da resina Streamline DEAE.....	35
Tabela 04: Características da resina Streamline SP.....	36
Tabela 05: Características da resina Streamline <i>Phenyl</i>	37
Tabela 06: Sistemas tampão Tris/HCl estudados, para altura inicial de 5,0 cm e velocidade 300 cm/h.....	39
Tabela 07: Ensaio de adsorção em leito expandido.....	43
Tabela 08: Expansão do leito para os sistemas estudados, para altura inicial de 5,0 cm e 10,0 cm e velocidade 300 cm/h.....	49
Tabela 09: Parâmetros estudados (N, Pe e D_{axial}).....	56
Tabela 10: Quantidade (mg) de proteínas adsorvidas/mL de resina para as três concentrações iniciais.....	59
Tabela 11: Balanço de massa para a resina Streamline DEAE.....	62
Tabela 12: Balanço de massa para a resina Streamline SP.....	63
Tabela 13: Balanço de massa para a resina Streamline <i>Phenyl</i>	63
Tabela 14: Balanço de massa quando se utilizou a resina <i>Phenyl</i> e a passante foi realizada com o eluído da resina DEAE.....	67
Tabela 15: Balanço de massa quando se utilizou a resina <i>Phenyl</i> e a passante foi realizada com o eluído da resina SP.....	67
Tabela 16: Balanço de massa quando se utilizou a resina <i>Phenyl</i> e a passante foi realizada com o eluído da resina SP.....	67
Tabela 17: Balanço de massa quando se utilizou a resina DEAE e a passante foi realizada com o eluído da resina <i>Phenyl</i>	68
Tabela 18: Balanço de massa quando se utilizou a resina DEAE e a passante foi realizada com o eluído da resina <i>Phenyl</i>	68
Tabela 19: Balanço de massa quando se utilizou a resina DEAE e a passante foi realizada com o eluído da resina SP.....	68
Tabela 20: Balanço de massa quando se utilizou a resina SP e a passante foi realizada com o eluído da resina DEAE.....	69

Lista de Abreviaturas e siglas

α -La: α -Lactoalbumina

β -Lg: β -Lactoglobulina

ALE: Adsorção em Leito Expandido

ANP: Atividade Específica no Material Não Purificado-Bruto

AP: Atividade Específica no Material Purificado

Arg: Arginina

Asp: Asparagina

Bo: Número de Bodenstein

C/Co: Concentração por Concentração Inicial

C: Concentração do material purificado

C₀: Concentração do material não purificado-bruto

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

cm/h: Centímetro por hora

CM: Carboximetileno

cm: Centímetro

Cys: Cisteína

Da: Dalton

D_{axial}: Dispersão Axial

DBO: Demanda Biológica de Oxigênio

DEAE: Dietilaminoetil

DTR: Distribuição do Tempo de Residência

EDTA: Etilenodiaminotetraácido

FAO: "Food and Agriculture Organization"

FP: Fator de Purificação

g/cm³: Grama por Centímetro Cúbico

g/gmol: Grama/Grama-mol

Glu: Glutamina

H: Altura do Leito Expandido

H₀: Altura do Leito Fixo

Ig: Imunoglobulina

IGF: Insulin like growth factors ou fatores de crescimento semelhante à insulina

KDa: Quilo Dalton
Leu: Leucina
Lis: Lisina
M: Molar
Met: Metionina
mg: Miligrama
n : Índice de Richardson-Zaki
N: Número de Pratos Teórico
NaCl: Cloreto de sódio
NaOH: Hidróxido de Sódio
nm: Nanômetro
p/p: peso/peso
Pe: Número de Peclet
PER: Protein Efficiency Ratio
Phe: Fenilalanina
pI: Ponto Isoelétrico
Q: Aminoquaternário
QAE: Aminoetilquaternário
Ret: Número de Reynolds terminal
RP: Recuperação da Proteína
rpm: Rotação por Minuto
S: Metilsulfonato
SAB: Soro Albumina Bovino
SP: Propilsulfonato
t: Tempo de Residência Médio
Tris: hidroximetilaminometano
U: Velocidade do Fluido
Ut: Velocidade Terminal da Partícula
UV: Ultra Violeta
Val: Valina
WHO: “World Health Organization”
 ε : Porosidade do Meio
 σ : Desvio Padrão

ϕ : Parâmetro que indica o comprometimento da fluidização devido à formação de camada estagnada

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

A indústria de leite e derivados é sem dúvida bem desenvolvida, entretanto, destaca-se o interesse em pesquisas que são realizadas principalmente para, em certos casos, encontrar formas viáveis economicamente de se utilizar os subprodutos gerados por tais processos, tornando-os atrativos do ponto de vista comercial.

Dentre os subprodutos clássicos, quando da utilização do leite para a produção de queijos, da indústria de laticínios, destaca-se a formação do soro. Durante o processo de coagulação (precipitação da caseína), que pode ser através de coagulação enzimática ou ácida, uma porção aquosa de coloração amarelo-esverdeada é separada do coágulo, dando origem ao soro (Kosikowski, 1979; Sgarbieri, 2005). Cerca de 85 a 95% do volume de leite utilizado na fabricação de queijos resulta em soro. Assim, dez litros de leite produzem, aproximadamente, 1 kg de queijo e 9 litros de soro (Vieira, 1984). Em média, 55% dos seus nutrientes ficam retidos no soro sendo os mais abundantes, a lactose (de 4,5 a 5,0 % p/v), as proteínas solúveis (de 0,6 a 0,8 % p/v) e os minerais (de 9 a 10 % de extrato seco); entretanto, possui também quantidades apreciáveis de outros compostos como, por exemplo, ácido lático e cítrico, compostos nitrogenados não protéicos (uréia e ácido úrico) e vitaminas do complexo B (Mello, 1989; Siso, 1996; Ponsana; Pinto; Castro-Gomes, 1992; Richards, 1997).

A produção de leite bovino no Brasil em 2008 foi de aproximadamente 27 bilhões de litros (MilkPoint, 2010). Percebe-se que nos últimos 10 anos a produção de leite vem crescendo em torno de 4,7% ao ano. No Nordeste, a produção média foi de 3 bilhões e 400 milhões de litros, com destaque para o estado da Bahia com 952 milhões de litros. O Rio Grande do Norte apresentou uma produção em torno de 219 milhões, com incremento de 2,5 % em relação ao ano anterior (MilkPoint, 2010).

Uma vez que a quantidade de soro produzida vem aumentando anualmente, acompanhando a tendência mundial da produção de queijo e conseqüentemente da produção de leite, existe a necessidade de se utilizar tal subproduto, com seus grandes volumes produzidos, a fim de se obter produtos que possuam maior valor agregado.

Por outro lado, o soro de queijo pode ser visto como agente de poluição, quando o mesmo é descartado em cursos de água e pode provocar a destruição da flora e fauna devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅), segundo Neves (1993). Isto ocorre por causa do elevado conteúdo em matéria orgânica, associado principalmente a presença de lactose e proteínas. A DBO do soro é de 30.000 a 50.000 mg/l (Von Sperling, 2005), assim a

Introdução

matéria orgânica é avaliada de maneira global e indiretamente por meio do parâmetro denominado DBO, que representa a quantidade de oxigênio dissolvido necessário para degradar biologicamente certa quantidade de matéria orgânica contida em uma amostra de efluente líquido. Portanto, isto significa que para cada litro de soro descartado nos efluentes, cerca de 30g a 50g de oxigênio dissolvido na água desaparecerão (Rede Ambiente, 2007). Entretanto, o soro pode ser considerado produto nobre pelo seu teor de proteínas solúveis, ricas em aminoácidos essenciais, pela presença de vitaminas do grupo B e pelo elevado teor de lactose e sais. As proteínas do soro possuem aminoácidos essenciais facilmente digeríveis e considerados altamente completos, tanto fisiológica quanto nutricionalmente. Além disso, apresentam características funcionais excelentes (Antunes, 2003). Sob o ponto de vista nutricional, as lactoalbuminas possuem um dos mais altos PER (*Protein Efficiency Ratio*) conhecidos 3,1; que supera o da caseína que é de 2,5 (Fosum, 1974; De Wit & Hontelez-Backx, 1981). O PER mede o quociente do ganho de peso em gramas pela quantidade de proteínas ingeridas, também em gramas, de um grupo de animais de laboratório normalmente camundongos, submetidos a uma dieta contendo a proteína em estudo (Jonas *et al.*, 1976).

Os componentes mais valiosos do soro são as proteínas, mas como a sua concentração neste líquido é muito reduzida, 93% de água e 0,6% de proteína, são necessárias etapas de concentração, para que as suas propriedades funcionais sejam realçadas (Huffamn, 1996). Os concentrados protéicos do soro apresentam características funcionais desejáveis para a indústria de alimentos como boa solubilidade, viscosidade, capacidade estabilizante, emulsificante, espumante, geleificante e boa absorção de água (Mathur & Shahani, 1979). Assim, estas proteínas têm encontrado uma série de aplicações nessa indústria, incluindo sopas desidratadas, molho para saladas, alimentos infantis, dietéticos e geriátricos, sorvetes, queijos, produtos de panificação, confeitarias, iogurtes, carnes, bebidas lácteas e como suplemento alimentar (Hidalgo & Camper, 1977). Segundo Singleton (1972), o sorvete é o produto lácteo que mais usa soro.

Devido às propriedades funcionais, fisiológicas e biológicas específicas de cada uma das proteínas do soro, tem havido um crescente interesse no fracionamento das proteínas, pois muitas vezes estas características não se fazem notar nos concentrados protéicos de soro devido à interação de outros componentes (Bramaud; Aimar; Daufin, 1997).

De acordo com Juliano; Petrus; Torrani (1987), a não utilização racional do soro resultante da fabricação de queijo na indústria de laticínios constitui prática antieconômica e até mesmo anti-social, não só devido à carência mundial de alimentos, mas também pelo caráter sazonal da produção de leite e oscilações desta.

Introdução

No Brasil, ao contrário de outros países, o soro de queijo ainda é considerado um subproduto, resíduo contaminante do meio ambiente, de pouco valor nutritivo. Nos Estados Unidos, grande parte dos resíduos de queijarias é aproveitada e 90% destes são destinados à alimentação humana, o que, em 2001 representou mais de 500.000 toneladas. O Brasil, entre 1998 a 2001, importou mais de 140.000 toneladas de soro em pó, devido à falta de capacidade interna de produção (Almeida; Bonassi; Roça, 2001; USDEC, 2003). Este desperdício, aliado ao valor nutritivo do soro de queijo, leva a direcionar a atenção do meio científico ao estudo de alternativas economicamente viáveis para o aproveitamento de suas proteínas, que apresentam alto valor nutricional e comercial.

Muito embora, as proteínas possam ser utilizadas em uma forma concentrada (Concentrado Protéico de Soro), que são fontes protéicas de inestimável valor para alimentação humana, principalmente considerando o atual quadro de fome e desnutrição que ocorre na nossa região e no mundo, entende-se que os valores individuais das proteínas existentes no soro não são completamente potencializados quando as mesmas se encontram em tal forma. Portanto, a purificação de proteínas tem, em geral, dois objetivos básicos: (a) obtenção da proteína virtualmente pura, para melhor estudo de suas características bioquímicas e de sua estrutura e (b) obtenção de um produto com maior atividade específica, por exemplo, as enzimas (unidades de atividade/mg de proteína) para aplicação em diversos processos. Entretanto, processos de purificação costumam elevar grandemente o preço do produto final e isto se deve, principalmente, às etapas envolvidas, que é dependente do máximo rendimento e grau de purificação desejado.

Tipicamente, o processo de recuperação e purificação de uma proteína é composto por múltiplas etapas cuidadosamente definidas, que têm como fundamento a distinção das proteínas com base no tamanho (massa molar), passante, hidrofobicidade, seqüência de aminoácidos, atividade biológica, etc., estes processos são mais conhecidos como *downstream processing*.

Dessa forma, no *downstream processing* utiliza-se um número distinto de operações unitárias para tratar uma solução contendo a biomolécula alvo a ser recuperada e/ou purificada, podendo essa solução conter ou não material particulado, tais como células intactas ou células rompidas. Nos últimos anos, entretanto, foi dada atenção considerável ao desenvolvimento das então chamadas operações integradas de *downstream processing*, das quais os três passos mais clássicos (separação sólido-líquido, concentração e isolamento primária de produtos) são fundidos em uma só unidade de operação. Desta forma, os processos semelhantes levam a uma redução do número de operações unitárias necessárias ao processo

Introdução

de purificação e, desta maneira, permitem não só uma alta recuperação, mas também uma economia superior na obtenção destes produtos.

Nesse contexto, um renovado interesse vem sendo dado, nos últimos anos, a técnica da Adsorção em Leito Expandido (ALE) na área de recuperação de biomoléculas, principalmente pela sua aplicação em processos cuja alimentação apresenta material particulado. Uma vez que o leito opera na forma expandida, não existe o bloqueio da coluna pelo material particulado em suspensão, e esses passarão preferencialmente pelos espaços vazios do leito. Dessa forma, reduz-se o número de etapas, reduzindo o custo e o tempo de processamento da biomolécula (Santos, 2001).

Dessa forma, a presente tese teve por objetivo avaliar a técnica de adsorção em leito expandido como uma alternativa para recuperar e purificar proteínas presentes no soro de queijo tipo “coalho”, utilizando processos que minimizem os danos aos seus componentes e que diminuam as etapas do processo, objetivando o aproveitamento dessas proteínas e a redução de seu custo total. Para isto, foram realizados estudos hidrodinâmicos, onde avaliou-se os parâmetros como expansão do leito, porosidade, distribuição do tempo de residência, além da avaliação do potencial de adsorção de três resinas disponíveis no mercado para adsorver as proteínas do soro em leito expandido.

Este trabalho está organizado da seguinte forma:

Capítulo 2: Apresenta o estado da arte. Nele efetua-se uma abordagem minuciosa sobre, principalmente, as proteínas do soro e a técnica de adsorção em leito expandido.

Capítulo 3: Nesse capítulo apresentam-se os materiais e métodos experimentais utilizados neste trabalho para obtenção das proteínas do soro isoladas.

Capítulo 4: Nesse capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento do trabalho.

Capítulo 5: Nesse capítulo são apresentadas as principais conclusões advindas do desenvolvimento do trabalho.

Capítulo 6: Apresenta as Referências Bibliográficas consultadas.

Capítulo 2

Estado da arte

2. Estado da arte

2.1- Soro de leite bovino

O soro de leite bovino é um produto resultante da precipitação de gorduras e caseínas do leite durante a fabricação de queijos. Este produto representa de 85 a 90% do volume de leite e retém 55% de seus nutrientes, dentre eles a lactose (4 a 5%) e proteínas (0,6 a 0,7%). O soro de leite pode representar um importante problema ambiental, com uma demanda bioquímica de oxigênio de 30.000 a 50.000 mg/L, caso seja destinado diretamente em rios ou esgotos públicos, o que atualmente não é permitido. A alta percentagem de água presente no soro de queijo inviabiliza economicamente sua desidratação, e o fato de ser perecível agrava o problema, impossibilitando seu armazenamento prolongado, dessa forma direcionando as pesquisas para o seu aproveitamento na produção de biogás, etanol e proteínas concentradas. Estudos realizados também sugerem o aproveitamento de soro de queijo para a produção de fermento de panificação e antibióticos (Almeida; Bonassi; Roça, 2001; Husseini; Shojaosadati; Towfighi, 2003).

A composição dos soros de leite bovinos não é sempre a mesma e altera-se devido à técnica de produção de queijo, à variações sazonais sendo dependente das espécies produtoras e da sua alimentação. Na Tabela 1, tem-se uma composição média de leite e do soro de leite bovino. O soro de leite bovino possui em sua composição 6,9% de sólidos totais, sendo 0,6% de sais minerais, 0,3% de gordura, 0,9% de proteínas, 5% de lactose e 0,1% de ácido láctico resultante da fermentação da Lactose (Richards, 2002).

TABELA 1- Composição típica do leite e do soro de leite

	Leite	Soro	Soro*
	g/100g	g/100g	(%)
Proteína	3,6	0,65 - 1,05	1,78
Gordura	3,7	0,05 - 0,63	1,05
Minerais	0,7	0,37 - 0,95	0,60
Lactose	4,9	4,5 - 5,3	4,20
Sólidos totais	12,9	6,2 - 7,3	----
pH	----	----	6,41
Acidez-Grau Dornic	----	----	17,00D

Fonte: Smithers *et al.*, 1996; Techninvest, 2000.

*Florentino (2006), Mesmo soro usado neste trabalho.

2.2- Proteínas do soro de leite bovino

Proteínas de soro de leite bovino são definidas como aquelas que permanecem retidas no soro do leite depois de coagulação da caseína, a 20°C e pH 4,6. O soro contém aproximadamente 20% das proteínas originais do leite. As duas principais proteínas são as β - lactoglobulinas e a α - lactalbumina, que perfazem de 70% a 80% das proteínas totais do soro (Sgarbieri, 2005). As sub-frações ou peptídeos secundários, assim denominados por se apresentarem em pequenas concentrações no soro de leite, são compostas por: glicomacropéptido, imunoglobulinas, albumina, lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, relaxina, lactofano, fatores de crescimento IGF – 1 e IGF – 2, proteoses-peptonas e aminoácidos livres (Haraguchi, Abreu, De Paula, 2006).

A FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization/Wold Health Organization*) restabeleceu em 1990 dois padrões de necessidades de aminoácidos essenciais: um para crianças com menos de 2 anos, que corresponde à composição do leite humano e, um outro padrão, para as idades seguintes, obtidos com base na taxa de oxidação de aminoácidos em

função dos níveis ingeridos. As proteínas do soro apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações nutricionais de consumo da FAO/WHO, exceto para os aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), tanto para crianças como para adultos (Sgarbieri, 2005; Torres, 2005).

Devido ao seu conteúdo em aminoácidos essenciais, o valor biológico das proteínas do soro é alto se comparado ao de outras proteínas. Além disso, as proteínas do soro contêm uma alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina). Segundo Ha e Zemel (2003), a abundância de leucina no soro é de particular interesse, uma vez que este aminoácido tem sido identificado como iniciador da síntese protéica muscular. Em razão do seu relativo excesso em aminoácidos essenciais (lisina, treonina, metionina e isoleucina) as proteínas do soro são suplementos efetivos para proteínas vegetais que são deficientes nestes aminoácidos (Walzen; Dillar; German, 2002; Ha e Zemel, 2003). As proteínas do soro têm um quociente de eficiência protéica (PER) de 3,4, superando o da caseína que é de 2,9, em razão do seu maior teor de aminoácidos sulfurados. Além disso, a α -lactoalbumina contém quantidades significativas de triptofano.

As proteínas do soro contêm várias seqüências de aminoácidos com propriedades bioativas, ou seja, sua hidrólise pode liberar peptídeos capazes de modular respostas fisiológicas no organismo animal. Muitos já foram isolados e caracterizados, tendo sido observadas atividades imunomoduladora, antimicrobiana e antiviral, antitumoral, antiúlcera, anti-hipertensiva, anticoagulante, opióide, ergogênica, antiolesterolêmica e fatores de crescimento celular (Gauthier e Pouliot, 2003; Sgarbieri, 2005; Pacheco *et al.*, 2005).

As proteínas do soro de leite são muito conhecidas pela versatilidade de suas propriedades funcionais, sendo utilizados na fabricação de bebidas lácteas, na produção de ricota e como coadjuvante tecnológico e/ou ingrediente nas indústrias de produtos cárneos, panificação e confeitaria (Wit, 1998; USDEC, 2002). Também têm destaque suas qualidades nutricionais e fisiológicas. A Tabela 2 ilustra algumas propriedades das principais proteínas do soro para a escolha da técnica de recuperação de proteínas. Nesta Tabela observa-se que algumas proteínas apresentam características muito semelhantes, o que dificulta o isolamento. Por exemplo, as proteínas β -lactoglobulina e α -lactoalbumina apresentam ponto isoelétrico e massa molecular bastante semelhante, o que dificulta sua observação, principalmente quando se usa a eletroforese para separar as bandas. Por isso, é comum se obter o concentrado protéico do soro de queijo, sendo mais difícil a obtenção das proteínas isoladas.

Tabela 2: Propriedade físico-química das proteínas do soro

Propriedade	β -Lg ^a	α -La ^b	SAB ^c	Ig ^d
Ponto isoelétrico	5,2	4,2 a 4,5	4,7 a 4,9	5,5 a 8,3
Concentração no soro, g/l	2-4	0,6 a 1,7	0,4	0,4 a 1,0
Concentração no soro, % (p/p)	50 a 60	18 a 24	6 a 12	6 a 12
Massa molecular, KDa	18,3	14	66	146
Resíduos por molécula	162	123	582	NA
Hidrofobicidade média kcal/resíduo	1075	1020	995	NA
Resíduos apolares por molécula	54	44	163	NA
Resíduo de Cis por molécula	5	8	35	NA
Resíduos dissulfetos por molécula	2	4	17	NA
Resíduo sulfidrilos por moléculas	1	0	1	NA
Resíduos de Lis por molécula	15	12	59	NA
Resíduo de Glu por molécula	16	8	59	NA
Resíduo de Asp por molécula	10	9	39	NA

Fonte: Morr e Há, 1993.

^a β -lactoglobulina; ^b α -lactoalbumina; ^csoro albumina bovina; ^dimunoglobulina.

NA – não analisado.

2.2.1- β -Lactoglobulina (β -Lg)

A β -lactoglobulina é a proteína mais abundante (aproximadamente 50% de todas as proteínas do soro e 10% do leite). Apresenta uma concentração média de 3,2 a 3,4 g/l, sendo uma proteína globular constituída de 162 resíduos de aminoácidos, massa molecular 18,3kDa. Desnatura-se a temperatura acima de 65°C e pH elevado, em torno de 9,6. A 70 °C sofre desnaturação irreversível e polimerização (S-S). Outra característica importante a ressaltar é que esta apresenta cinco resíduos de cisteína com duas ligações dissulfeto intermolecular ligando os resíduos 66 e 160, e os resíduos 106 e 119 ou 121, e um com o grupo SH livre no resíduo 119 ou 121. A conformação da molécula depende do pH (Antunes, 2003).

Apesar de se conhecer muito sobre a estrutura e a funcionalidade da β -Lg, pouco se conhece sobre sua funcionalidade (Sgarbieri, 2005). No entanto, pode-se afirmar que é um bom estabilizante de proteínas, usado para produção de balas e guloseimas (Zydney, 1998). Tem capacidade de ligar-se a compostos, por exemplo, ácido palmítico, tolueno, azul de bromo-fenol, ácido retinóico e o retinol. Tem um efeito protetor na destruição térmica do ácido ascórbico em solução aquosa (Daí-Dong; Novak; Hardy, 1990). Os peptídeos derivados da β -Lg podem influenciar fortemente o nível de colesterol sérico (Nagaoka; Kanamaru; Kuzuya, 1991). Estudo recentes tem mostrado que esta proteína tem capacidade de reduzir células tumorais - aumento da glutathione (Moreno, 2002; Fachel; Castro, 2004).

2.2.2- α -lactoalbumina (α -La)

Conforme Burrington (2002), a α -lactoalbumina é a segunda proteína mais abundante no soro, correspondendo a 20-25% das proteínas do soro e 2% do leite, numa concentração 1,0 a 1,5 g/l. É uma proteína globular, pequena e compacta, praticamente esférica, metaloproteína, com 123 resíduos de aminoácidos, sendo rica em lisina, leucina, treonina, triptofano e cisteína. Apresenta ponto isoelétrico na faixa de 4,2 a 4,5 e massa molecular de 14kDa. Tem uma estrutura altamente compacta com quatro ligações dissulfeto intramolecular. É a única proteína do soro capaz de ligar-se ao cálcio. Desnatura a 65,2°C em pH 6,7, entretanto 90% da desnaturação revertem-se com resfriamento.

A principal atividade biológica conhecida da α -La é como moduladora da síntese da lactose nas glândulas mamárias. É usada para prevenção de úlcera gástrica (Matsumoto *et al.*, 2001). Devido ao seu alto teor de triptofano, é uma substância ligada ao estresse. É utilizada na indústria de alimentação infantil e pode ser usado como agente contraceptivo e possui atividade potencial contra o câncer (Haraguchi; Abreu; De Paula, 2006).

2.2.3- Albumina do Soro Bovino (BSA)

A BSA corresponde aproximadamente a 12% das proteínas do soro com concentração de 0,1 a 0,4 g/l. O ponto isoelétrico está na faixa de 5,13 com massa molecular de 69 kDa, sendo constituída por 582 resíduos de aminoácidos com 17 ligações dissulfeto intramolecular e um grupo tiol livre no resíduo 34 de aminoácido. É uma proteína de transporte de ácidos graxos insolúveis do sistema circulatório sanguíneo (Tardioli *et al.*, 2003).

A BSA sofre desnaturação em pH acima de 9,0 e altas temperaturas. É mais compacta na região carboxi-terminal do que na região amino-terminal, diferenciando-se em hidrofobicidade, passante líquida e habilidade de formar ligações com ligantes. Tem como função biológica fornecer aminoácidos essenciais sendo utilizada como marcador em gel de eletroforese, possui aplicação terapêutica e também é utilizada na indústria de alimentos (Haraguchi; Abreu; De Paula, 2006).

2.2.4- Lactoferrina

A lactoferrina é uma glicoproteína com concentração bastante diluída no leite bovino (20 a 200 µg/l), compõe aproximadamente de 1 a 2% das proteínas do soro. Seu peso molecular é de 76kDa. Possui uma cadeia de 689 aminoácidos. Polimeriza rapidamente na presença de ions Ca^{++} e tem ação antimicrobiana (Tsuda *et al*, 2000; Serrano, 2006).

Entre as funções biológicas desta proteína está a capacidade de ligar-se a átomos de ferro (Recio & Visser, 2000; Sgarbieri, 2005). Em virtude desta habilidade, exerce destacada função antibacteriana e inibe a produção de toxinas por microrganismo. Por outro lado, promove o crescimento de bactérias, tais como Bifidus, regula a absorção e a biodisponibilidade de ferro, propicia efeito imunomodulador, juntamente com atividade contra vírus, câncer e trombose e, em nível intestinal, a lactoferrina exerce ainda função imunostimulatória e age como fator de crescimento e maturação dos enterócitos (Haraguchi; Abreu; De Paula, 2006).

2.2.5- Lactoperoxidases

A lactoperoxidase compõe aproximadamente 0,5% das proteínas do soro. Em termos estruturais, trata-se de uma cadeia polipeptídica de 612 aminoácidos com massa molecular de 89 kDa. Kussendrager e Van Hooijdonik (2000), na sua revisão sobre lactoperoxidase, realçam a aplicação desta proteína como um antimicrobiano natural em produtos alimentares e não alimentares. Estudos clínicos têm sustentado a possibilidade de que o acúmulo de placa dentária, gengivite e o início da cárie podem ser reduzidos por preparações apropriadas de lactoperoxidase, inclusive com algumas preparações protegidas por patente (Timmer, 2004).

2.3- Recuperação e purificação de biomoléculas

Em geral, as soluções contendo as biomoléculas a serem purificadas encontram-se misturadas às células, sais e a produtos gerados durante a fermentação. Portanto, necessitam de um tratamento que possibilite a separação destes materiais (muitas vezes indesejáveis), o que acaba elevando os custos da sua purificação, podendo representar 80% do custo total de produção (Spalding, 1991; Sadana & Beelaram, 1994). Os diferentes tipos de operações unitárias utilizadas durante a recuperação ou purificação de biomoléculas alvo são chamados de *downstream processes* e dele dependem a viabilidade econômica desse processo (Santos, 2001). Portanto, qualquer técnica que permita a redução das etapas do *downstream processing* deve ser vista com grande interesse, pois o emprego correto de processos de purificação torna-se essencial para que se atinja êxito na seleção da molécula alvo (substância ou espécie desejada). Dentro desse contexto existe interesse pela adsorção em leito expandido (ALE), devido, principalmente, à redução de etapas, pois é possível, em uma única etapa promover a captura, recuperação e a purificação da biomolécula, em soluções contendo ou não material particulado (Law; Leary; Pujar, 2007).

No caso específico das proteínas do soro de leite bovino, a literatura tem relatados diversos métodos que podem ser utilizado para separação e purificação destas proteínas. Dentre os métodos propostos, freqüentemente, tem-se reportado: precipitação, extração em duas fases aquosas, ultrafiltração, eletrodialise e a cromatografia, que envolve técnicas de troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade e filtração em gel. Para a separação/purificação das proteínas do soro, algumas dessas técnicas, devido ao seu alto custo, podem tornar-se inviáveis. Portanto, tem crescido o interesse por parte dos pesquisadores em estudar a técnica de adsorção em leito expandido, pois esta técnica elimina algumas etapas do processo, como filtração ou à centrifugação. Com isso, diminui custos, além de diminuir perdas de qualidade das proteínas e proporcionar um grau de pureza elevado (Santos, 2001).

2.3.1- Fator de recuperação e purificação de proteínas

A avaliação do desempenho de qualquer método de purificação de proteínas se baseia na recuperação e no fator de purificação dessa proteína em relação à solução inicial como a relação da concentração do material purificado (C) com a concentração do material

inicial (C_0), ou quaisquer etapas dentro do bioprocesso, tendo sempre uma etapa anterior como referência. Dessa forma, define-se:

A recuperação da proteína (RP) como a relação da concentração do material purificado (C) com a concentração do material não purificado (C_0), dada em porcentagem (Santos, 2001), conforme a Equação 1:

$$\text{Recuperação da proteína}(\%) = \frac{C}{C_0} * 100 \quad (1)$$

O fator de purificação (FP) é definido como a relação entre a atividade específica no material purificado (AP) com a atividade específica no material não purificado (ANP), no caso de enzimas, ou massa da biomolécula alvo em relação à massa prévia, ou seja, para enzimas têm-se, conforme a Equação 2:

$$\text{Fator de Purificação} = \frac{MP}{MPI} \quad (2)$$

Sendo MP a massa de proteína após uma determinada etapa de referência (ex. após a cromatografia de interação hidrofóbica) e MPI a massa inicial de proteína antes dessa etapa. No caso de uma determinada proteína do soro de leite, seria a massa dessa proteína após a cromatografia e a massa inicial dessa proteína do soro.

2.4- Adsorção em leito expandido (ALE)

2.4.1- Considerações iniciais

O uso da adsorção em leito expandido teve início no fim da década de 1940 e início da década de 1950, sendo empregados em muitas áreas de química industrial como, por exemplo, no tratamento de água residuárias, através do processo de adsorção por troca iônica, mas com poucas aplicações na biotecnologia (purificação de proteínas em particular). Barthels *et al.* (1958) descreveu o uso da adsorção em leito expandido para a purificação de streptomina em uma resina de troca-catiônica, mas devido ao fato de haver grandes flutuações na viscosidade do caldo não foi possível utilizar a coluna sem exceder a velocidade terminal das partículas da resina (Thelen & Ramirez, 1997). Segundo Gopal; Prince; Hearn (1993), a partir da década de sessenta, houve tentativa de utilização da técnica em processos

biotecnológicos, sem muito sucesso, pois houve limitação devido às propriedades físicas, com pequena diferença de densidade entre a partícula sólida empregada como adsorvente e o líquido, e a complexidade inerente aos fluidos usados em processos biotecnológicos.

Apesar dos problemas apresentados, no início da década de 1990 houve um crescente interesse de pesquisadores na aplicação da técnica de adsorção em leito expandido para recuperar e purificar proteínas de soluções contendo ou não material particulado (Chase & Draeger, 1992; Chang *et al.*, 1993; Frej; Hjorth; Hammarström, 1994; Batt; Yabannavar; Singh, 1995; Pessoa *et al.*, 1996; Owen & Chase, 1997; Clemmitt; Bruce; Chase, 1998; Lihme *et al.*, 1998; Mattiasson & Nandakumar, 1998; Fernandez-Lahore *et al.*, 2000; Palsson; Axelsson; Larsson, 2001; Cabanne *et al.*, 2004; Hidayat; Takagi; Yoshida, 2004; Kalil; Maugeri-Filho; Rodrigues, 2005; De Lamotte, 2005). O processo continuou sendo utilizado devido ao interesse por parte da indústria de bioprocessos em diminuir o número de operações unitárias usadas nas etapas de purificação, principalmente a centrifugação e a filtração, uma vez que as biomoléculas geralmente são sintetizadas em meios líquidos que contém partículas sólidas em suspensão (células e/ou fragmentos de células), ou recuperadas de meios complexos como é o caso do soro do leite, por ser esse um fluido que provoca a comaltagem em leitos fixos, segundo Bascoul *et al* (1993), Carrere (1993) e James (1994).

Assim, a principal vantagem na utilização da adsorção em leito expandido, sobre a técnica cromatográfica tradicional em leito fixo, é que a coluna pode ser alimentada com solução contendo células ou resíduos celulares em suspensão sem a necessidade de remoção prévia das mesmas, reduzindo o número de etapas no processo e evitando a perda da atividade da biomolécula alvo devido à ação de proteases presentes, ácidos nucleicos, etc, e conseqüentemente, haverá redução dos custos na produção (Santos, 2001).

Apesar das vantagens na utilização do leito expandido em detrimento ao leito fixo, alguns problemas persistem, tais como: quando se utiliza adsorventes convencionais utilizados em leito fixo, provoca-se elevada mistura entre o líquido e o adsorvente gerando uma dispersão axial elevada, onde a existência de apenas um estágio de equilíbrio compromete a eficiência do processo de separação por adsorção. Como alternativa, foram estudados tipos de colunas e adsorventes. Chase e Draeger (1992) desenvolveram uma coluna cromatográfica provida de um distribuidor de fluxo que permite uma fluidização estável do leito com escoamento tubular mesmo utilizando adsorvente a base de agarose convencionalmente utilizados em leito fixo. Essa fluidização só era conseguida quando baixas velocidades eram utilizadas, provocando baixa produtividade no processo de purificação de

biomoléculas a partir de meios complexos. Estes pesquisadores perceberam a necessidade de se desenvolver adsorventes capazes de exibir características físicas e absorptivas desejáveis e que obtivesse alta velocidade de sedimentação.

Existem no mercado novos tipos de adsorventes e colunas especialmente produzidos para processos cromatográficos com adsorção em leito expandido. A Pharmacia Biotech lançou em 1993 a linha “STREAMLINE”, que são partículas adsorventes, com alta velocidade 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 (Voute & Boschetti, 1999; Theodossiou; Thomas; Timothy, 2002).

Portanto, o princípio da adsorção em leito expandido baseia-se na fluidização. Desta forma, partindo de um leito fixo e aumentando a vazão do fluido, atinge-se uma velocidade na qual a força de arraste iguala-se ao peso das partículas, ou seja, a força de arraste iguala-se a 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. Esta técnica opera em condições “suaves” de fluidização, ocasionada pela segregação das partículas adsorventes e caracterizada por um baixo Reynolds da partícula (R_{ep}) da ordem de 0,5 – 1,0, aumentando então a eficiência da ligação adsorvente-proteína (Santos, 2001). A Figura 1 mostra os passos do processo de adsorção em leito expandido.

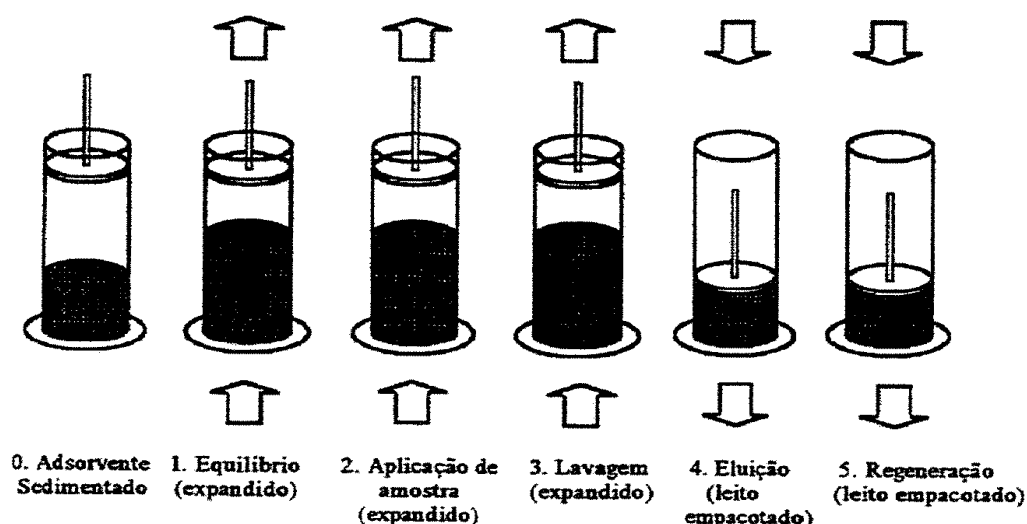


Figura 01: Esquema dos passos na adsorção em leito expandido, onde as colunas mostram os diferentes estágios de operação do sistema. As setas indicam a direção do escoamento (Pharmacia Biotech).

O modo de operação em leito expandido difere um pouco dos processos cromatográficos convencionais, uma vez que se opera com uma maior porosidade do leito, da ordem de 0,7 a 0,8, quando comparado com os processos de leito fixo cujos valores típicos de porosidade do leito (ϵ) são de aproximadamente 0,4.

Na adsorção em leito expandido, o equilíbrio entre o sistema tamponante e o adsorvente é realizado com fluxo ascendente e com leito na forma expandida. No equilíbrio, o volume de fluido aplicado ao leito é geralmente cinco vezes o volume do leito empacotado do adsorvente. Nesta etapa, o pistão é posicionado na parte superior da coluna, permitindo, assim a expansão do leito.

Após o equilíbrio, segue-se a etapa de aplicação do material contendo células, restos celulares e/ou material particulado. Essa etapa também é realizada com fluxo ascendente e com o leito na forma expandida, ou seja, com maior porosidade do leito. Como as propriedades físicas do material aplicado são diferentes do tampão de equilíbrio, particularmente uma maior viscosidade, o leito expandirá se a velocidade linear não diminuir. Sabendo que o material particulado possui uma velocidade de sedimentação muito menor que do adsorvente, o material particulado deixa a coluna, onde as moléculas alvo são retidas por interação com o adsorvente.

Depois, segue-se a etapa de lavagem, sendo necessária para remover o material particulado e proteínas fracamente adsorvidas. Esta etapa também é realizada com fluxo ascendente e com o leito na forma expandida. Em seguida, a eluição é realizada em modo sedimentado. 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 fluxo é invertido e a eluição é realizada com o sentido do fluxo descendente com o leito fixo. Alguns componentes podem continuar ligados devido às condições de lavagem e eluição escolhidas. Devido à remoção de componentes indesejáveis seguir um declínio exponencial, passa-se por um processo chamado de “*cleaning-in-place*”, com soluções, tais como 1 M NaOH e 2 M NaCl, em baixa velocidade superficial, para que haja descontaminação e regeneração do adsorvente (Amersham Pharmacia Biotech, 2008a).

Conforme exposto por Chang *et al.* (1993), a seqüência de eventos na operação de um leito fixo e de um processo de purificação utilizando leito expandido é similar. Primeiramente, há estágio de contato entre o adsorvente e o adsorbato. Se isto ocorre em um leito expandido, é importante determinar as características de expansão do leito: como a altura

do leito varia com a vazão do líquido de entrada e como esta expansão é afetada quando as soluções contendo particulados são usadas. Em segundo lugar, existe o questionamento se o processo de adsorção difere quando ocorre em um leito expandido. Este aspecto é convenientemente abordado determinando-se a curva de ruptura. Num terceiro momento, verifica-se como o processo de adsorção ocorre na presença de células.

2.4.2.- Hidrodinâmica

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 a presença de células.

Ao se utilizar leito expandido, como em qualquer outro estudo de fluidodinâmica, deve-se atentar para a sedimentação e a fluidização do material particulado para que se possam obter as condições ideais de operação do leito expandido. Uma das formas de conhecer o comportamento de um leito em função das propriedades físicas das partículas e do fluido é através da correlação de Richardson e Zaki, que em 1954, estudaram a sedimentação e fluidização de vidro, divinil-benzeno e balas de chumbo usando soluções de cloreto de sódio, cresol e glicerol e chegaram à equação que relacionava a velocidade do fluido (U) e a velocidade terminal da partícula (U_t) com a porosidade do meio (ϵ), descrita por:

$$\frac{U}{U_t} = \epsilon^n \quad (3)$$

Em que “ n ” é o índice de Richardson-Zaki ou índice de expansão, sendo uma função do número de Reynolds terminal (Re_t), conforme Equação 4.

$$Re_t = \frac{d_p \rho_L U_t}{\mu} \quad (4)$$

Para o regime de Stokes, onde $Re_p < 0,1$, a velocidade terminal de uma partícula isolada (U_T) é dada por:

$$U_t = \frac{g \cdot d_p^2 \rho (\rho - \rho)}{18\mu} \quad (5)$$

Sendo Re_p dado por:

$$\text{Re}_t = \frac{d_p \rho_L U}{\mu} \quad (6)$$

O grau de expansão é um número adimensional que relaciona a altura do leito após a expansão (H) com a altura do leito fixo de adsorventes (H_o) para uma determinada velocidade linear do fluido (Equação 7). Este é sem dúvida o método mais prático e mais utilizado na caracterização dos leitos expandidos (Pessoa Junior e Kilikian, 2005; Santos, 2001):

$$\text{Grau de expansão} = \frac{\text{Altura do leito expandido}}{\text{Altura do leito fixo}} = \frac{H}{H_o} \quad (7)$$

A relação entre a porosidade do leito e o grau de expansão é dada por:

$$\varepsilon = 1 - (1 - \varepsilon_o) \frac{H_o}{H} \quad (8)$$

Sendo ε a porosidade do leito, ε_o a porosidade inicial do leito (assumida ser 0,4), H a altura do leito expandido e H_o a altura inicial do leito.

Para avaliar a viabilidade técnica da ALE para um determinado processo de recuperação pode-se usar de um método simples de quantificação das limitações das potencialidades hidrodinâmicas que podem surgir através da interação da biomassa com o adsorvente. O procedimento é baseado no estudo do desempenho da distribuição do tempo de residência (DTR) durante o emprego do licor de processo bruto o qual fornece uma percepção da situação hidrodinâmica antes das condições reais de processamento.

A análise de distribuição do tempo de residência (DTR) é uma técnica de grande importância no estudo da hidrodinâmica em sistemas fluidizados, pois este leva ao conhecimento do comportamento do mesmo, para saber se este se encontra em regime empistonado “*plug flow*”, de mistura perfeita “*back mixing*”, ou intermediária. Além disso, o regime é de grande importância na influência do comportamento cinético de adsorção e levam a uma avaliação da possibilidade de aplicação do leito na recuperação das moléculas alvo.

A medida das DTRs em ALE, entretanto, é complicada devido à presença de material biológico particulado que impedem o uso do traçadores que absorvem na região do visível, tal como a acetona. As interferências surgidas pelas partículas contidas no licor de processo requerem a identificação (localização) das substâncias que: (1) não interajam entre ambas as substâncias da matriz cromatográfica e a do licor de processo, e (2) que sejam de

fácil detecção entre as partículas originárias da suspensão biológica de proteínas (ex: cultura em caldo). Em recente estudo foi descrito com sucesso o uso da fluorescência molecular na recuperação do triptofano como reguladora destas restrições. Contudo o nível máximo de detecção compatível com o método foi de 7 a 8 % de biomassa em peso úmido. No entanto, a biomassa contida em soluções estoque para processamento industrial é frequentemente superior a este valor, o que leva a necessidade de aplicação de sensores ópticos (Fernández-Lahore *et al.*, 2001).

A DTR é comumente obtida a partir de técnicas de estímulo e resposta, como as de pulso e frontal. A DTR é normalmente caracterizada de números adimensionais como o Peclet (Pe) ou de Bodenstein (Bo) representado pela Equação 9. A partir da técnica de pulso com sinal negativo e da comparação das variâncias de modelos de dispersão axial em tanques em série, encontra-se os valores do coeficiente de dispersão axial (D_{axial}) e o número de pratos teóricos (N), conforme as Equações 9 e 10:

$$Pe = \frac{H.U}{D_{axial}} \quad (9)$$

$$N = \frac{U.H}{2.\varepsilon.D_{axial}} \quad (10)$$

A Figura 2 ilustra a determinação do tempo de residência pela técnica frontal. Esta curva é obtida pela passagem do traçador na coluna cromatográfica. Os passos seguintes são usados nesta determinação:

- 1) O leito cromatográfico é fixado em uma determinada altura e velocidade linear;
- 2) Alimenta-se a coluna com a solução contendo o traçador e aciona-se o cronômetro;
- 3) Mede-se a absorvância gerada pelo traçador na saída da coluna até que a absorvância retorne ao seu valor mínimo;
- 4) Monta-se a curva gerada pela absorvância em função do tempo de corrida, obtendo-se assim um gráfico semelhante à Figura 2.

A partir destes dados define-se:

- a) O tempo de residência médio (t), como sendo a distância no papel entre a leitura do tempo inicial até que este alcance a metade desta leitura (50% de absorvância);
- b) O desvio padrão (σ) que é tido como sendo a metade da distância entre os pontos de leitura 15,88 e 84,15%.
- c) E com estes obtêm-se o número de pratos teóricos pela Equação 10 (Fernandez-Lahore *et al.*, 2001; Santos, 2001).

$$N = \frac{t^2}{\sigma^2} \quad (11)$$

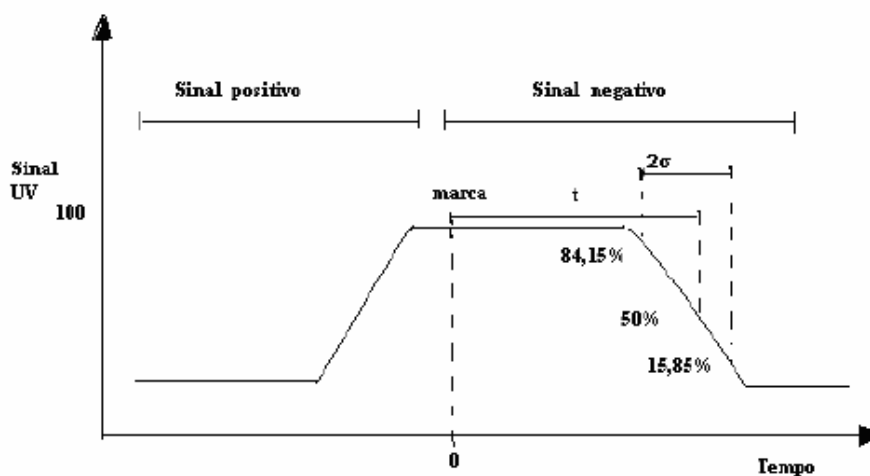


Figura 2: Pulso em degrau para determinação do tempo de residência

2.4.3- Troca Iônica

Nesta mesma linha de resinas STREAMLINE, existem as resinas de troca iônica, que se baseiam na distribuição de carga das proteínas. As proteínas são adsorvidas nas resinas trocadoras de íons por ligação eletrostática entre passantes opostas da superfície da proteína e o grupo carregado do adsorvente. As passantes são balanceadas por contra-íons, tais como, íons cloreto, íons metálicos ou outros íons existentes na solução tampão. A molécula de proteína desloca os contra-íons que se situam nos poros e interage com o adsorvente. Como resultado global, a região do adsorvente torna-se eletricamente neutra e o saldo de passante da proteína será de mesmo sinal que os contra-íons deslocados, resultando a designação de “troca de íons” para o mecanismo de adsorção. Portanto, o princípio básico da cromatografia de troca-iônica baseia-se na competição entre íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da fase estacionária. As moléculas de proteína têm em sua superfície grupamentos com passantes positivas e negativas. As passantes positivas são oriundas, sobretudo, dos aminoácidos histidina, lisina, arginina e das aminas terminais, e as passantes negativas são devidas ao ácido aspártico e glutâmico e aos grupamentos carboxílicos terminais (Pessoa & Kilikian, 2005).

De outra forma, pode-se dizer que é um processo na qual a solução contendo o composto desejado passa através de uma coluna de troca iônica, cuja proteína ficará ligada à

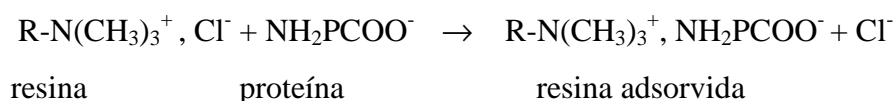
resina através de forças eletrostáticas. A coluna é, então, lavada com um tampão de maior força iônica, liberando primeiro as proteínas fracamente ligadas, seguido da liberação das moléculas firmemente ligadas, o que permite separá-las. As frações obtidas por lavagem são então coletadas em pequenas frações sob diferentes condições (Bailey e Ollis, 1986).

Como a superfície das proteínas pode ter passantes positivas ou negativas, estas resinas se subdividem em aniônica e catiônica. A primeira possui ligantes carregados positivamente, destacando-se entre elas o dietilaminoetil (DEAE), aminoquaternário (Q), aminoetilquaternário (QAE). Na segunda, os ligantes estão carregados negativamente e entre eles, tem-se o carboximetileno (CM), metilsulfonato (S), propilsulfonato (SP). As proteínas, como regra geral, ficam carregadas positivamente a valores de pH baixos porque os resíduos dos aminoácidos estão protonados e, pelo contrário, a valores de pH elevados apresentam em geral uma passante superficial líquida negativa. O valor de pH na qual o somatório de passantes se anula é chamado de ponto isoelétrico (pI) (Carrère, 1993).

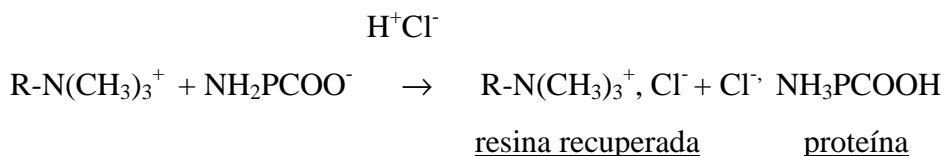
O trocador iônico consiste de um sólido macroporoso que possui, ligados na superfície, grupos funcionais com passantes. Esses grupos podem se associar a contra-íons, e os contra-íons podem ser reversivelmente trocados por outros íons de mesma passante sem alterações do adsorvente (Kawasaki, 1991). Os trocadores de íons podem ser classificados como catiônicos ou aniônicos, conforme permuta dos íons com os contra-íons. Os catiônicos possuem contra-íons positivos (+) e nos aniônicos os contra-íons são negativos (-).

Assim, a capacidade dessas resinas depende da concentração dos grupos iônicos e da porosidade do suporte, verificando-se exclusão molecular ou uma difusão dificultada das proteínas nos poros de pequeno diâmetro. A capacidade típica de adsorção de proteínas para esses adsorventes é da ordem de 100 mg proteínas/mL de gel, sendo também afetada por fatores externos, como o valor de pH e concentração de sal do tampão. Em consequência, para uma proteína específica, as condições de ligação e a capacidade do gel têm que ser determinadas experimentalmente (Fonseca, 1995).

Como exemplo, toma-se um caso de troca de ânions onde uma proteína carregada negativamente é adsorvida em uma resina que possui o grupamento amino quaternário e íons cloreto:



Essa etapa é denominada também de fixação de proteína. A dessorção (ou eluição) da proteína é obtida numa etapa suplementar através da modificação do pH ou da força iônica inferior ao pI da proteína, com adição, por exemplo, de um ácido como HCl:



Um exemplo típico de sistema de adsorção que utiliza esse princípio foi reportado por Carrère (1993) usando a resina Spherosil QMA para concentrar as proteínas lacto albumina e lacto globulina a partir do soro de queijo. Esta eluição também poderia ser feita com aumento da força iônica do meio, com a adição de sal, por exemplo, o cloreto de sódio.

As condições experimentais que afetam a capacidade de purificação em cromatografia de troca iônica são: pH, força iônica do tampão, a natureza do íon-oposto, a taxa de fluxo e a temperatura (Amersham Pharmacia Biotech, 2008b).

2.4.3.1- Aplicação da ALE utilizando Troca Iônica

A cromatografia de troca iônica é empregada por um grande número de processos de recuperação e purificação de proteínas, principalmente pelo fato dos adsorventes serem versáteis, apresentarem custos relativamente baixos e poderem ser regenerados por vários ciclos de adsorção e eluição (Collins & Braga, 1990).

Pessoa *et al.* (1996) estudaram a purificação de inulinase, obtida pela fermentação de *Cândida kefir*, em leite expandido. A faixa de pH entre 6,5 e 7,0, foi favorável para a adsorção da enzima usando uma resina fracamente aniônica (Streamline DEAE). Para a resina fortemente catiônica (Streamline SP), o pH apropriado foi 4,0. Obtiveram uma recuperação de 93% e um fator de purificação de 5,8. A capacidade dinâmica foi 62% do valor da máxima capacidade de adsorção.

Cruz (1997) determinou as isotermas de adsorção utilizando experimentos em tanques agitados e em coluna de adsorção (leito fixo e leito expandido), bem como as curvas cinéticas e de ruptura para diversas concentrações de insulina utilizando resina Accel Plus QMA como adsorvente. Foi feito um estudo do efeito do pH da solução tamponante na

adsorção da insulina, observando-se que a máxima adsorção ocorre no pH 8,0. Foram comparadas curvas de ruptura para leitos fixos e fluidizados bem como determinadas as concentrações do produto após a lavagem e eluição com solução de cloreto de sódio. Verificou-se que o processo de adsorção e eluição conduzem a fatores de enriquecimento da ordem de 50 com rendimento de 80% na recuperação da biomolécula.

Kalil; S.J.; Maugeri-Filho, F.; Rodrigues, M. I. (2005) estudaram a purificação da inulinase diretamente do caldo bruto obtido por *Kluyveromyces marxianus var. Balgaricus* ARCC 16045, em leito expandido utilizando a resina Streamline SP e obteve uma recuperação de 74% e um fator de purificação de 10,4 vezes; resultados obtidos operando-se com fator de expansão de 2,0, alimentação a pH 3,5, lavagem a pH 4,1 e para a eluição tipo degrau, com velocidade de 100 cm/h e pH de 4,1.

Foram estudadas, em um trabalho desenvolvido por Yemiko (2005), dez linhagens de *Kluyveromyces* para a produção de inulinase, sendo que a linhagem *K. Marxianus* NRRL Y-7571 foi selecionada como melhor produtora de inulinase. O meio de cultivo industrial para produção de inulinase por esta linhagem, foi composto por 90 g/L de melaço de cana, 45 g/L de água de maceração de milho e 4 g/L de extrato de levedura, foi otimizado pela metodologia do planejamento experimental e análise de superfície de resposta como ferramenta, atingindo uma produção em atividade enzimática em torno de 800 U/mL.

Neste mesmo trabalho, foram realizadas etapas de purificação da inulinase (adsorção e eluição) em coluna de leito expandido utilizando-se resina aniônica Streamline DEAE. Também foram otimizadas através de um planejamento experimental e análise de superfície para a melhor adsorção, e obtenção do maior fator de purificação e recuperação. A melhor condição de adsorção foi com o tampão fosfato 0,02 M, pH 6,5 e fator de expansão 2,0. A capacidade de adsorção obtida de 22.627 U/mL em coluna de leito expandido é muito superior à capacidade máxima de adsorção (Q_m) de 1.428 U/mL, obtido em testes de batelada. Na dessorção da enzima, foram otimizados os valores de pH e o volume necessário para o gradiente salino de NaCl passar de 0 para 1 M durante a eluição. Através do planejamento experimental definiram-se pH na faixa de 5,0 a 5,5 e o volume do gradiente salino na faixa de 650 a 1.000 mL, resultando uma recuperação de praticamente 100% da enzima alimentada na coluna e um fator de purificação de 24 vezes.

Santana (2006) estudou a recuperação das enzimas α e β -amilases produzidas a partir das sementes de milho (*Zea mays*) em sistemas de adsorção em leito expandido (ALE). Portanto, foram feitas otimizações das etapas de produção do malte de milho, desde o

processo de germinação (variando tempo) até a secagem (variando o tempo e a temperatura), para obter este produto com boa atividade enzimática. A caracterização hidrodinâmica da coluna de ALE foi feita para avaliar os efeitos dos tampões fosfato (a 22°C) e Tris/HCl, com ou sem malte de milho, sobre a fluidização do leito contendo a resina de troca iônica Amberlite IRA 410. Durante a recuperação das enzimas, usou-se como fatores a altura do leito fixo (4 cm) e expandido (8,12, 16 cm), o pH (5, 6 e 7), e o tipo de tampão (fosfato ou Tris/HCl ambos a 0,05M), em condições constantes de eluição (NaCl 0,25M a 14mL/min). Os resultados mostraram que, para se obter um malte com maior atividade enzimática, deve-se parar a germinação das sementes no quarto dia e secá-las a 54°C por 5-6 h. A equação de Richardson-Zaki se ajustou à fluidização das resinas sobre o efeito dos fatores estudados, e o estudo de hidrodinâmica mostrou que o número de pratos teóricos (N), a dispersão axial (D_{axial}) e o número de Peclet (Pe) aumentaram com a elevação da altura e da porosidade do leito. O tampão fosfato aumentou a afinidade entre a resina e as enzimas, enquanto que o tampão Tris/HCl não promoveu adsorção das mesmas. A recuperação das amilases em leito expandido foi melhor que em leito fixo e aumentou usando 8 cm (grau de expansão dois) a pH 7. O fator de purificação foi de 500 vezes a atividade inicial, provavelmente por redução de impureza. Desta forma, este trabalho contribuiu para a obtenção de condições ótimas para se produzir as α e β -amilases a partir das sementes de milho (*Zea mays*), com alto potencial enzimático e boa aceitação comercial, podendo agregar valor à cultura do milho.

Severo Junior *et al* (2007), compararam α -amilase de *A. niger* (FORILASE NTL®) cristalizada e purificada por adsorção em leito expandido (ALE). Usou-se no primeiro passo de purificação uma coluna de cromatografia com 1 x 30 cm de dimensões e resina de troca iônica Amberlite IRA 410 como adsorvente. Um volume de 5 mL de uma solução estoque de α -amilase do tipo FORILASE NTL® misturada com BSA foi injetado no leito expandido de 4 cm para 8 cm de altura. Uma solução de NaCl a 0,5 M foi usada na eluição. O eluído foi caracterizado bioquimicamente e, depois, cristalizado por difusão de vapor em gota por um mês. A enzima cristalizada também foi caracterizada bioquimicamente. Os resultados mostraram que a atividade foi completamente recuperada pela purificação por ALE e que houve redução de atividade da enzima após a cristalização. A enzima apresentou um peso molecular de 116 kDa. Percebeu-se que as faixas de pHs ótimos das enzimas cristalizada e purificada foram de 5,5-7,5 e de 6,5-7,5, respectivamente, mas a temperatura ótima da enzima purificada por ALE foi de 80 °C e da enzima cristalizada foi de 50 °C. A enzima cristalizada apresentou valores de atividade relativa acima dos 80% para todas as temperaturas estudadas.

As energias de ativação da reação de hidrólise de amido e as constantes K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a enzima purificada e cristalizada foram 32 kJ/mol, 0,148 g/L de amido e 6,78 mol/min.mL, 28 kJ/mol, 0,2527 g/L de amido e 0,2484 mol/L.min, respectivamente. Este trabalho mostrou que é possível a obtenção de α -amilase do tipo FORILASE NTL® purificada por ALE com resinas de troca iônica e cristalização, e que estas duas formas apresentam diferenças bioquímicas e de conservação que levam a aplicações industriais distintas, processos em batelada e contínuos, respectivamente.

Com o objetivo de estudar a adsorção da bromelina foi desenvolvido um trabalho por Campos (2007), onde se estudou os parâmetros cinéticos de adsorção, a altura do leito e a velocidade linear bem como a caracterização da bromelina. Foi observado que a atividade enzimática da bromelina aumentou com o aumento da temperatura e com a proximidade do pH neutro. Também foi observado que o aumento de temperatura acima de 65 °C causa uma leve diminuição nos níveis enzimáticos. Após 150 minutos, a bromelina reteve por volta de 50% da atividade inicial. A capacidade máxima de adsorção foi determinada pela isoterma de adsorção de Langmuir, onde os valores estimados para Q_m e k_d foram 9,18 U/mL e 0,59 U/mL, respectivamente. O tempo de residência foi reduzido 10 vezes com um incremento no grau de expansão de apenas 2,5 vezes, contudo o número de pratos (N) foi reduzido apenas 2 vezes. O fator de purificação da bromelina foi próximo de 13 vezes. ALE mostrou ser ótima para a purificação de bromelina, e a enzima eluída foi purificada em nível de SDS-PAGE.

Sousa (2008) estudou as condições de separação de duas frações protéicas presentes na clara do ovo, uma rica em ovalbumina e outra contendo lisozima e conalbumina, utilizando resina de troca catiônica Streamline SP. Os resultados mostraram que foi possível obter duas frações protéicas da clara do ovo. Na primeira fração foi possível recuperar em torno de 95% de ovalbumina. A segunda fração apresentou um rendimento semelhante para a lisozima e para a conalbumina, sendo necessário um próximo processo de separação para estas duas proteínas

Outra importante forma de aplicação da técnica de ALE empregando troca iônica é para recuperar e purificar proteínas presente no soro de leite bovino, principalmente as proteínas α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, lactoperoxidase, lactoferrina. Dentre os trabalhos pode-se destacar o de Carrere (1993), Veredas (2000), Nóbrega *et al* (2000), Chagas; Macedo e Santos (2006) e El-Sayed e Chase (2010).

Com o objetivo de se isolar e caracterizar o Glicomacropéptido (GMP) presente em soro de leite, Tullio (2007) utilizou dois métodos: ultrafiltração em membrana de 50 e 30

kDa e cromatografia de troca-iônica. O perfil eletroforético qualitativo mostrou três bandas distintas semelhantes à GMP comercial. O rendimento do processo foi de 66,33% se considerado o valor máximo de GPM por litro de soro (1,5g) e 79,17% se considerado o nível mais baixo reportado na literatura (1,2g), com a obtenção de 0,95g de GMP por litro de soro de leite. A fração obtida por cromatografia de troca iônica apresentou concentração de ácido siático de 113,50µg/mg da fração obtida. O perfil eletroforético qualitativo apresentou 3 bandas distintas, porém localizados em alturas diferentes quando comparado ao perfil eletroforético do GMP comercial. O rendimento do processo foi de 92,67% com a obtenção de 1,39g de GMP por litro de soro de leite.

2.4.4- Interação hidrofóbica

Na busca de se encontrar novos suportes para a utilização da cromatografia utilizando adsorção em leito expandido, pesquisadores têm estudado e explorado características hidrofóbicas das biomoléculas e o potencial da cromatografia de interação hidrofóbica para separá-las e purificá-las, principalmente em meios complexos (Lindhal & Vogel, 1984; Noppe *et al.*, 2000; Veredas; 2000; Queiroz; Tomaz; Cabral, 2001; Oliveira, 2003; Bonomo, 2005).

O princípio da cromatografia de interação hidrofóbica baseia-se no ganho entrópico do sistema protéico, devido à remoção da água estruturada nos domínios hidrofóbicos presentes na estrutura da proteína e adicionalmente pelo aumento da força iônica no meio, através do efeito da adição de sal neutro, por exemplo, o sulfato de amônio, que apresenta íons do tipo “*salting-out*”. Isto faz com que a proteína sofra a influência dos íons do meio sobre sua estrutura protéica, alterando sua solubilidade, devido à exposição dos grupos apolares existentes em sua cadeia de aminoácidos. Estes grupos apolares normalmente ficam na parte interna da estruturas das proteínas quando em meio aquoso (Pharmacia Biotech, 1993; Arruda, 1999).

A hidrofobicidade das proteínas está baseada na hidrofobicidade dos aminoácidos. Os aminoácidos hidrofóbicos têm a tendência de se concentrarem na superfície interna das proteínas globulares e os hidrofílicos na superfície externa. Dessa forma, ainda sobre a cromatografia de interação hidrofóbica, dois fatores podem afetar o processo, são eles: as características da fase estacionária e da fase móvel. Com relação à fase estacionária as mesmas diferem entre si principalmente pela natureza dos ligantes imobilizados na matriz

sólida. Os ligantes mais usados na cromatografia de interação hidrofóbica são os alcanos de cadeia linear com ou sem o grupo amino terminal. Segundo Queiroz; Tomaz; Cabral (2001) o fenil e outros compostos aromáticos são também usados como ligantes, apresentando bons resultados devido à mistura de interações hidrofóbicas π - π . A fase móvel deve ter características tais como tipo e concentração de sal, pH e temperatura que favoreçam a interação da proteína, presente na fase líquida, com o adsorvente. No caso da adsorção da α -lactalbumina, advinda do leite bovino, em resinas hidrofóbicas é indispensável à presença de um agente quelante na fase móvel (tampão de adsorção) uma vez que na presença do íon Ca^{2+} (íon abundante no soro e no leite bovino) essa proteína apresenta-se na forma hidrolítica (Noppe, *et al*, 2000).

2.4.2.1- Aplicação da ALE utilizando Interação Hidrofóbica

Existe na literatura uma grande quantidade de materiais que pode ser processado a partir da adsorção em leite expandido como, por exemplo, homogeneizados de bactéria recombinante (Frej, Hjorth, Hammarström, 1994; Hansson *et al.*, 1994), corpos de inclusão (Frej *et al.*, 1997), purificação de anticorpos monoclonais (Thömmes *et al.*, 1995; Thömmes *et al.*, 1996), caldos de fermentação não clarificados de bactérias e leveduras (Chang & Chase, 1996; McCreath *et al.*, 1995; Pinotti, 2003, Makino, 2005), na extração de proteínas do leite (Noppe; Hanssens; De Cuyper, 1996) e extrato de tecido animal (Silva, 2004).

Com o objetivo de propor a melhor metodologia de purificação de lípase de *Rhizopus* sp., Koblitz e Pastore (2004), testaram dois diferentes métodos cromatográficos (troca iônica e interação hidrofóbica) e, ainda, verificar o melhor planejamento estatístico para caracterização bioquímica da mesma. Foi possível purificar parcialmente a lípase de *Rhizopus* sp. com o uso de coluna de DEAE *Sepharose* (troca aniônica) e de FENIL *Sepharose* (interação hidrofóbica). A primeira, embora mais seletiva para a enzima em questão, parece provocar redução de sua atividade. A presença de maiores concentrações de íons Na^+ na fração purificada por FENIL *Sepharose* parece contribuir para o aumento de atividade da lipase. Embora os resultados obtidos por análise multivariável para determinação das características bioquímicas da lípase sejam compatíveis com a análise univariável, aquele planejamento não foi considerado indicado no presente caso.

Maldonado (2006) analisou as etapas de pré-fermentação (clarificação dos meios de fermentação e padronização das condições de cultivo de inóculo), fermentação (seleção e

otimização da composição dos meios de fermentação), ampliação de escala (estudo da produção da enzima em reator de mistura e em reator *airlift*), purificação da enzima (por cromatografia de interação hidrofóbica) e caracterização parcial das enzimas brutas e purificadas obtidas a partir de *Geotrichum candidum* NRRL Y-552. De um modo geral, o trabalho mostrou que é viável a produção de lipase a partir resíduos industriais em substituição a componentes convencionais de meio de cultura (como peptona e extrato de levedura). Três meios de fermentação foram otimizados para a produção da lipase quanto a sua composição (meio 1: 3,5% de hidrolisado de levedura e 0,7% de óleo de soja; meio 2: 8,0% de água de maceração de milho e 0,6% de óleo de soja e meio 3: 12,0% de água de maceração de milho clarificada e 0,6% de óleo de soja). Foram obtidas atividades enzimáticas máxima de 20,0 U/mL em frascos agitados e 24,0 U/mL em reator do tipo *airlift*, valores bem superiores aos citados na literatura. Por sua vez, o estudo conjunto da clarificação dos meios de fermentação e de purificação da enzima permitiu associar a viabilidade do processo de purificação com a redução de custos proporcionada pela utilização de resíduos indústrias como fonte de nitrogênio. Por fim, a utilização de um reator não convencional (*airlift*) proporcionou a obtenção de níveis mais altos de atividade enzimática, uma vez que provoca menos danos ao desenvolvimento do micélio celular. Todos esses fatores associados indicam serem promissoras as possibilidades de utilização deste tipo de processo para fins industriais.

Sierra (2007) estudou o processo de adsorção da proteína glicomacropéptido (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 de estudo de GMP na adsorção da resina hidrofóbica foi possível observar que este processo é dependente da concentração de sal e 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, conseqüentemente, o 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 de 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.

2.4.5- Uso de ALE para recuperação e purificação de proteínas do soro de leite

As proteínas remanescentes no soro de leite resultam do processo de fabricação de queijo. Apresentam excelente composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, portanto elevado valor nutritivo (Sgarbieri, 2005, Haraguchi; Abreu; De Paula, 2006). Em contrapartida, apresenta também excepcionais propriedades funcionais de solubilidade, formação e estabilidade de espuma, emulsibilidade, geleificação, formação de filmes e cápsulas protetoras (Modler, 2000; Wong, Carmirand, Pavlat, 1996). Constituem um grupo bastante diversificado de proteínas com características estruturais bem diferentes (Wong, Carmirand, Pavlat, 1996). Devido a esta importância biológica e industrial, cada vez mais pesquisadores tem tentado buscar alternativas para a recuperação e purificação destas proteínas presente do soro de queijo, já que as mesmas encontram-se complexadas com outros componentes, aumentando as dificuldades operacionais.

Veredas (2000) estudou as melhores condições de adsorção da α -lactalbumina visando a sua purificação empregando adsorventes de troca iônica e de interação hidrofóbica. Neste mesmo estudo foram, também, realizados ensaios em sistemas de tanque agitados para determinação das isotermas e cinéticas de adsorção. Neste trabalho obteve-se a α -lactalbumina com uma pureza acima de 80% e apresentando um fator de purificação de 5 vezes utilizando as resinas de interação hidrofóbica com única etapa de purificação.

A lactoperoxidase e lactoferrina são as proteínas que se encontram em menor concentração no lactosoro. Por suas características físico-químicas e, em particular, o alto ponto isoelétrico, estas proteínas apresentam vantagens diante das demais, quando separadas por processos de cromatografia de troca iônica usando resinas catiônicas. Nóbrega *et al.* (2000) estudaram o lactosoro processado em tampão fosfato 50 mM, pH 6,5 em colunas cromatográficas usando dois diferentes tipos de resinas de troca catiônica: SP-Sepharose FF e a SP-Sepharose XL. As frações de lactoperoxidase e lactoferrina adsorvidas foram eluídas pela variação da força iônica com adição de NaCl e as frações eluídas foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE e por cromatografia analítica CLAE (cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Os resultados mostraram que a SP-Sepharose FF apresentou bons rendimentos enquanto a SP-Sepharose XL maior pureza.

Para avaliar os efeitos da temperatura, grau de expansão e altura do leito sedimentado sobre a purificação e recuperação da α -lactoalbumina, a eficiência da coluna em

adsorver todas as proteínas do soro do leite bovino e o comportamento fluidodinâmico da coluna de leito expandido, na presença de solução tampão e do soro de leite bovino, foi desenvolvido uma pesquisa por Oliveira (2003). Para a avaliação dos parâmetros estudados foi proposto um planejamento experimental fatorial. Observou-se que a α -lactolbumina adsorve mais fortemente no adsorvente hidrofóbico do que a β -lactoglobulina. Através do processo de adsorção realizado na coluna de leito expandido obteve-se a α -lactolbumina com grau de pureza de até 100%, detectado por análise em CLAE, para uma altura de leito de 15 cm, temperatura de 32°C e grau de expansão de 2,75. A recuperação dessa proteína foi de aproximadamente 9,5%. Ainda foi mostrado pela análise estatísticas que a temperatura e o grau de expansão têm efeito significativo e positivo sobre a pureza da α -lactalbumina e dos parâmetros P_e e ϕ , que apenas a temperatura possui efeito significativo e negativo sobre a recuperação, e que o grau de expansão e a temperatura têm efeitos negativos sobre o parâmetro N .

Chagas; Macedo; Santos (2006) estudaram as condições de recuperação de algumas frações protéicas presentes no soro de coagulação enzimática, com pI (ponto isoelétrico) abaixo de 7,0, para a resina de troca aniônica Streamline® DEAE, além de se avaliar a capacidade dinâmica de adsorção dessas proteínas para a resina. Os resultados mostraram que foi possível recuperar as proteínas existentes no soro de queijo de coalho. A avaliação da capacidade dinâmica do leito mostrou que não é interessante operar o leito além da condição $C/Co=0,1$ uma vez que se perde uma grande quantidade de proteína. Nesse caso, quando se opera com o leito nessa condição ($C/Co=0,1$) recupera-se 97,6% das proteínas.

Bonomo (2005) estudou o processo de adsorção das proteínas albumina de soro bovino (BSA) e α -lactoglobulina (α -lg), provenientes do soro de queijo, em cromatografia de interação hidrofóbica variando-se as condições de temperatura e concentração de sal. Com os dados experimentais obtidos foi conduzida uma análise termodinâmica do processo. Foram realizadas, ainda, modificações no *software SimuCromWin*, que consistiram na inclusão da opção de utilização de outros modelos de isotermas além do modelo de Langmuir e o desenvolvimento de um programa que simula o processo de eluição em leito fixo. Avaliou-se, então, a influência dos modelos de isotermas na simulação do processo de adsorção assim como a otimização do processo de adsorção e dessorção das referidas proteínas em cromatografia de interação hidrofóbica. A partir dos resultados obtidos por meio do estudo da adsorção de BSA e α -lg em resina hidrofóbica (*Streamline Phenyl*) foi possível observar que este processo é dependente da concentração de sal. Verificou-se, também, que o processo é

espontâneo e entropicamente dirigido. Com as alterações no *software SimuCRomWin*, foram realizados estudos que indicaram o modelo de isoterma de Langmuir o melhor para simulações em cromatografia preparativa. Além disso, foi realizada a otimização do processo de separação das proteínas albumina de soro bovino (BSA) e α -lactoglobulina (α -lg), utilizando o *software SimuCromWin* e a técnica de superfície de resposta, na qual se verificou que em temperaturas e concentrações de sal mais altas, dentro da faixa estudada, a resolução entre os picos é maior.

Cavalcanti; Magalhães; Santos (2009) estudaram a adsorção das proteínas do soro de queijo tipo “coalho” para a resina de interação hidrofóbica *Streamline™ Phenyl* usando o leite na forma expandida. Foi utilizada uma coluna de 2,6 cm de diâmetro por 30 cm de altura, acoplada a uma bomba peristáltica. Uma amostra de solução de soro (250 mL) foi aplicada a uma coluna contendo a resina *Streamline™ Phenyl* (25 mL) previamente equilibrada em tampão Tris/HCl (50 mM, pH 7,0) com NaCl (1,0 M), após lavagem a eluição a temperatura ambiente. Para as etapas de equilíbrio e lavagem foi utilizado 300 mL de tampão Tris/HCl (50 mM, pH 7,0) com NaCl (1,0M) e altura de leito fixo de 5,0 cm. Uma amostra de solução de soro (250 mL) foi eluída em tampão Tris/HCl (50 mM, pH 7,0) a temperatura ambiente. Os resultados mostraram que foi possível recuperar 37% das proteínas inicialmente contidas no soro em uma única etapa.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

3- Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados aspectos sobre os materiais, reagentes e equipamentos utilizados, além das metodologias empregadas para a realização do presente trabalho.

3.1- Soro de leite

O soro foi coletado em pequenas queijarias nas redondezas de Natal e foi transportado, devidamente acondicionado em recipientes plásticos e sob refrigeração para o Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Este foi devidamente caracterizado com ensaios de rotina, de acordo com a Umidade, Extrato Seco total, teor de gordura, sais minerais, lactose, proteína, pH e acidez, conforme Florentino (2006).

Com o objetivo de se avaliar a adsorção da proteína do soro de leite foi utilizado o soro *in natura* e tratado com EDTA, numa concentração de 1,0 mM de EDTA. O objetivo deste tratamento foi de complexar os íons de cálcio presente no soro (Lindahl & Vogel, 1984).

3.2- Coluna

Uma coluna em vidro com 2,60 cm de diâmetro e 30,00 cm de altura com base de teflon foi especialmente construída para se operar em leito expandido. Na base da coluna está acoplado um distribuidor confeccionado em aço inoxidável com uma fração de área livre de 0,8%. No interior da coluna há um pistão de altura ajustável. A alimentação foi efetuada na parte inferior. Uma tela de 60 *mesh* foi colocada entre as junções inferiores da coluna e na parte inferior do pistão para evitar perda de adsorventes. Uma régua foi usada na lateral da coluna para registrar a altura do leito, conforme procedimento descrito por (Santos, 2001).

3.3-Bomba

Uma bomba peristáltica, modelo Perimax 12, da Spetec, foi usada para bombear o fluido tamponante e a solução contendo o soro. Como etapa inicial do trabalho efetuou-se uma calibração da bomba usando água com fluido de referência.

3.3.1-Calibração da bomba

Para a calibração da bomba foi utilizada água deionizada como fluido de calibração e o procedimento utilizado foi o seguinte: o botão referente à escala de velocidade da bomba foi colocado na 1ª posição, num total de 10 posições, variando de 100 a 1000. Um Béquer seco foi pesado e sua massa anotada. A bomba foi ligada e ficou funcionando durante 60 segundos. Após isto, desligou-se a bomba e o Béquer foi novamente pesado. Por diferença, obteve-se a massa bombeada durante os 60 segundos e conseqüentemente a vazão mássica. Considerando que a massa específica da água é igual a 1 g/cm³, calculou-se a vazão volumétrica. O mesmo procedimento foi utilizado para demais posições no botão de velocidade, tendo-se então a calibração da bomba. Dessa maneira, definiu-se a faixa de trabalho, que foi de 300 cm/h para as etapas de equilíbrio, lavagem e aplicação da amostra de soro e de 100 cm/h para a etapa de eluição.

O aparato experimental formado pela bomba peristáltica e a coluna é apresentado na Figura 3.



Figura 03: Aparato experimental

3.4-Adsorventes

Foram utilizados três tipos de adsorventes (resinas) da Amersham Biosciences: a Streamline DEAE de troca iônica, a Streamline SP de troca iônica e a Streamline *Phenyl* de interação hidrofóbica, todos têm como base a matriz de agarose com inclusão de quartzo cristalino inerte no núcleo para obter uma densidade adequada. Estas resinas foram desenvolvidas especialmente para serem usadas em adsorção em leito expandido. As resinas

Materiais e Métodos

têm as seguintes características, segundo o fabricante, que estão mostradas nas Tabelas 03, 04 e 05.

TABELA 03: Características da resina Streamline DEAE.

PRODUTO	DESCRIÇÃO
Tipo de troca	Fracamente aniônica
Grupo funcional	-O-CH ₂ CH ₂ -N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ H
Capacidade iônica	0,13 -0,21 mmol Cl ⁻ /mL de adsorvente
Porosidade	4 x 10 ⁶ Daltons (proteínas globulares)
Matriz	macroporosa, ligação cruzada agarose 6%, contendo anel de quartzo.
Forma da partícula	esférica, 100-300 µm
Tamanho médio da partícula	200 µm
Densidade média da partícula	aproximadamente 1,2 g/mL
Grau de expansão a 300 cm/h	2-3
pH de estabilidade	
Faixa de trabalho	2-13
Faixa de limpeza	2-14
Estabilidade química	todos tampões aquosos normalmente utilizados -NaOH 1 M -etanol 70% -solventes orgânicos EVITAR agentes oxidantes
Estabilidade física	a geração de finos em operação normal do leito expandido é desprezível. Evitar operações cisalhantes de drenagem, escoamento.
Capacidade de adsorção**	no mínimo 40 mg BSA/mL adsorvente*.
Estocagem	etanol 20%

*BSA – Albumina de soro bovina. **Capacidade de ruptura: 15 cm de altura de leito sedimentado, 300 cm/h, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5. Fonte: Pharmarcia Biotech.

TABELA 04: Características da resina Streamline SP.

PRODUTO	DESCRIÇÃO
Tipo de troca	fracamente catiônica
Grupo funcional	-O-CH ₂ CHOHCH ₂ O-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
Capacidade iônica	0,17 -0,24 mmol H ⁺ /mL de adsorvente
Porosidade	4 x 10 Daltons (proteínas globulares)
Matriz	macroporosa, ligação cruzada agarose, 6%, contendo anel de quartzo
Forma da partícula	esférica, 100-300 µm
Tamanho médio da partícula	200 µm
Densidade média da partícula	aproximadamente 1,2 g/mL
Grau de expansão a 300 cm/h	2-3
pH de estabilidade	
Faixa de trabalho	3-13
Faixa de limpeza	32-14
Estabilidade química	todos tampões aquosos normalmente utilizados -NaOH 1 M -etanol 70% -solventes orgânicos EVITAR agentes oxidantes
Estabilidade física	a geração de finos em operação normal do leito expandido é desprezível. Evitar operações cisalhantes de drenagem, escoamento
Capacidade de adsorção*	no mínimo 60 mg lisozima/mL adsorvente
Estocagem	acetato de sódio 0,2 M em etanol

*capacidade de ruptura: 15 cm de altura de leito sedimentado, 300 cm/h, 50 mM fosfato de sódio, pH 7,5. Fonte: Pharmacia Biotech

TABELA 05: Características da resina Streamline *Phenyl*

PRODUTO	DESCRIÇÃO
Estrutura	Macroporos de agarose contendo 6% de anel de quartzo
Tamanho da partícula	100 - 300 μm
Densidade da partícula	Aproximadamente 1,2 g mL ⁻¹
Velocidade do fluido	200 – 400 cm h ⁻¹
Grau de expansão (H/H ₀) A 300 cm/h ⁻¹	2 - 3
Recomendação de pH a ser usado:	
Trabalhado	3 – 13
Limpeza (<i>cleaning in place</i>)	2 - 14
Temperatura para estabilidade	4 – 40 °C

Fonte: Amersham Pharmacia Biotech

3.5- Sistemas Tamponantes

Para os estudos hidrodinâmicos foram realizados experimentos em presença de solução tampão de Tris (hidroximetil) aminometano. Os pHs foram ajustados para 7,0; 7,5 e 8,0 através da adição HCl e as concentrações de Tris utilizados foram: 30, 50 e 70 mM, conforme demonstrado na Tabela 06.

TABELA 06: Sistemas tampão Tris/HCl estudados, para altura inicial de 5,0 cm e velocidade 300 cm/h

RESINAS	CONCENTRAÇÃO DE TAMPÃO Tris/HCl (mM)	pH
DEAE	30	7,0
	30	7,5
	30	8,0
	50	7,0
	50	7,5
	50	8,0
	70	7,0
	70	7,5
	70	8,0
SP	30	7,0
	30	7,5
	30	8,0
	50	7,0
	50	7,5
	50	8,0
	70	7,0
	70	7,5
	70	8,0
Phenyl	30	7,0
	30	7,5
	30	8,0
	50	7,0
	50	7,5
	50	8,0
	70	7,0
	70	7,5

A solução tampão foi obtida partindo-se da solução Tris e do acréscimo de HCl com uma molaridade relativamente alta. Preparou-se a solução de Tris diluindo-se uma dada massa de Tris (peso molecular = 121,14 g/gmol) em água deionizada. Preparou-se essa solução com aproximadamente 80% do volume final desejado, acrescentou-se o HCl, acompanhando o pH com auxílio do pHmetro, até atingir o pH desejado. Completou-se então o volume final com água deionizada.

3.6-Expansão do leito

Por ser um importante parâmetro a ser considerado quando se usa a ALE o grau de expansão foi obtido pela razão da altura do leito, para uma determinada velocidade, com relação à altura inicial do leito de adsorvente (leito empacotado), conforme literatura (Santos, 2001). Foram estudados os sistemas formados para as três resinas e para os tampões, nas alturas de leito fixo de 5,0 e 10,0 cm, e para cada posição do botão da bomba peristáltica, conforme explicitado no item 3.3.1. É importante ressaltar que uma escala colocada na parede externa na coluna permitiu registrar a variação da altura do leito.

$$\text{Grau de expansão} = \frac{H}{H_0} \quad (7)$$

Os ensaios de expansão foram realizados com as resinas Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*, em presença dos tampões Tris/HCl, nas concentrações de Tris 30, 50 e 70 mM e pH 7,0; 7,5 e 8,0, conforme representados na Tabela 06. Esses ensaios foram realizados com leito nas alturas iniciais de 5,0 e 10,0 cm.

3.7- Determinação do tempo de residência (DTR)

Os ensaios experimentais de DTR com o leito expandido foram realizados buscando-se determinar o coeficiente de dispersão axial (D_{axial}) do líquido para diferentes condições de concentração e pH do tampão Tris/HCl usado neste trabalho. Acetona a 0,5% (v/v) em cada tampão Tris a temperatura ambiente, foi utilizado 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 utilizada por Santos (2001), 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:

Para a determinação do tempo de residência o leito cromatográfico foi fixado em 5,0 cm de altura de leito fixo e velocidade linear de 300 cm/h. Em seguida, 200 mL de tampão Tris-HCl foi bombeado pelo leito até a obtenção de uma resposta estável. Quando era utilizada a velocidade de 300 cm/h, o leito se expandia até uma altura média de 12 cm. Em seguida, alimentou-se a coluna com 300 mL da solução tampão contendo o traçador (acetona), acionou-se o cronômetro e a cada 3 minutos, era coletada uma amostra de 1,0 mL para medir a absorvância à 280 nm gerada pelo traçador na saída da coluna, ou seja, a estabilidade da leitura da absorvância máxima (etapa do sinal positivo).

Neste instante, trocou-se a fase móvel por uma isenta de acetona e estabeleceu-se este como o tempo zero. O escoamento foi mantido até que se verificou o registro da absorvância como sendo zero. Definiu-se, então, o tempo de residência médio como tempo gasto para que a absorvância 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 absorvância máxima. O número de pratos teóricos (N) foi determinado por:

$$N = \frac{t^2}{\sigma^2} \quad (11)$$

Sendo σ^2 o desvio padrão e t o tempo de residência na coluna (Santos, 2001).

Os ensaios de Distribuição do Tempo de Residência foram realizados com os mesmos sistemas tamponantes apresentado na Tabela 06, com altura de leito inicial de 5,0 e 10,0 cm.

3.8- Avaliação da cinética de adsorção das resinas

As cinéticas foram obtidas para os sistemas formados por cada resina, soro e tampões. A velocidade de agitação foi de 150 rpm, a uma temperatura de 30° C. Cada sistema continha: béquer de 50 mL contendo 30 mL da solução de interesse, 1,0 mL de resina e um *Shaker* para agitação do sistema. Cada experimento foi feito a uma dada concentração inicial de soro (1°) 30 mL de soro; (2°) 15 mL de soro e 15 mL de tampão; (3°) 7,5 mL de soro e 22,5

mL de tampão. Mediu-se a concentração de proteína de cada solução de soro. Adicionou-se 1,0 mL de resina. Nos tempos de 30 segundos, 1,0 minuto, 5,0 minutos, 10,0 minutos, 30 minutos e 60 minutos, era retirada 1,0 mL de amostra de cada solução e realizado leitura em espectrofotômetro para dosagem de proteína pelo método do Biureto.

A quantidade de proteína adsorvida na fase sólida foi calculada de acordo com a Equação (12):

$$q^* = \frac{V(C_o - C)}{V_{ads}} \quad (12)$$

Sendo q^* a quantidade adsorvida na resina, V o volume de solução de protéica, C_o a concentração de proteína inicial, C a concentração de proteína no equilíbrio e V_{ads} o volume de adsorvente utilizado (Santos, 2001).

3.9- Experimentos de adsorção em Leito Expandido

Nos experimentos de adsorção em leito expandido foi utilizado soro *in natura*. Todas as etapas foram realizadas com os tampões com concentração de 50 mM, pH 7,0 e as resinas Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*, na altura inicial $H_0 = 5,0$ cm. Os experimentos obedeceram as seguintes etapas:

- 1- A coluna foi preenchida com o adsorvente até 5 cm de altura, em leito fixo;
- 2- 200 mL de tampão eram aplicados para se atingir o equilíbrio.
- 3- Em seguida eram aplicados 200 mL de soro (passante), numa velocidade de 200 cm/h e fluxo ascendente. A cada 8,0 mL aplicados, coletava-se 2,0 mL, na saída da coluna para análise de proteína;
- 4- Após a etapa de passante, seguia-se a lavagem, onde eram aplicados 100 mL de tampão Tris/HCl, numa velocidade de 200 cm/h e fluxo ascendente. A cada 8,0 mL aplicados, coletava-se 2,0 mL, na saída da coluna para análise de proteína. Esta etapa serve para remover as proteínas fracamente ligadas à resina.
- 5- Por último, na etapa de eluição, 100 mL de tampão eram aplicados em fluxo descendente, a uma velocidade de 100 cm/h e leito fixo à 5,0 cm de altura. A cada 8,0 mL aplicados, coletava-se 2,0 mL, na saída da coluna para análise de proteína. Esta etapa é responsável pela recuperação das proteínas, mas fortemente adsorvida na resina durante a etapa de passante.

Os ensaios foram realizados com as resinas Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*. Foram também realizados ensaios combinados, onde o eluído de uma resina seria a passante da outra, conforme a Tabela 07.

TABELA 07: Ensaios de adsorção em leite expandido

ENSAIO	RESINA
01	DEAE
02	SP
03	<i>Phenyl</i>
04	DEAE/ <i>Phenyl</i>
05	SP/ <i>Phenyl</i>
06	Pheny/DEAE
07	Pheny/SP
08	DEAE/SP
09	SP/DEAE

3.10-Determinação de proteínas

O conteúdo total de proteína do soro de leite foi quantificado a partir de uma curva padrão tendo como referência lisozima usando o método do Biureto (Gornal; Bardawill; David, 1949). Nesse caso foi utilizado um espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Spectronic modelo Genesys 10uv) e comprimento de onda de 540 nm.

A reação de Biureto é um método que pode ser usado para determinar a quantidade de proteína solúvel em solução. O reagente Biureto (sulfato de cobre em uma base forte) reage com bandas peptídicas mudando a cor da solução. O espectrofotômetro é usado então para medir a intensidade da cor resultante: quanto mais escura a solução, mais proteína solúvel em solução.

Para se fazer a curva padrão, primeiramente era feito o reagente de biureto. Para se fazer um litro do reagente, era dissolvido em 500 mL de água destilada 1,5 g de sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 6,0 g de tartarato de sódio e potássio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) Com agitação constante, adicionava-se 300 mL de solução NaOH 10%, depois diluía até 1,0 litro de água.

A curva padrão foi construída utilizando-se a lisozima como proteína padrão. Pesava-se 0,5 gramas da lisozima em balança analítica em Erlenmeyer de 50 mL. Adicionava-se 10 mL de água destilada (usando proveta) e 1 mL (usando pipeta) de NaOH 0,5N, tendo o cuidado de dispersar bem o sólido. Aquecia o Erlenmeyer em banho-maria fervente por tempo necessário para efetuar a dissolução completa (5 minutos ou menos). Observava-se atentamente o tempo, pois aquecimentos muito prolongados poderiam levar à hidrólise de polipeptídeos e possível diminuição da densidade ótica. Após o aquecimento, o conteúdo era passado para balão volumétrico de 25 mL tendo-se o cuidado de filtrar. Era observado se a solução era límpida, com ausência de qualquer precipitado ou resíduo insolúvel. Completava-se o volume do balão com água destilada. Em seguida, transferia-se alíquotas de 0,4;0,6;0,8;1,0 em tubos de ensaio separados e completava-se o volume de cada tubo de ensaio para 1 mL usando-se água destilada. Paralelamente fazia-se um branco, adicionando-se 1 mL de água em um tubo separado e identificando-o como o BRANCO da reação. Adicionava-se 4 mL do reagente Biureto, misturava-se bem e deixava-se reagir por 30 minutos. Logo após este tempo de 30 minutos, lia-se a absorbância da amostra no espectrofotômetro à 540 nm, usando o BRANCO da reação para zerar o aparelho. Todas as leituras deveriam estar dentro da faixa da curva de padrão.

Para o teor de proteína nas amostras de soro, era coletada 1,0 mL de amostra e adicionado 4,0 mL do reagente de biureto, deixava-se reagindo por 30 minutos e fazia-se a leitura da absorbância à 540 nm. Após a leitura e com a curva padrão, calculava-se a concentração de proteína das amostras de soro.

3.11 – Eletroforese

As frações de proteínas após cada etapa de adsorção foram submetidas a análise qualitativa através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), o que possibilitou a identificação das proteínas presentes nas frações coletadas.

As análises de eletroforese em gel de poliacrilamida foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Laemmli (1970). O gel foi preparado na concentração de 15% e espessura de 1mm.

A seguir será descrita a preparação das principais soluções utilizadas.

Materiais e Métodos

a) *Tampão de separação, pH 8,8*: tris básico (18,17 g) era dissolvido em água destilada e o pH para 8,8 com HCl diluído. SDS (400 mg) era adicionado e o volume final completado para 100 mL com água destilada.

b) *Solução de acrilamida (30%) e bis-acrilamida*: Acril-bis: Acrilamida (30 g) e bis acrilamida (800 mg) eram dissolvido em água destilada e o volume final completado para 100 mL com água destilada.

c) *Persulfato de amônio (p/v)*: persulfato de amônio (50 mg) era dissolvido em 500 μ L de água destilada.

d) *Tampão de concentração, pH 6,8*: tri básico (6,06 g) era dissolvido em água destilada e o pH ajustado para 6,8. Após completar-se o volume para 100 mL com água destilada eram adicionados 400 mg de SDS.

e) *solução de bis acrinamida 2%*: para 100 mL de solução, eram dissolvidos 2 g de bis acrilamida em água destilada.

f) *Tampão de ruptura*: tris básico (378 mg) era dissolvido em 15 mL de água destilada, o pH ajustado para 6,8 e adicionado 2,5 mL de mercaptoetanol, 1 g de SDS, 5 mL de glicerina e 3 mg de azul de bromofenol. O volume final era completado para 25 mL com água destilada.

g) *Eletrólito*: tris básico (30,29) era dissolvido em aproximadamente 800 mL de água destilada e eram adicionados 144,4 g de glicerina e 10 g de SDS, completando-se o volume para 1 L com água destilada. A solução final era então diluída 10 vezes para uso.

h) *Corante azul brilhante de Coomassie*: em 454 mL de metanol 50 (v/v) e 46 mL de ácido acético eram dissolvidos 1,25 g de azul de Coomassie e o volume final completado para 500 mL com água destilada. Filtrava-se a solução de corante em filtro papel.

i) *Descorante*: para 1 L de solução aquosa eram misturados 370 mL de metanol e 11,3 mL de ácido acético glacial.

Primeiramente, gel de poliacrilamida 15% (contendo SDS 0,1%) era preparado misturando-se 1,25 mL de tampão de separação, 2,5 mL de tampão Acril-bis, 1,22 mL de água destilada, 7 μ L de persulfato de amônio 10%. Esta solução era cuidadosamente transferida entre as placas de eletroforese, deixando-se 1 cm livre, onde era adicionado butanos para nivelar o gel. Após 1 hora de polimerização, preparava-se o gel de concentração 5% (750 μ L de tampão de concentração, 300 μ L de Acril-bis, 1,55 mL de água destilada, 200 μ L de bis-acrilamida 2%, 5 μ L de TEMED e 15 μ L de persulfato de amônio 10%. Depois de

Materiais e Métodos

retirado o butanol, adicionava-se o gel de concentração 5% e introduzia-se o pente de eletroforese para a formação das pistas de aplicação de amostras. Após 1 hora e polimerização eram aplicados 8 μ L de amostra (diluída 1:1 com tampão de ruptura) por pista, sendo as primeiras e as últimas pistas destinadas aos marcadores de massa moleculares (misturas de proteínas padrões com massa moleculares de 14,4 a 97,0 kDa). As placas contendo gel de eletroforese eram transferidos para umas cubas contendo eletrólito (800 mL no compartimento positivo e 100 mL no compartimento negativo). O tempo de corrida era de aproximadamente 1 h e 50 min a uma corrente constante de 20 mA por placa. O gel de eletroforese era retirado da célula e transferido para um recipiente contendo corante de azul brilhante de Coomassie. Após a coloração por aproximadamente 1 hora, o gel de eletroforese era revelado com solução descorante e finalmente seco à temperatura ambiente entre folhas de papel celofane.

Capítulo 04

Resultados e discussões

4. Resultados e discussões

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados. Serão apresentados os estudos hidrodinâmicos, na qual foram estudados os parâmetros: expansão do leito, porosidade e Distribuição do Tempo de Residência (DTR), referentes aos sistemas compostos por cada resina, (Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*), em tampão Tris/HCl na concentração de 50 mM, pH 7,0 com leito fixo de 5,0 cm e velocidade de 300 cm/h. Os dados referentes aos outros sistemas, citados nos itens 3.6 e 3.7, são apresentados nos anexos I, II e III. Nos estudos do comportamento hidrodinâmicos para a coluna com adsorventes de troca iônica e interação hidrofóbica, verificou-se, principalmente, o efeito da dispersão axial e o comprometimento da estabilidade na presença de tampão e acetona através da determinação de parâmetros importantes a serem considerados em processo de aumento de escala, como por exemplo, o número de Peclet e o número de pratos teóricos.

Serão apresentados também os principais resultados obtidos nos ensaios de adsorção em leito expandido, visando à recuperação de proteínas presentes no soro de leite bovino, empregando resinas de troca iônica e interação hidrofóbica em tampão Tris/HCl com concentração 50 mM e pH 7,0. Nestes ensaios foram determinados as curvas de ruptura e os balanços de massa das proteínas do soro de leite. Para identificação das proteínas que estavam sendo recuperadas, foram obtidas eletroforeses.

4.1- Expansões do leito

Na Tabela 08, são apresentados os resultados do grau de expansão (H/H_0) para os sistemas utilizados nesse trabalho, que foi representado através das três resinas (Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*), no tampão Tris/HCl com pH (7,0; 7,5 e 8,0) com a concentração (30 mM, 50 mM e 70 Mm) , velocidade de $U = 300$ cm/h e leito fixo de 5,0 cm. Para os ensaios de expansão do leito, o fluido utilizado foi o tampão Tris/HCl.

TABELA 08: Expansão do leito para os sistemas estudados, para altura inicial de 5,0 cm e 10 cm e velocidade 300 cm/h

RESINAS	pH	CONCENTRAÇÃO		H/H ₀ H ₀ =5,0	H/H ₀ H ₀ =10,0
		DE TAMPÃO	TRIS/HCl		
			mM		
DEAE	7,0		50	1,96	1,88
	7,5		50	1,92	1,81
	8,0		50	1,89	1,85
SP	7,0		50	1,95	1,87
	7,5		50	1,52	1,88
	8,0		50	1,63	1,81
<i>Phenyl</i>	7,0		50	2,29	2,00
	7,5		50	2,19	1,99
	8,0		50	2,21	2,01

Na Figura 04 e Figura 05 são apresentadas as curvas de expansão do leito (H/H₀) quando se utilizou, respectivamente, as resinas Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*, em tampão Tris/HCl 50 mM e pH 7,0 para altura inicial de 5,0 cm e 10 cm, respectivamente. Nestas curvas são apresentadas o grau de expansão em função da velocidade superficial (cm/h). Este é o modo mais prático e utilizado na caracterização de um leito expandido. O grau de expansão é um número adimensional, o mesmo consiste da medida relativa da altura do leito expandido, para uma determinada vazão, com a altura do leito fixo do adsorvente.

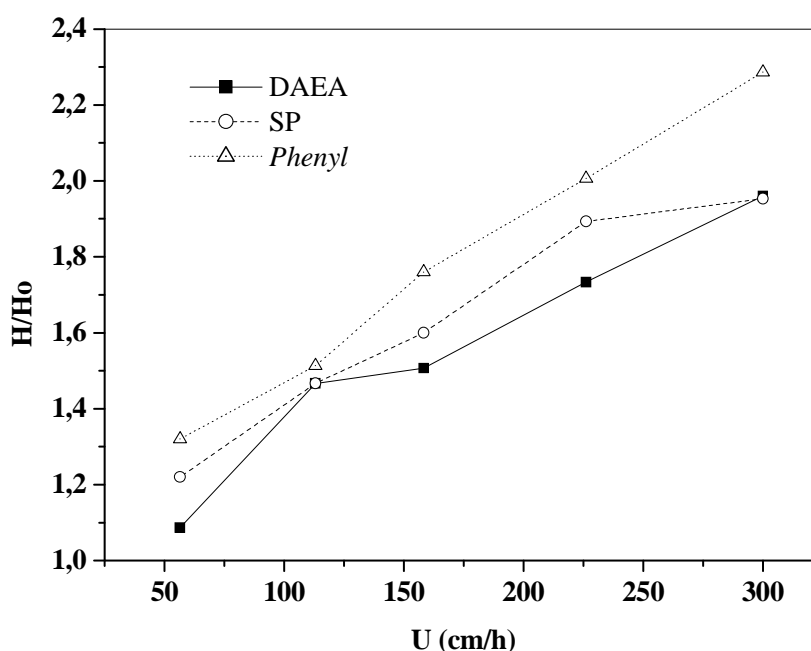


Figura 04: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *Phenyl* ($H_0 = 5,0$ cm, 50 3mM, pH 7,0).

Para as condições em que foram realizados os ensaios e para o tipo de coluna utilizada, observa-se que existe uma tendência linear, com coeficiente de correlação (R^2) em torno de 0,9, entre o grau de expansão e a velocidade superficial, para as três resinas usadas. Quando se tem as curvas separadas, observa-se que há tendência de maior linearidade quando se usa a resina Streamline *Phenyl* ($R^2 = 0,9978$), seguida pela Streamline SP ($R^2 = 0,9813$) e Streamline DEAE ($R^2 = 0,9268$). Quando se tem uma velocidade superficial média de 300 cm/h, o leito tende a dobrar sua altura em relação à altura inicial, isto é observado principalmente quando se utiliza a resina Streamline *Phenyl*.

Observa-se também que o pH do tampão não influenciou o grau de expansão, nas diferentes resinas.

Quando se utiliza a resina Streamline *Phenyl*, observa-se um aumento maior da altura leito em relação às outras resinas, chegando a uma relação H_0/H de mais de 2,2, isto é, a altura final do leito sendo 2,2 vezes a altura inicial, o que é bastante interessante quando se trabalha com adsorção do leito na forma expandida, pois, isto demonstra a estabilidade do sistema. Como menciona Chase e Drager (1992), o sucesso da purificação de proteínas, usando a adsorção em leito expandido, depende crucialmente da habilidade do sistema

produzir um leito estável. Essa condição é fundamental para que se possa realizar um aumento de escala, partindo-se de resultados obtidos em pequena escala no laboratório.

Destaca-se que o comportamento apresentado pelos sistemas avaliados foi o observado por Santos (2001) ao estudar os parâmetros hidrodinâmicos em diferentes resinas troca iônica (Streamline DEAE e Streamline SP) e de vários trabalhos como o de Oliveira (2003), Kalil *et al.* (2005), Sierra (2007), quando estudaram o grau de expansão em leito expandido, usando as resinas de troca iônica e interação hidrofóbica. Oliveira (2003) avaliou os efeitos da temperatura, grau de expansão e altura do leito sedimentado sobre a purificação e recuperação da α -lactoalbumina, a eficiência da coluna em adsorver todas as proteínas do soro do leite bovino e o comportamento fluidodinâmico da coluna de leito expandido na presença de solução tampão e do soro de leite bovino. Nesta avaliação, trabalhou-se com leito inicial de 10, 15, 20, 25 e 30 cm altura e velocidades lineares variando de 195 cm/h a 378 cm/h e o grau de expansão obtido foi de 2,75. Kalil *et al* (2005) estudaram a purificação da inulinase diretamente do caldo bruto obtido por *Kluyveromyces marxianus var. Balgaricus* ARCC 16045, em leito expandido utilizando a resina Streamline SP e obteve um fator de expansão de 2,0. Sierra (2007) estudou o processo de adsorção da proteína glicomacropéptídeo (GMP) proveniente do soro de queijo, em cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando resina Streamline *Phenyl*, variando-se as condições de temperatura e a concentração de sal e encontrou resultados idênticos a este trabalho.

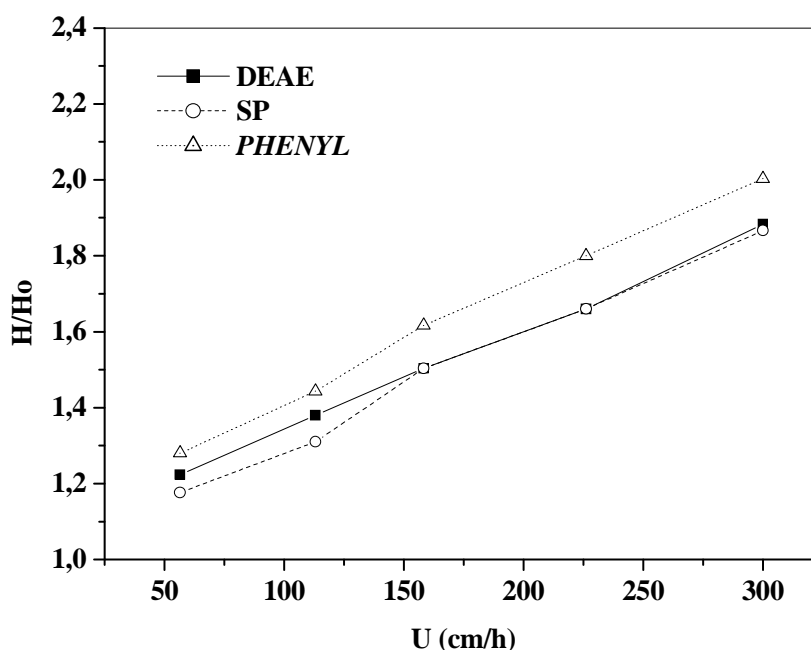


Figura 05: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *Phenyl* ($H_0 = 10,0$ cm, 50 mM, pH 7,0).

Observa-se que ao aumentar-se a altura inicial do leito fixo de 5,0 cm para 10,0 cm para as três resinas utilizadas, conforme a Figura 04 e o anexo I, o grau de expansão do leito em função da velocidade aproxima-se de um comportamento quase linear. Destaca-se que, para um leito com menor altura existe uma maior influência do distribuidor no grau de expansão. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Santos (2001).

Nas Figuras 06 e 07 são apresentadas as curvas de porosidade do leito (ϵ) em função da velocidade do fluido quando se utilizou as resinas Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*, em tampão Tris/HCl 50 mM e pH 7,0, com velocidade de 300 cm/h e leito fixo 5,0 cm. Na Figura 06 são apresentadas as curvas de porosidade do leito (ϵ) em função da velocidade do fluido quando se utilizou as resinas Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*, em tampão Tris/HCl 50 mM e pH 7,0, com velocidade de 300 cm/h e leito fixo 10,0 cm. Destaca-se que resultados semelhantes foram observados para os outros sistemas (conforme item 3.6), cujos resultados encontram-se em anexo II.

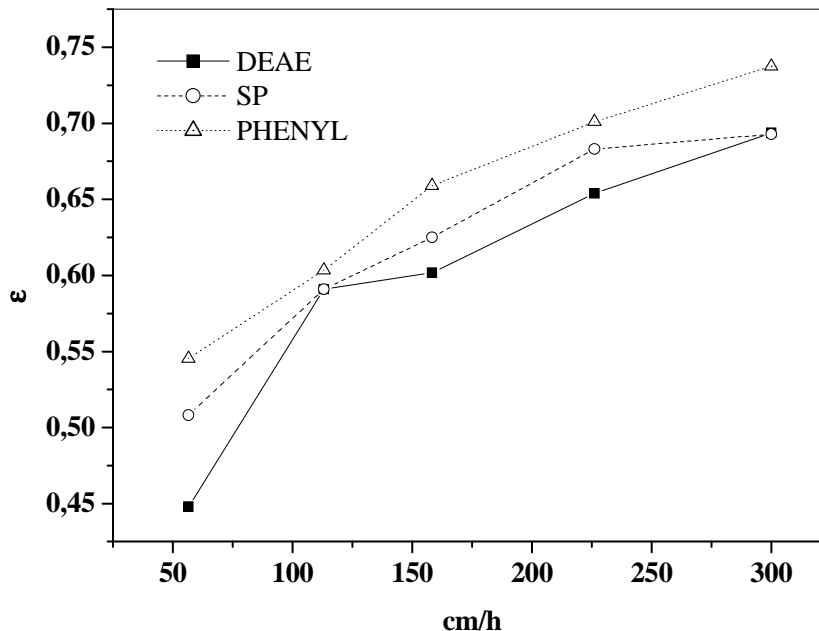


Figura 06: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *Phenyl* ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0).

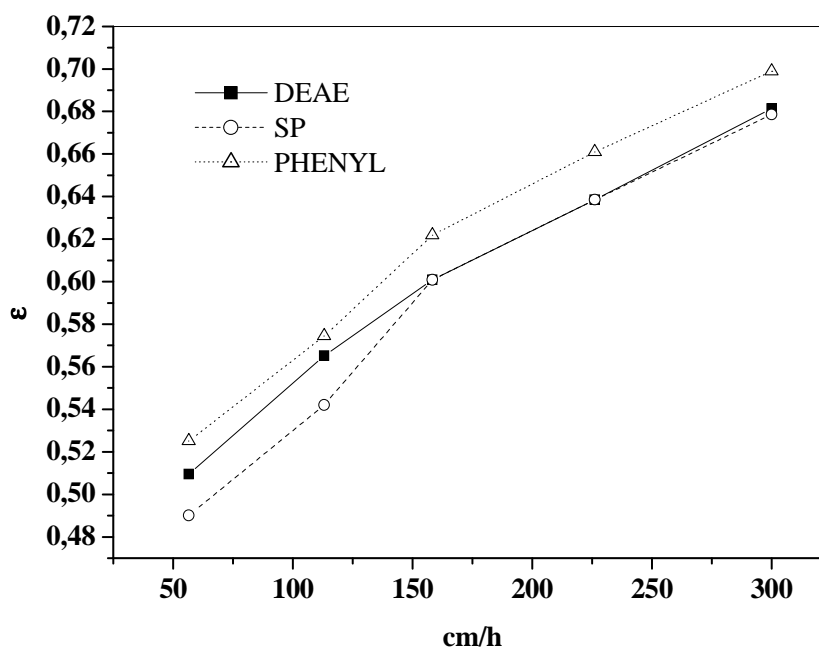


Figura 07: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *Phenyl* ($H_0 = 10,0$ cm, 50 mM, pH 7,0).

A porosidade das resinas DEAE e SP foi de 0,70, que encontra-se na mesma ordem que encontrada por Santos (2001). A porosidade da resina *Phenyl* foi um pouco maior, em torno de 0,75. Portanto, espera-se que a resina que tem maior porosidade, a *Phenyl*, obtenha maior facilidade para passagem do soro, por que fluirá mais facilmente por entre os adsorventes, sendo essa uma das vantagens de se utilizar a adsorção em leito expandido.

4.2- Distribuições do Tempo de Residência

A técnica de estímulo de resposta foi usada na análise da distribuição do tempo de residência na coluna de 30 cm de altura e 2,6 cm de diâmetro contendo resina de troca inônica ou hidrofóbica, em leito expandido com tampão. Os experimentos de DTR foram realizados objetivando determinar o número de pratos teóricos e, conseqüentemente, o coeficiente de dispersão axial, que determina o tipo de escoamento predominante na coluna (mistura ou empistonado). Acetona a 0,5% (v/v) em tampão Tris/HCl, para cada resina, a 25°C foi usada como traçador na técnica frontal com sinal negativo para se obter o número de pratos teóricos (N). A DTR foi determinada pela metodologia usada por Santos (2001) e Oliveira (2003), os

Resultados e discussões

quais relacionam o número de pratos teóricos da coluna com a da distribuição do tempo de residência. Toda metodologia está descrita, conforme item 3.8, em Material e Métodos. O primeiro ponto da curva que está apresentado por uma seta, determina o tempo em minutos, quando se tinha 84,15% de acetona presente no meio. O mesmo fato é observado nos outros dois pontos da curva. A metade do intervalo entre o ponto 84,15% e 15,85 representa o σ . Estes valor dos tempos encontrado na curva e o valor de σ , serão necessários para calcular o número de prato teóricos, conforme a Equação 10. Obtendo-se o número de pratos teóricos, obtem-se a dispersão axial e numero de Peclet , conforme a Equação 9

As Figuras 08, 08 e 10 apresentam a Curva de Distribuição do Tempo de Residência experimental obtida para a solução tampão Tris/HCl na concentração 50 M e pH 7,0, para as resinas Streamline DEAE, StremLine SP e Streamline *Phenyl*, respectivamente.

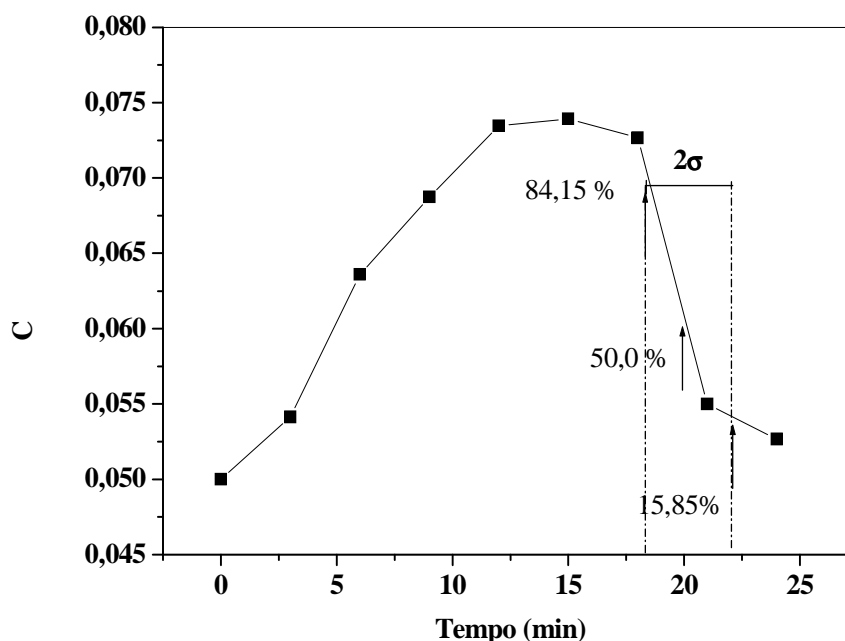


Figura 08: Determinação do Tempo de Residência para a resina Streamline DEAE ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).

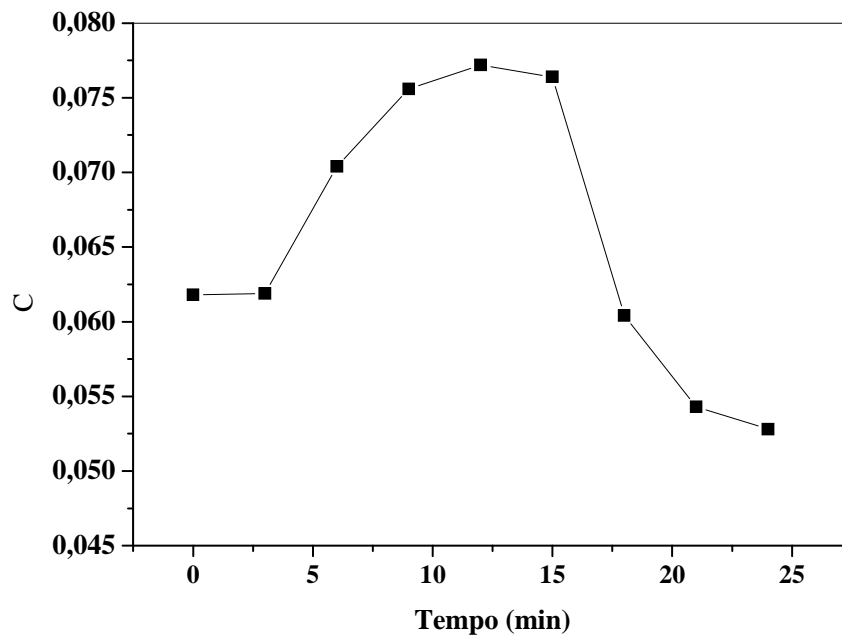


Figura 09: Determinação do Tempo de Residência para a resina Streamline SP ($H_o = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).

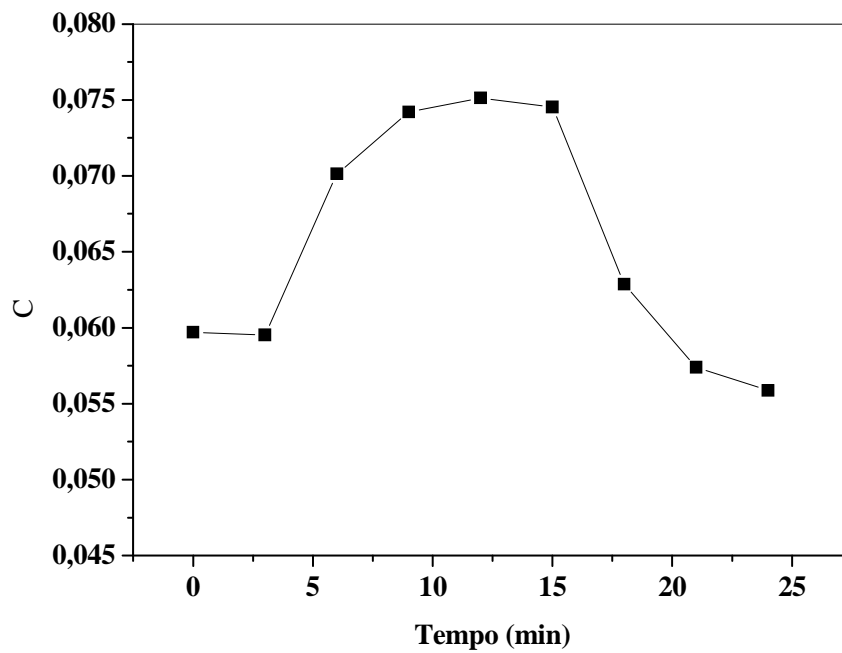


Figura 10: Determinação do Tempo de Residência para a resina Streamline Phenyl ($H_o = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).

Resultados e discussões

A Tabela 09 apresenta os parâmetros N, Pe e D_{axial} para três resinas usadas, quando se utilizou uma altura de leito fixo de 5,0 cm, concentração de Tris/HCl de 50,0 mM, pH 7,0 e velocidade superficial de 300,0 cm/h. Os resultados das outras condições são apresentados no Anexo III.

TABELA 09: Parâmetros estudados (N, Pe e D_{axial})

RESINA	N	Pe	D_{axial} ($\times 10^{-6}$ m ² /s)
Streamline DEAE	109,9	151,17	$5,4 \times 10^{-5}$ m ² /s
Streamline SP	41,53	58,13	1,40
Streamline <i>Phenyl</i>	17,78	25,66	3,70

Nota-se que o número de pratos teóricos variou bastante entre as três resinas estudadas. Obviamente deve-se preferir operar o leito nas condições que favoreçam a existência de um maior número de pratos teóricos (N), uma vez que, o mesmo fornece uma medida direta da eficiência do sistema cromatográfico

Segundo Oliveira (2003), valores acima de 40, para o número de Pe, representa uma baixa dispersão axial dentro da coluna

Através dos valores encontrados para os parâmetros, pode-se concluir que os valores de D_{axial} estão dentro do previsto na literatura para leito expandido. Thommes *et al.* (1996) encontraram valores de D_{axial} na faixa de $6,0 \times 10^{-6}$ a $9,0 \times 10^{-6}$ m² . s⁻¹ em colunas com altura do leito de 6,0 cm e velocidades lineares que variam de 376 a 200 cm.h⁻¹. Oliveira (2003) também encontrou valores bastante semelhantes quando variou a altura do leito inicial de 15 a 25 cm, em tampão Tris 50mM e 35 mM de EDTA, com pH 7,5 e temperatura de 25°C. Tong; Xue; Sun (2003) pesquisaram o comportamento de dispersão axial da fase líquida em leito expandido com resina Streamline DEAE como função da vazão, encontrando valores entre $2,2 \times 10^{-6}$ e $1,1 \times 10^{-5}$ m²/s. Resultados semelhante foi encontrado por Sierra (2007), utilizando a mesma metodologia recomendada por Santos (2001), foi utilizado um tampão fosfato 20 mM e pH 7,0. Os parâmetros Pe e D_{axial} estão intrinsecamente relacionados e altos valores de Pe são indicativos de uma baixa dispersão axial. Um número de Pe igual a 40 é considerado um valor crítico em se tratando de leito expandido. Nesse trabalho nas condições experimentais em que foram obtidos a DTRs com solução tampão, o número de Pe esteve acima do valor considerado crítico Oliveira (2003), exceto para a resina Streamline *Phenyl*. É possível que a acetona, por ser apolar, não seja adequada para ser utilizada como

traçador ao se utilizar resina de interação hidrofóbica. Entretanto, o D_{axial} obtido encontra-se em concordância com a literatura.

4.3 Avaliação da cinética de adsorção das resinas

Avaliou-se a cinética em tanque-agitado a fim de se investigar a capacidade de remoção das proteínas do soro para cada resina. Foram utilizadas as resinas de Streamline SP, Streamline DEAE e Streamline *Phenyl*, na presença dos tampões Tris/HCl, com pHs de 7,0; 7,5 e 8,0, nas concentrações 30, 50 e 70 mM. No entanto, serão apresentadas nas Figuras 11, 12 e 13 as avaliações da cinéticas de adsorção das resinas quando utilizou o soro bruto, no tampão com concentração 50 mM e pH 7,0, e diluído com tampão na proporção de 1:2 e 1:4 para as resinas Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*, respectivamente, pois estes sistemas são os mesmos utilizados nas corridas de adsorção deste trabalho. As outras cinéticas estão apresentadas, na forma de tabelas, no anexo IV (Avaliação cinética de adsorção das proteínas).

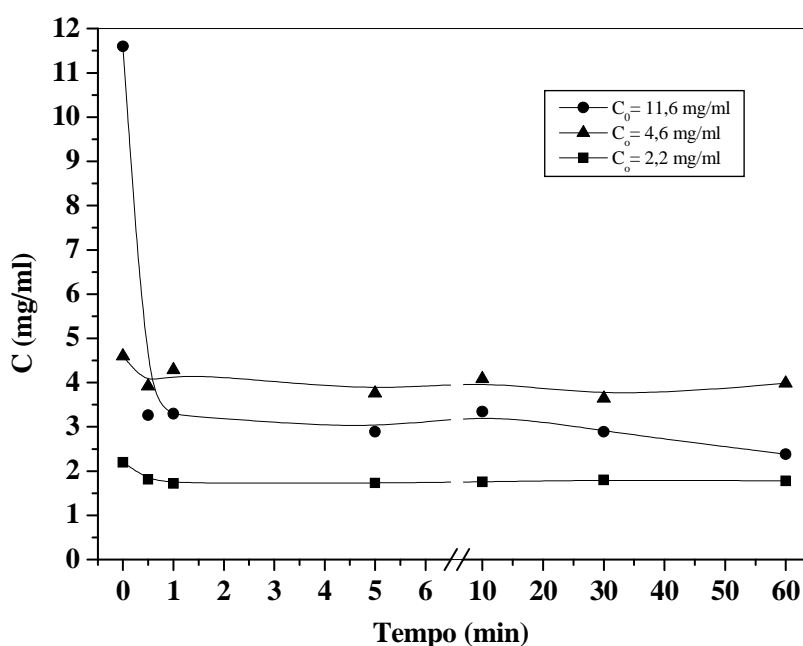


Figura 11: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline DEAE e solução tampão Tris/HCl 50 mM e pH 7,0.

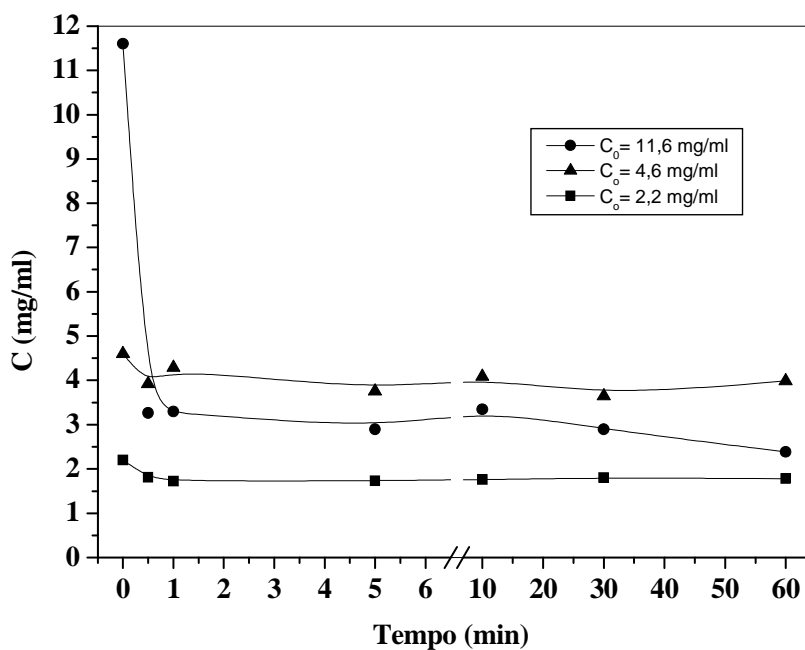


Figura 12: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline SP e solução tampão Tris/HCl 50 mM e pH 7,0.

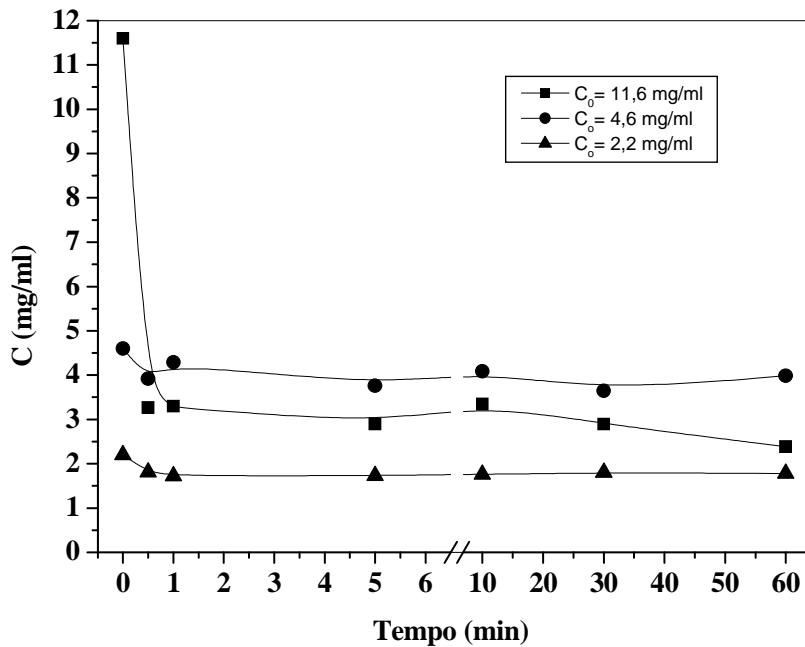


Figura 13: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline Phenyl e solução tampão Tris/HCl 50 mM e pH 7,0.

Resultados e discussões

Observa-se nas Figuras 11, 12 e 13 que as proteínas do soro são adsorvidas na resinas Streamline DEAE, StremLine SP e Streamline™ *Phenyl*, respectivamente. É interessante observar também nas curvas cinéticas, que a concentração de proteína em solução no tanque agitado diminui rapidamente nos primeiros instantes do processo de adsorção, e que após 1,0 minuto a variação da concentração é muito pequena, indicando que o equilíbrio das proteínas na fase fluida e na fase sólida foi alcançado. O mesmo comportamento de adsorção foi observado em outros estudos de cinética de adsorção para a proteína α -lactalbumina (Veredas, 2000), para a enzima β -galactosidase (Perreira, 1999).

Na Tabela 10 estão apresentadas as concentrações de proteínas adsorvidas, no equilíbrio, para as três condições iniciais de concentração de proteína para as três resinas utilizadas.

TABELA 10: Quantidade (mg) de proteínas adsorvidas/mL de resina para as três concentrações iniciais em 30 mL.

CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PROTEÍNA (C_0)			
RESINA	11,6 mg/mL	4,6 mg/mL	2,2 mg/mL
QUANTIDADE DE PROTEÍNA (mg) ADSORIDA/mL DE RESINA			
Streamline DEAE	247,66	15,40	13,18
Streamline SP	284,96	39,77	18,30
Streamline <i>Phenyl</i>	225,10	68,94	12,28

Observa-se na Tabela 10 que para as três condições iniciais de concentração de proteína a quantidade adsorvida na fase sólida para a resina aumenta com o aumento da concentração. Espera-se que, para uma maior quantidade de proteína inicial aumente-se a probabilidade de ocupação do sítio, entretanto havendo limitação de quantidade adsorvida quando se satura os sítios ativos da resina. Para a resina Streamline SP foi possível adsorver aproximadamente 285 mg de proteínas do soro/mL de resina. Esse valor foi 15% maior que a quantidade adsorvida para a resina Streamline DEAE e 26,7% maior que a quantidade adsorvida na resina Streamline *Phenyl*. Destaca-se que foi utilizado um soro *in natura*, ou com suas diluições, ou seja, havia presença de gordura e sais e mesmo assim houve uma considerável adsorção de proteínas do soro para as resinas. Destaca-se, que esse sistema trata

de um típico sistema de adsorção multi-componente e que interações de passante e grupo hidrofóbicos atuam simultaneamente.

Sierra (2007) estudou o processo de adsorção da proteína glicomacropéptídeos proveniente do soro de queijo, em cromatografia de interação hidrofóbica e Tullio (2007), também desenvolveu estudos com o objetivo de isolar e caracterizar o glicomacropéptídeo, utilizando cromatografia de troca iônica. Comparando-se os resultados desses dois trabalhos com os obtidos no presente trabalho observa-se uma coerência quanto a ordem de magnitude das quantidades adsorvidas para as resinas de troca iônica e de interação hidrofóbica. Veredas (2000) estudou as melhores condições de adsorção da α -lactalbumina, empregando adsorventes de troca iônica e interação hidrofóbica, ele observou que a resina de interação hidrofóbica adsorvia melhor que a proteína de troca iônica. Entranto, destaca-se que nesse trabalho Veredas (2000) utilizou um Concentrado Protéico do Soro (CPS) do soro de leite.

4.4- Ensaio de adsorção em leito expandido

Os ensaios de adsorção em leito expandido foram realizados de acordo com o mostrado na Tabela 07, no item 3.9.

As Figuras 14, 15 e 16 apresentam os cromatogramas (curvas de ruptura – *breakthrough*) ao se utilizar as condições apresentadas na Tabela 11, para recuperar as proteínas do soro *in natura* usando a técnica de adsorção em leito expandido com resina de troca aniônica, catiônica e de interação hidrofóbica, respectivamente.

A fase passante representa as proteínas do soro na saída da coluna que não foram adsorvidas na resina.

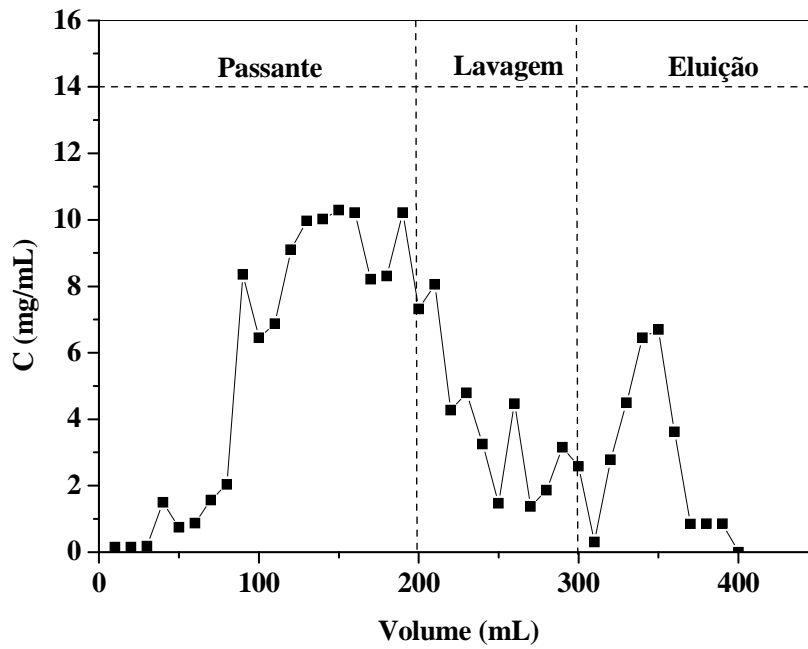


Figura 14: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline DEAE ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).

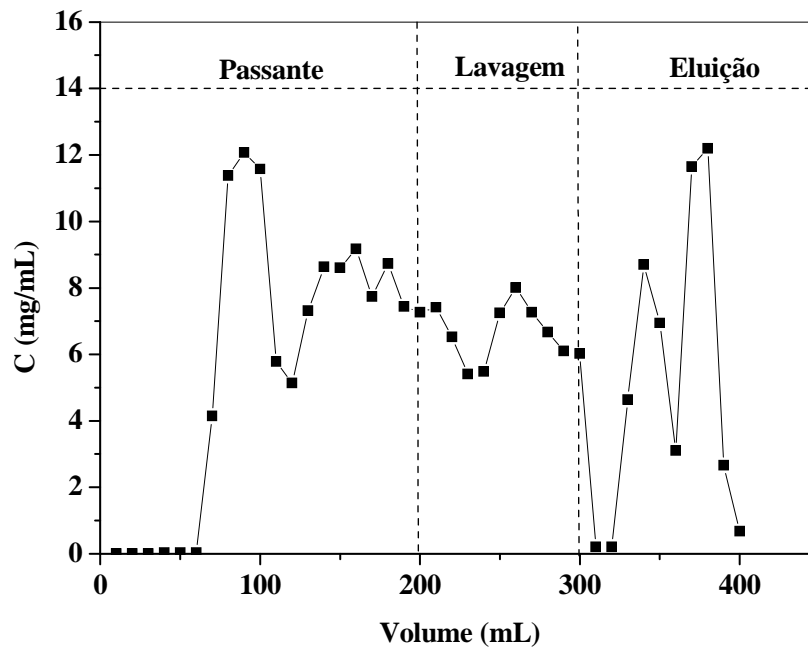


Figura 15: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline SP ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).

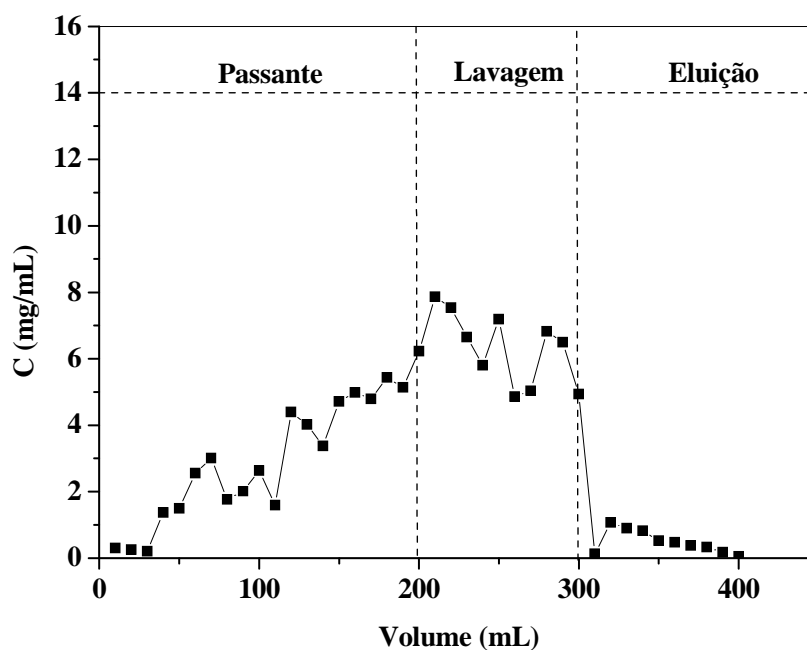


Figura 16: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline *Phenyl* ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).

Observa-se na Figura 14, que as proteínas eluíram em um único pico quando se utilizou a resina Streamline DEAE. Na Figura 15, observa-se que a eluição das proteínas do soro ao se utilizar a resina StremLine SP ocorreu formando dois picos de grande intensidade. A eluição das proteínas do soro para a resina de interação hidrofóbica Streamline *Phenyl*, Figura 16, ocorreu em um pico único, porém mais espalhado.

Nas Tabelas 11, 12 e 13 estão apresentados os dados do balanço de massa para as resinas Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*, e as etapas de passante, lavagem e eluição, respectivamente, quando se utilizou tampão Tris/HCl com pH 7,0 e concentração 50 mM.

Tabela 11: Balanço de massa para a resina Streamline DEAE

ETAPA	V (mL)	PROTEÍNA (mg)	RECUPERAÇÃO (%)
Passante	200	1090,0	66,0
Lavagem	100	300,0	18,0
Eluição	100	267,0	16,0

Massa de proteína inicial: 1650,0 mg

Tabela 12: Balanço de massa para a resina Streamline SP

ETAPA	V (mL)	PROTEÍNA (mg)	RECUPERAÇÃO (%)
Passante	200	1115,0	50,0
Lavagem	100	594,0	27,0
Eluição	100	505,0	23,0

Massa de proteína inicial: 2200,0 mg

Tabela 13: Balanço de massa para a resina Streamline *Phenyl*

ETAPA	V (mL)	PROTEÍNA (mg)	RECUPERAÇÃO (%)
Passante	200	570,0	48,0
Lavagem	100	568,0	48,0
Eluição	100	48,0	4,0

Massa de proteína inicial: 1186,0 mg

Pode ser observado também que ao se aplicar o soro bruto sem tratamento para as três resinas até a saturação (ruptura), embora exista adsorção das proteínas para essas resinas, conforme gel de eletroforese mostrado a seguir para o sistema *Phenyl*-DEAE (Figura 21) perde-se grande parte dessas proteínas nas etapas de passante e lavagem. Essas perdas somam 84, 77 e 96%, para as resinas Streamline DEAE, Streamline SP e Streamline *Phenyl*, respectivamente. Entretanto, pode-se recuperar 16, 23 e 4%, respectivamente, para as três resinas.

As Figuras 17, 18, 19, 20, 21 e 22 apresentam os cromatogramas (curvas de ruptura – *breakthrough*) ao se utilizar a estratégia, conforme Tabela 11, para recuperar as proteínas do soro *in natura* usando a técnica de adsorção em leito expandido combinando as diferentes estratégias, ou seja, combinando-se as técnicas de troca aniônica, catiônica e de interação hidrofóbica, respectivamente.

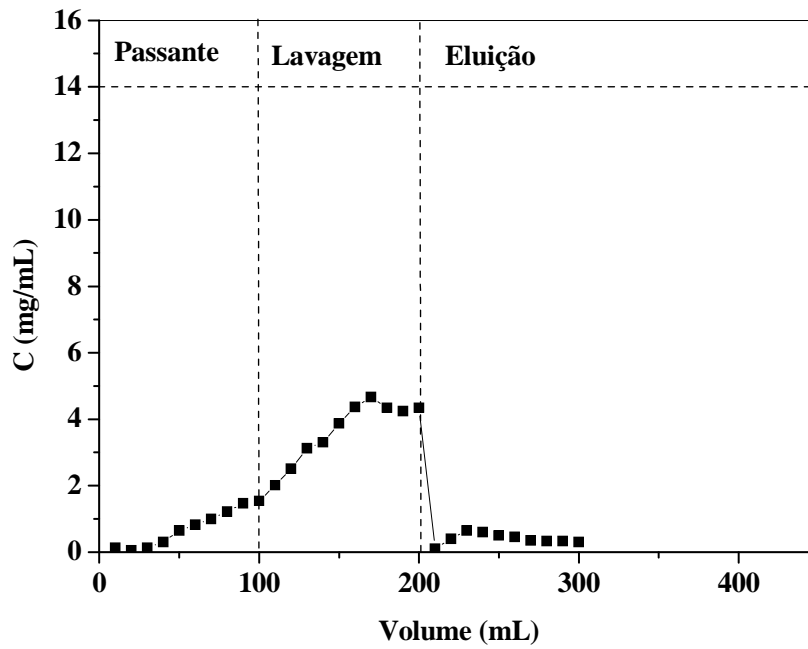


Figura 17: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline *Phenyl* com passante da eluição da resina DEAE ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).

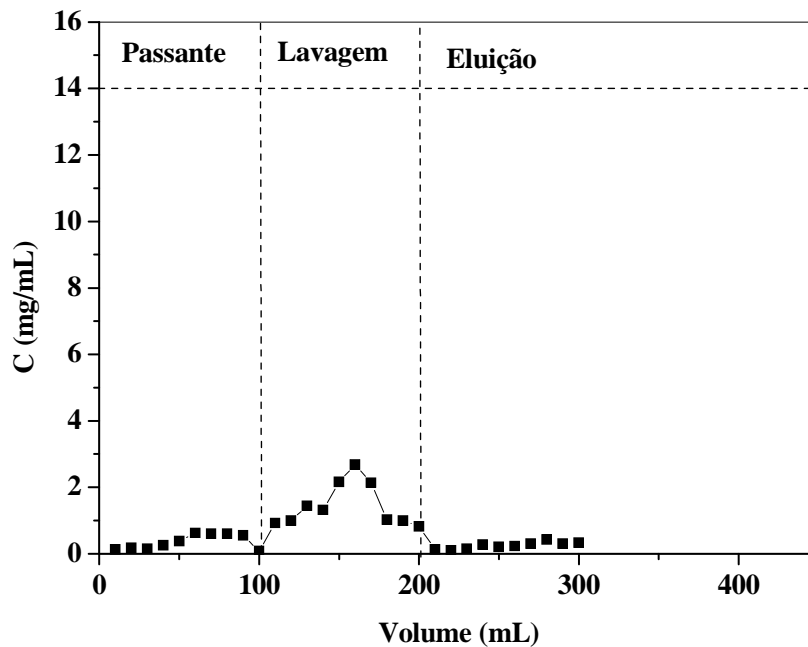


Figura 18 Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline *Phenyl* com passante da eluição da resina SP ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).

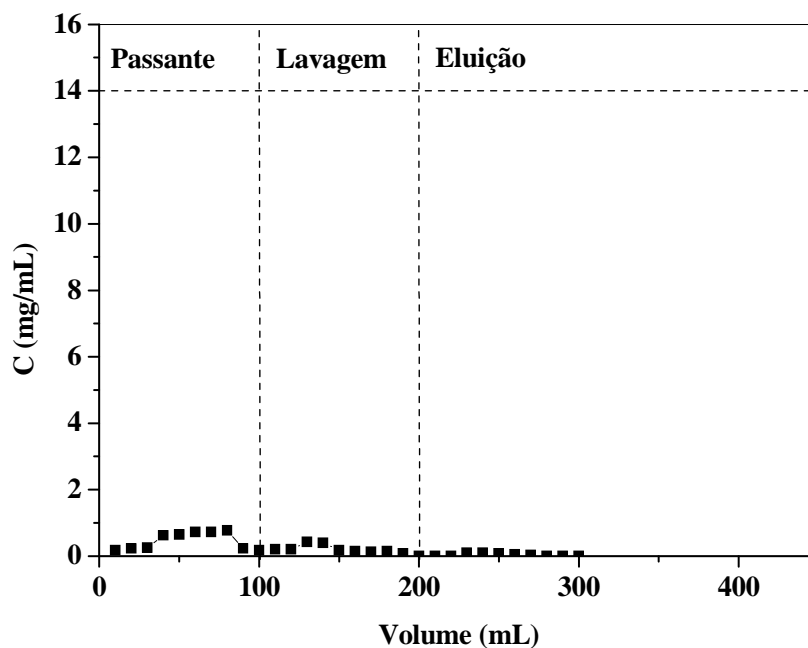


Figura 19: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline *Phenil* com passante da eluição da resina DEAE ($H_o= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).

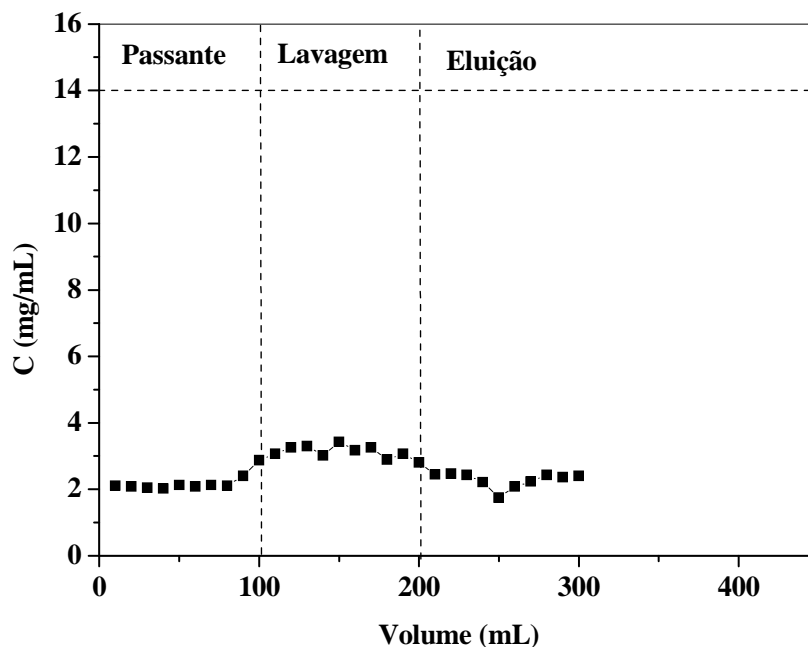


Figura 20: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline *Phenil* com passante da eluição da resina SP ($H_o= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).

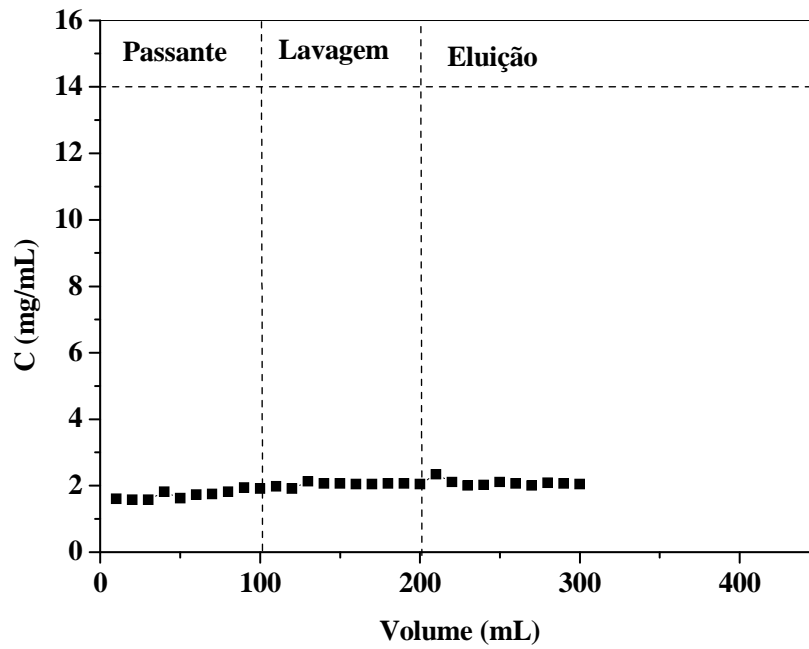


Figura 21: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline SP com passante da eluição da resina DEAE ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).

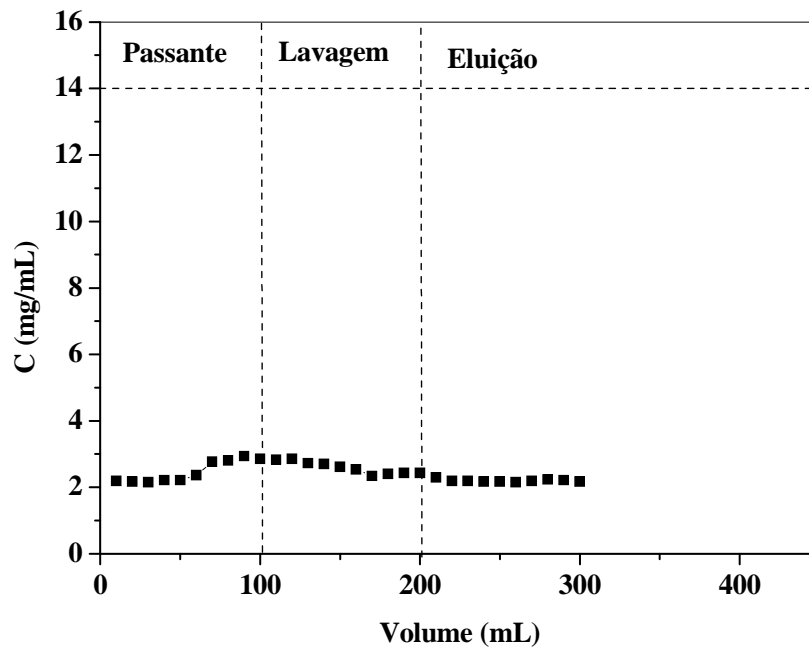


Figura 22: Cromatograma de adsorção das proteínas do soro para a resina Streamline DEAE com passante da eluição da resina SP ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).

Resultados e discussões

Nas Tabelas 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20 estão apresentados os dados do balanço de massa ao se utilizar a estratégia, conforme Tabela 11, para recuperar as proteínas do soro *in natura* usando a técnica de adsorção em leito expandido combinando as diferentes estratégias, ou seja, combinando-se as técnicas de troca aniônica, catiônica e de interação hidrofóbica, respectivamente.

Tabela 14: Balanço de massa quando se utilizou a resina DEAE e a passante foi realizada com o eluido da resina *Phenyl*

ETAPA	V (mL)	PROTEÍNA (mg)	RECUPERAÇÃO (%)
Passante	100	44,0	66,3
Lavagem	100	18,4	27,7
Eluição	100	4,0	6,0

Massa de proteína inicial: 66,4 mg

Tabela 15: Balanço de massa quando se utilizou a resina SP e a passante foi realizada com o eluido da resina *Phenyl*

ETAPA	V (mL)	PROTEÍNA (mg)	RECUPERAÇÃO (%)
Passante	100	195,07	28,6
Lavagem	100	283,27	41,4
Eluição	100	204,00	30,0

Massa de proteína inicial: 683 mg

Tabela 16: Balanço de massa quando se utilizou a resina *Phenyl* e a passante foi realizada com o eluído da resina DEAE.

ETAPA	V (mL)	PROTEÍNA (mg)	RECUPERAÇÃO (%)
Passante	100	65,0	14,8
Lavagem	100	336,0	76,4
Eluição	100	38,0	8,6

Massa de proteína inicial: 440,0 mg

Resultados e discussões

Tabela 17: Balanço de massa quando se utilizou a resina *Phenyl* e a passante foi realizada com o eluido da resina SP.

ETAPA	V	PROTEÍNA	RECUPERAÇÃO
	(mL)	(mg)	(%)
Passante	100	34,5	17,8
Lavagem	100	136,4	70,3
Eluição	100	22,4	11,5

Massa de proteína inicial: 194,0 mg

Tabela 18: Balanço de massa quando se utilizou a resina DEAE e a passante foi realizada com o eluido da resina *Phenyl*

ETAPA	V	PROTEÍNA	RECUPERAÇÃO
	(mL)	(mg)	(%)
Passante	100	44,0	66,3
Lavagem	100	18,4	27,7
Eluição	100	4,0	6,0

Massa de proteína inicial: 66,4 mg

Tabela 19: Balanço de massa quando se utilizou a resina DEAE e a passante foi realizada com o eluido da resina SP

ETAPA	V	PROTEÍNA	RECUPERAÇÃO
	(mL)	(mg)	(%)
Passante	100	155,67	30
Lavagem	100	184,13	35
Eluição	100	186,58	35

Massa de proteína inicial: 527 mg

Tabela 20: Balanço de massa quando se utilizou a resina SP e a passante foi realizada com o eluído da resina DEAE

ETAPA	V (mL)	PROTEÍNA (mg)	RECUPERAÇÃO (%)
Passante	100	221,53	34
Lavagem	100	232,37	36
Eluição	100	197,63	30

Massa de proteína inicial: 651 mg

Pode ser observado também que ao se aplicar a estratégia combinada, conforme Tabela 11, na saturação (ruptura) embora exista adsorção das proteínas para essas resinas, perde-se grande parte dessas proteínas nas etapas de passante e lavagem. Essas perdas somam aproximadamente 91, 81 e 94%, para as combinações na qual se utilizou a Streamline *Phenyl* com o eluído da Streamline DEAE, a Streamline *Phenyl* com o eluído da Streamline SP e a Streamline DEAE com o eluído da Streamline *Phenyl*, respectivamente. Recuperando-se no eluído, 9, 19 e 6%, respectivamente, para as três combinações.

Observa-se que os experimentos onde a resina Streamline *Phenyl* foi utilizada apresentaram os menores rendimentos. Uma possível explicação para esse comportamento é o fato de existir um considerável teor de gordura e de sais no soro *in natura* que influenciam ambos os processos de interação hidrofóbica e de troca iônica. Nesse caso, com uma influência maior sobre a interação hidrofóbica.

Veredas (2000) estudou a purificação da α -lactoalbumina a partir do soro de leite em leite expandido de resinas (Streamline *Phenyl*) e obteve recuperação de até 16,26 %. Oliveira (2003) estudou a influência da temperatura e grau de expansão sobre a recuperação e purificação da α -lactoalbumina a partir de soro de leite bovino em leite expandido de resina hidrofóbica (Streamline *ohenyl*), encontrando rendimento de até 9,35 %. Sierra (2007) encontrou um rendimento no processo de recuperação da glicomacropéptido a partir de soro de leite bovino usando leite expandido e resina de interação hidrofóbica, variando as condições de temperatura e concentração de sal de 19,21. Tullio (2007) desenvolvendo trabalho semelhante ao de Sierra (2007), substituindo a resina de interação hidrofóbica por troca iônica e utilizando também ultrafiltração de membrana de 50 e 30 kDa encontrou um rendimento total do processo de 92,67.

A Figura 23 ilustra um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para o sistema quando se usou a eluição da Streamline *Phenyl* aplicada como passante na resina Streamline DEAE.

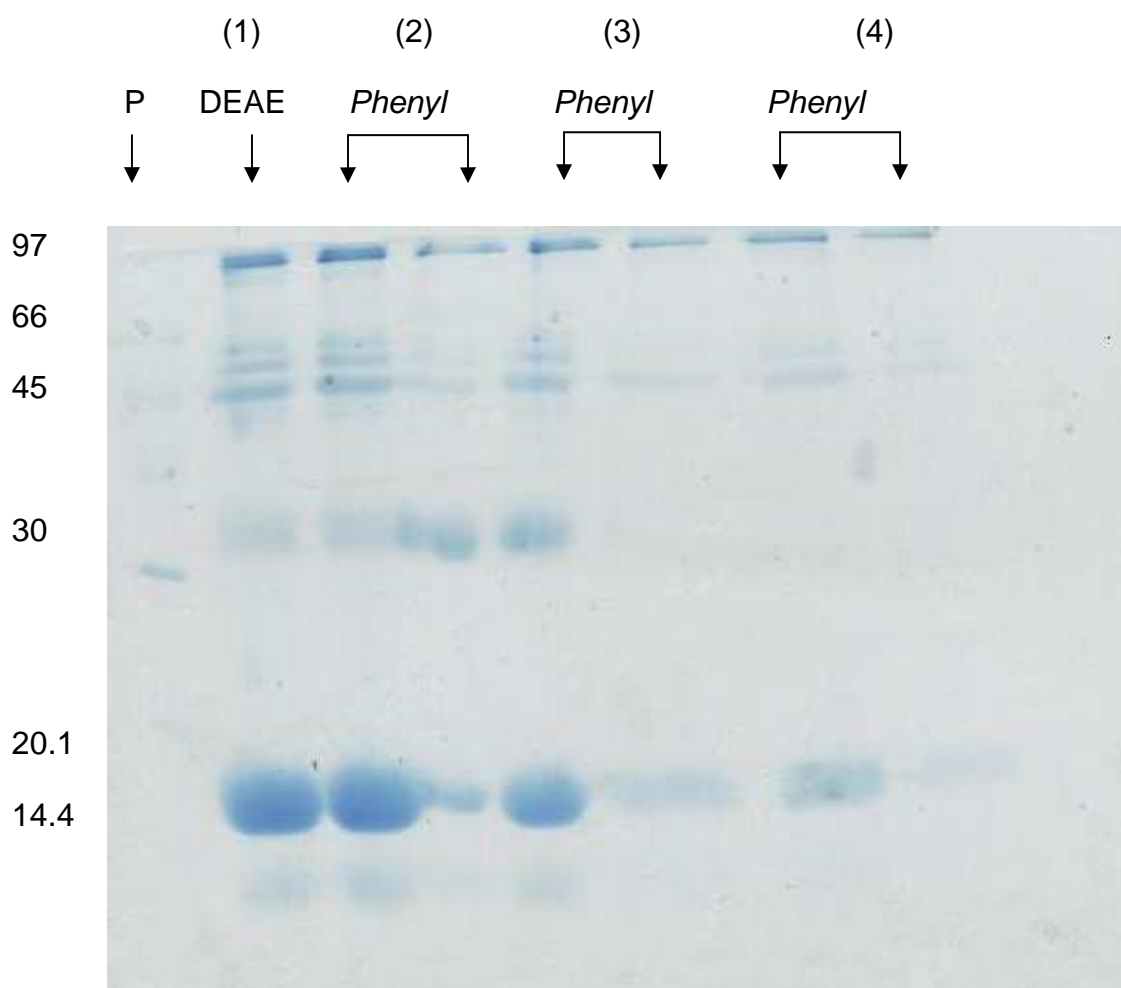


Figura 23: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para o sistema na eluição da Streamline *Phenyl* foi aplicada na resina Streamline DEAE. (P) – Padrão de proteínas (Marcador); (1) Eluição DEAE; (2) Eluição *Phenyl*; (3) Lavagem *Phenyl*; (4) Passante *Phenyl* ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U= 300$ cm/h).

Observa-se na Figura 23 que ao se utilizar esse sistema consegue-se observar pelo menos sete bandas de proteínas no eluído (1) e (2). Dentre essas proteínas consegue-se distinguir uma banda com massa molar maior que 97 kDa, provavelmente referente as imunoglobulinas, 3 bandas protéicas de massa molar entre 66 e 97 kDa, que provavelmente refere-se a albumina (69 kDa), lactoferrina (76 kDa) e lactoperoxidase (89 kDa) e 3 bandas protéicas entre os marcadores de massa molar 45 e 14,4 kDa. Essas bandas provavelmente refere-se β -lactoglobulina (18,3 kDa) e α -lactoalbumina (14 kDa). Pode se observar uma banda protéica de aproximadamente 36 kDa que, provavelmente se refere ao dímero da beta-

Resultados e discussões

lactoglobulina. Fontan (2005) comenta que entre o pH 5,0 e pH 8,0 essa proteína apresenta-se da forma de dímero.

A Figura 24 ilustra um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para a resina Streamline SP, nas etapas de passante, lavagem e eluição.

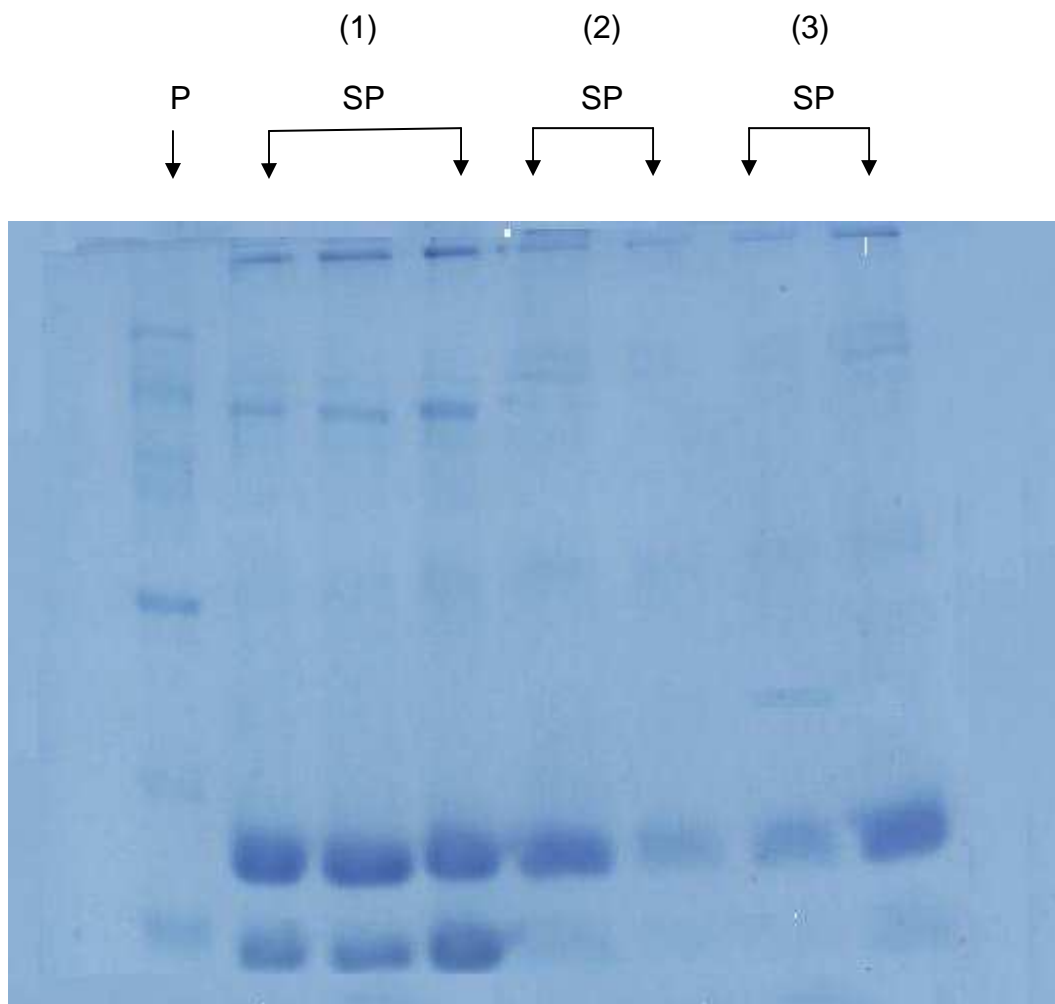


Figura 24: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para Streamline SP (1) Eluição SP; (2) Lavagem SP; (3) Passante SP ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).

Observa-se com maior evidência a presença de duas bandas de proteínas com massa molar próximo de 14,4 e 20,1 do padrão, o que permite supor que seja as proteínas β -lactoglobulina (18,3 kDa) e α -lactoalbumina (14 kDa). Também se pode observar outras bandas de proteínas, dentre essas proteínas consegue-se distinguir uma banda com massa molar maior que 97 kDa, provavelmente referente as imunoglobulinas, 3 bandas protéicas de

Resultados e discussões

massa molar entre 66 e 97 kDa, que provavelmente refere-se a albumina (69 kDa), lactoferrina (76 kDa) e lactoperoxidase (89 kDa)

A Figura 25 ilustra um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para a resina Streamline *Phenyl*, nas etapas de passante, lavagem e eluição

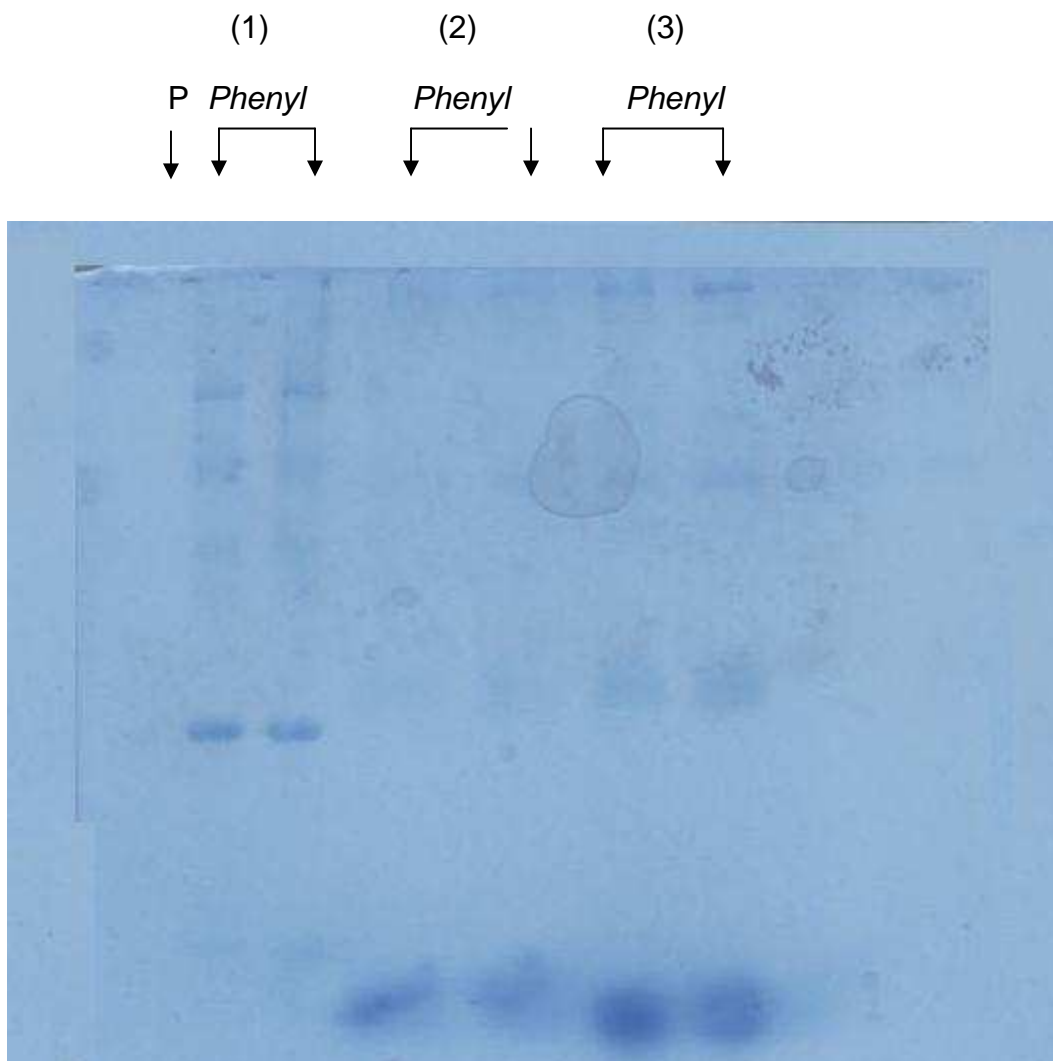


Figura 25: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para o sistema na a eluição da Streamline DEAE foi aplicada na resina Streamline *Phenyl*. (P) – Padrão de proteínas (Marcador); (1) Eluição *Phenyl*; (2) Lavagem *Phenyl*; (3) Passante *Phenyl* ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).

Resultados e discussões

Observa-se que na fase de eluição, onde se remove as proteínas fortemente adsorvida, que não houve presença das proteínas β -lactoglobulina (18,3 kDa) e α -lactoalbumina (14 kDa). No entanto, observa-se a presença do dímero da β -lactoglobulina, que tem massa molecular de 36 kDa e também se pode observar proteínas com banda de massa molar maior que 97 kDa, provavelmente referente as imunoglobulinas, 3 bandas protéicas de massa molar entre 66 e 97 kDa, que provavelmente refere-se a albumina (69 kDa), lactoferrina (76 kDa) e lactoperoxidase (89 kDa).

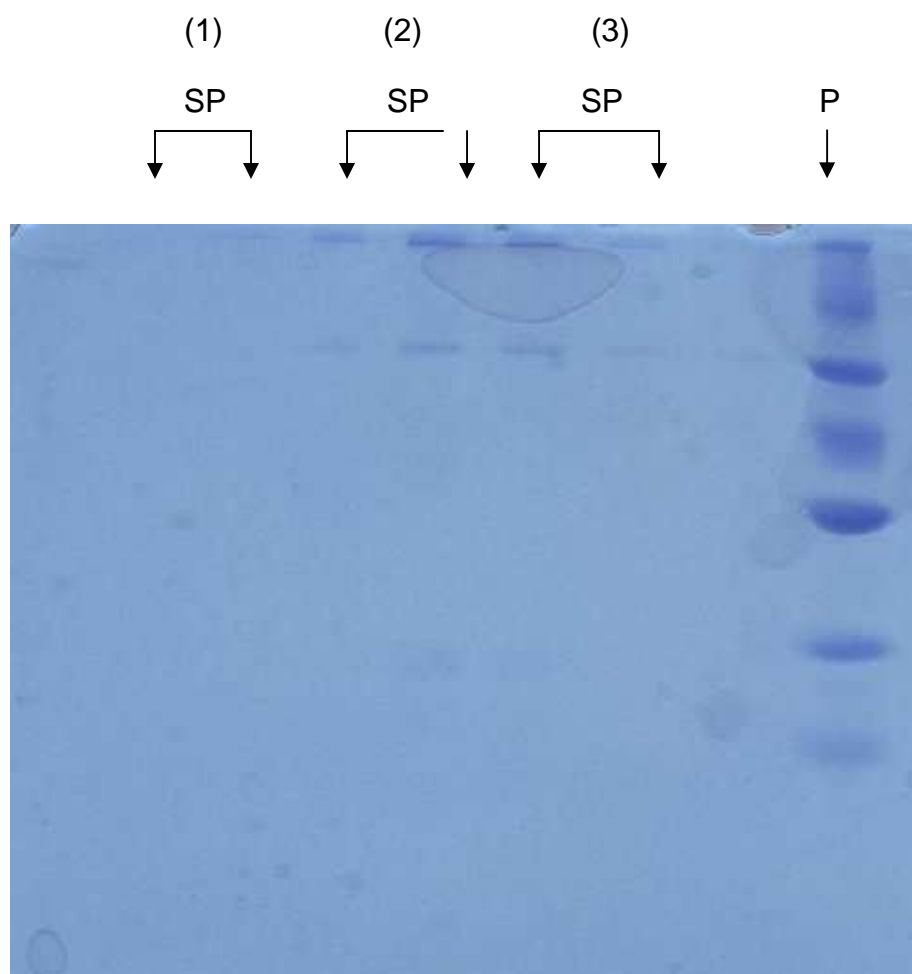


Figura 26: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para o sistema na eluição da Streamline *phenyl* foi aplicada na resina Streamline SP (P) – Padrão de proteínas (Marcador); (1) Eluição SP; (2) Lavagem SP; (3) Passante SP (Ho= 5,0 cm, 50 mM, pH 7,0, U= 300 cm/h)

Observa-se que apenas duas bandas de proteínas de alto massa molar aparecem, na fase aparecem no passante e na lavagem, e comparando com o padrão pode-se surgir que

Resultados e discussões

seja peroxidases e lactoferrina. Este gel representa a aplicação do soro na resina SP, após ter passado na resina *phenyl*, o que pode supor que as proteínas ficaram adsorvidas na resina *phenyl*, ou ter sido perdida no primeiro processo.

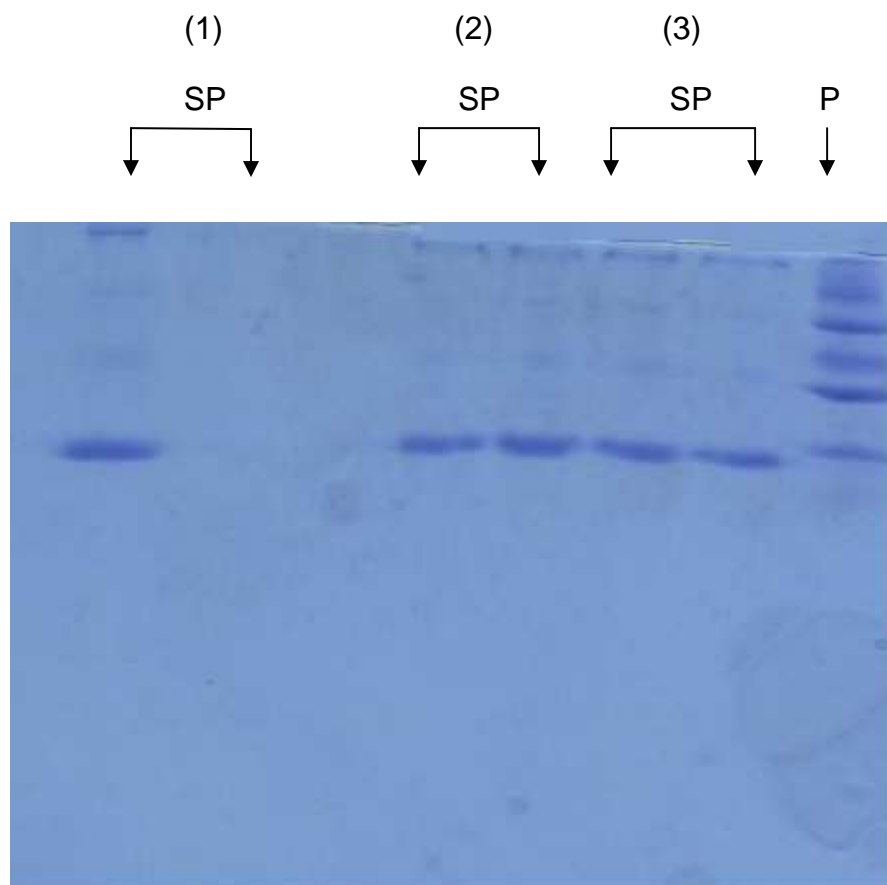


Figura 27: Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para o sistema na eluição da Streamline DEAE foi aplicada na resina Streamline SP (P) – Padrão de proteínas (Marcador); (1) Eluição SP; (2) Lavagem SP; (3) Passante SP ($H_o = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0, $U = 300$ cm/h).

Neste outro gel, observa-se que há presença de 4 bandas de proteínas de peso molecular, segundo o padrão, de massa molar maior que 97 kDa, provavelmente referente as imunoglobulinas, 3 bandas protéicas de massa molar entre 66 e 97 kDa, que provavelmente refere-se a albumina (69 kDa), lactoferrina (76 kDa) e lactoperoxidase (89 kDa)

Resultados e discussões

Para as outras combinações estudadas, o gel de eletroforese não correu, tornando difícil a identificação das bandas protéicas. Dois fatos podem ter contribuído para isso: Um seria a pequena quantidade de proteína presente após o soro ter passado pela primeira resina. E o outro, devido ainda, além da pequena concentração de proteínas, a presença de sais.

Capítulo 06

Conclusão

6. Conclusão

No presente trabalho utilizou-se a técnica de adsorção em leito expandido para se recuperar e purificar as proteínas do soro do queijo do tipo coalho. Os resultados mostraram que:

O grau de expansão das resinas apresentou um tendência linear para todas as resinas. A resina Streamline *Phenyl* apresentou maior expansão, como também maior porosidade, o que é fundamental para aumento de escala, mostrando ser viável para a utilização em leito expandido. O aumento da altura inicial do leito de 5,0 cm para 10,0 cm e para a velocidade estudada, indica que um aumento da altura do leito inicial, a fluidização do leito é mais estável.

Pode-se concluir que não há camada estagnada e, pelo número de pratos teóricos, o sistema formado pela resina Streamline DEAE é a mais eficiente, quando se usa o soro *in natura*.

Os resultados obtidos para a D_{axial} , o número de pratos teóricos e o número de Peclet foram satisfatório para as três resinas estudadas.

Nas curvas cinéticas, a concentração de proteína em solução no tanque agitado diminui rapidamente nos primeiros instantes do processo de adsorção, e após 1 minuto a atingiu o equilíbrio das proteínas na fase fluida e na fase sólida foi alcançado.

Ha um aumento na concentração de proteína adsorvida na fase sólida com o aumento da concentração inicial de proteína. A resina Streamline SP adsorve, na fase sólida, uma concentração maior de proteínas que as outras resinas estudadas.

As três resinas estudadas apresentaram picos de proteínas na eluição. De acordo com esses picos, foram identificadas 6 bandas de proteínas. Provavelmente essas proteínas sejam: albumina (69 KDa), lactoferrina (76 KDa) e lactoperoxidase (89 KDa), beta-lactoglobulina (18,3 KDa) e alfa-lactoalbumina (14 KDa), dímero da beta-lactoglobulina.

Conclusão

A presença de sais minerais no soro de leite interferiu na adsorção de proteínas nas resinas de adsorção iônica, por haver competição nos sítios ativos das resinas por ambos (sais minerais e proteínas).

Devido a presença de gordura no soro de leite, houve uma competição por sítios ativos da resina Streamline *Phenyl*, o que dificultou a adsorção de proteínas.

O sistema formado pela eluição da Streamline DEAE quando foi aplicada na resina Streamline SP, tende a uma melhor purificação das proteínas do soro, principalmente da α -lactoalbumina.

Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, p.187-192, 2001.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH a. Ion Exchange Chromatography-Principles and Methodo. Disponível em: http://fm.uit.no/info/imb/amb/courses/bio360s/pdf_exchange.pdf. Acesso em: jan/2008.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH b. Expanded bed adsorption handbook. Disponível em: http://www.fm.uit.no/info/imb/amb/courses/bio360s/pdf/expanded_bed.pdf 8. Acesso em: jan/2008.

ANTUNES, A.J. *Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino*. Barueri: Manole, 2003. 135 p.

ARRUDA, E. J. *Concentração e purificação de β -amilase de extrato de soja por adsorção em gel de afinidade quitosana-fenilboronato*. 1999. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas.

BARTHEL, C. R., *et al.* A novel ion-exchange method for the isolation of streptomycin. *Chem. Engng. Prog.* v. 54, p. 49-51, 1958.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2 ed. Singapore: McGraw Book Co, 1986.

BASCOUL, A, *et al.* Movents des Particules Solids en Fluidisation Liquide Solide. *The Chemical Engineering Journal*. v.6, p.1340-1350, 1993.

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

Referências Bibliográficas

BONOMO, R. C. F. *Termodinâmica, modelagem e simulação do processo de adsorção e dessorção de BSA e α -lactoglobulina em cromatografia de interação hidrofóbica*. 2005. 128f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

BRAUMAD, C.; AIMAR, P.; DAUFIN, G. When protein fractionation: isoelectric precipitation of α -lactoalbumin under gentle heat treatment. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 56, p.21-28, 1996.

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

CABANNE, C.; NOUBHANI, A. M.; DIERYCK, W.; HOCQUELLET, A.; SANTARELLI, X. Evaluation of three expanded bed adsorption anion exchange matrices with the aid of recombinant enhanced green fluorescent protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Journal of Chromatography B*. v.808, p.91-97, 2004.

CAMPOS, E. S. *Purificação e caracterização de bromelina a partir do extrato bruto de *Ananas comosus* por adsorção em Leito Expandido*. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Tecnológico). Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas.

CARRERE, H. *Extraction des proteines du lactoserum par chromatographie d' echange d'ions en lit fluidise. modelisation et optimisation*. These de Doctoral. Toulouse: L' Institut National Polytechnique de Toulouse. 1993.

CAVALCANTI, J. S.; CHAGAS, B. M. E.; MAGALHÃES, M. M. A.; SANTOS, E. S. adsorção do soro por cromatografia de interação hidrofóbica em leito rxpandido. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ADSORÇÃO, 7, Campina Grande, 2008. Anais..p 229.

CHAGAS, E. M. B.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. *Avaliação preliminar da cinética de adsorção das proteínas do soro de queijo de coalho na resina de troca iônica Streamline DEAE*. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Campinas/SP, 2006.

Referências Bibliográficas

CHANG, Y. K., *et al.* Novel technologies for direct extraction of proteins. *Trans. Inst. Chem. Engs.* v.71, p.299-303, 1993.

CHANG, Y.K; CHASE, H. A. Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering.* v. 49, p.204-216, 1996.

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

CLEMMITT, R.H.; BRUCE, L.J.; CHASE, H.A. On-line monitoring of the purification of GST-(His)(6) from an unclarified *Escherichia coli* homogenate within an immobilised metal affinity expanded bed. *Bioseparation.* v.8, p.53-67, 1998.

COLLINS, C. H. BRAGA, G. L. *Introdução a métodos cromatográficos.* 4 ed. Campinas: UNICAMP, 1990.

CRUZ, J. M. Adsorção de insulina em resina trocadora de íon utilizando leitos fixos e fluidizados. 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas.

DAI-DONG, J. X.; NOVAK, G.; HARDY, J. Stabilization of vitamin C by β -Lactoglobulin during heat treatment. *Science des Aliments,* v. 10, p.393, 1990.

DE LAMOTTE, F. Single step purification of a series of wheat recombinant proteins with expanded bed absorption chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* v.818, p.29-33, 2005.

De WIT, J.M.; HONTELEZ-BACKX, E. Les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum; conséquences des traitements thermiques. *La Techniques Laitiexe,* v.952, mar., p.19-22, 1981.

Referências Bibliográficas

El-Sayed, M.M.H.; CHASE, H. A. Simulation of the breakthrough curves for the adsorption of α -lactalbumin and β -lactoglobulin to SP Sepharose FF cation-exchanger. *Biochemical Engineering Journal*. 2010. 8p.

FACHEL. A. A; CASTRO, G. A. *Estudo da possível relação dieta com proteína isolada de soro de leite bovino e inibição de tumor em camundongos*. São Paulo: 2004. 22f. Monografia (Disciplina de Ciclo celular da célula normal e cancerosa). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Departamento de Radiologia. Programa de Pós-Graduação em Oncologia.

FERNADEZ-LAHORE, H. M.; LIN, D.-Q.; HUBBUCH, J. J.; KULA, M.-R. and THOMMES, J. The use of ion-selective electrodes for evaluating residence time distributions in expanded bed adsorption systems, *Biotechnology Progress*, n.17, p.1128 –1136, 2001.

FERNANDEZ-LAHORE, H.M., *et al.* The influence of cell adsorbent interactions on protein adsorption in expanded beds. *Journal of Chromatography A*. v.873, p.195-208, 2000.

FLORENTINO, E. R. Aproveitamento do soro de coagulação enzimática. 2006. 137f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

FONSECA, L. P. Produção e purificação de penicilina acilase de *Escherichia coli*. 1995. 300f. Tese (Doutorado). Universidade Técnica de Lisboa.

FOSUM, E. Nutritional evaluation of whey protein concentrates and their fractions. *Journal of Dairy Science*, v.57, n.6, p.665-670, 1974.

FONTAN, R. C. I Termodinâmica e modelagem da adsorção de sistema mono e multicomponentes composto por α -lactalbumina e β -lactoglobulina. 2005. 90 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa.

Referências Bibliográficas

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, p. 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*, v. 16, p. 57-63, 1997.

GAUTIER, S. F.; POULIOT, Y. Function and biological properties obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 78-87, 2003.

GOPAL, D.; PRINCE, I.; HEARN, M.T.W. high-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. CXXIV. Physical Characterisation of Fluidized-Bed of Chromatographic Packing Materials. *Journal Chromatography*, v.631, p.115-124, 1993.

GORNALL, A. G.; BORDAWILL, C. S.; DAVID, M. M. The determination of protein by the biuret reaction. **Journal Biology Chemistry**, v. 177, p. 751-780, 1949.

HA, E.; ZEMEL, M. B. Functional properties of whey components and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). *J. Nut. Biochem.*, v. 14, p.251-258, 2003.

HANSSON, M. *et al.* Single-step recovery of a secreted recombinant protein by expanded bed adsorption, *Bio/Technology* , vol. 12, p. 285-288, 1994.

HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev. Nutr.* v.19, n.4, p.479-488, jul./ago, 2006.

Referências Bibliográficas

HIDALGO, J.; CAMPER, E. Solubility and heat stability of whey protein concentrates. *Journal of Dairy Science*, v.60, n.1515, 1977.

HIDAYAT, C.; TAKAGI, M.; YOSHIDA, T. Expanded bed adsorption for purification of alcohol dehydrogenase using a dye-iminodiacetic acid matrix. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v.97, p.284-287, 2004.

HUFFMAN, L.M. Processing whey protein for use as a food ingredient, *Food Technology*, v.50, n.2, p.49-52, 1996.

HUSSEINI, M.; SHOJAOSADATI, S. A.; TOWFIGHI, J. Application of a bubble-column reactor for the production of a single-cell protein from cheese whey. *Ind. Eng. Chem. Res.* v.42, p.764-766, 2003.

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

JONAS, J. J.; CRAIG, T. W. HUTTON, R. L.; MARTH, E. H.; SPECK-MAN, E. W; STEIN, T. F.; WEISBERG, S. M. Products as food protein resources. *J. milk food tecnology*. V. 39. p. 778-95. 1976

JULIANO, A.M.M.; PETRUS, J.C.C.; TORRANO, A.D.M. Recuperação por ultrafiltração das proteínas do soro para produção de queijos. *Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v.42, p.3-6, 1987.

KALIL, S.J.; MAUGERI-FILHO, F.; RODRIGUES, M.I. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracelular inulinase from *Kluyveromyces arxianus*. *Process Biochemistry*. v.40, p.581-586, 2005.

KAWASAKI, T. Hydroapatite as a liquid chromatography packing. *J. Chron.*, v. 544, p. 147-184, 1991.

Referências Bibliográficas

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus sp.* *Cienc. Tecnol. Aliment.* v.24, n2, p.267-292. 2004

KOSIKOWSKI, F. V. Whey utilization and whey products. *Journal Dairy Science*, v. 62, p. 1149-1160, 1979.

KUSSENDRAGER, K. D.; VAN HOOIJDONK, A. C. M. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, v. 84, p. 19-25, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685, 1970.

LAW, D.; LEARY, R. O.; PUJAR, N. S. Future of antibody purification. *J. Chromatog.B.* v. 848, p. 48-63, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Principios de Bioquímica*. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LIHME, A.; ZAFIRAKOS, E.; HANSEN, M.; OLANDER, M. Simplified and more robust EBA processes by elution in expanded bed mode. *Bioseparation*. v.8, p.93-97, 1998.

LINDAHL, L.; VOGEL, H. J. metal ion dependent hydrophobic interetion hromatography of α -lactoalbumins. *Analytical Biochemistry*. v. 140, p.394-402, 1984.

MALDONADO, R. F. *Produção, purificação e caracterização da lipase de Geotrichum candidum obtida a partir de meios industriais*. 2006, 142 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de campinas.

Referências Bibliográficas

MAKINO, Y., *et al.* Adsorption of the inulinase From *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7471 on Streamline® DEAE Resin. *Brasiliano Journal of Chemical Engineering*, v. 22, n. 04, p.539-545, 2005.

MATHUR, B. N.; SHAHANI, K. M. Use of total whey constituents for human food. *Journal of Dairy Science*, v. 62, n. 1, p. 99-105, 1979.

MATSUMOTO, H.; SHIMOKAWA, Y.; ISHIDA, Y.; TOIDA, T.; HAYASAWA, H. New biological function of bovine α -lactoalbumin: protective effect against ethanol and stress-induced gastric mucosa injury in rats. *Biocience Biotechnology Biochemistry*, v. 65, n. 1, p.104-111, 2001.

MATTIASSON, B.; NANDAKUMAR, M.P. Binding assays in heterogeneous media using a flow injection system with an expanded micro-bed adsorption column. *Bioseparation*. v. 8, p.237- 245, 1998.

McCREATH, G. E., *et al.* Expanded bed affinity chromatography of dehydrogenases from baker's yeast using dye-ligand perfluoropolymer supports. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 48, p.341-354, 1995.

MELLO, E. M. Obtenção e caracterização de concentrado protéico de soro de queijo por ultrafiltração. Campinas: 1989. 118f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade de Campinas.

MILKPOINT. Disponível http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/Producao_Estado.htm. Acessado em 20 de março de 2010.

MODLER, H.W. Milk processing. In: NAKAI, S.; MODLER, W. (Eds.). Food proteins: processing applications. Wiley-VCH, Inc., 2000. p.1-21.

Referências Bibliográficas

MORENO, Y.M.F. Influência das proteínas do soro de leite bovino no estado nutricional, composição corporal e sistema imune em corte de crianças com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Campinas: 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MORR, C. V.; HÁ, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: Processing and function properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. v. 33, n.6, p.1-476, 1993.

NAGAOKA, S.; KANAMARU, Y.; KUZUYA, Y. Effects of whey protein and casein on the plasma and liver lipids in rats. *Agriculture and Biological Chemistry*, Tokyo, v. 55, n. 3, p. 813-818, 1991.

NAOUM, P. C. *Eletroforese – Técnicas e Diagnósticos*. São Paulo: Livraria e Editora Santo, 1990.

NÓBREGA, E. S.; VEREDAS, V.; OLIVEIRA, L. S.; SANTANA, C. C. Separação e purificação da lactoperoxidase e da lactoferrina do soro do leite bovino por cromatografia de troca iônica em leito fixo. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 12, 2000.

NOPPE, W., *et al.* A simplified purification procedure of α -lactalbumin from milk using Ca^{2+} -dependent Adsorption in hydrophobic expanded bed chromatography. *Bioseparation*. v. 8, p. 153-158, 2000.

NOPPE, W.; HANSSENS, I.; DE CUYPER, M. Simple two-step procedure for the preparation of highly active pure equine Milk lysozyme. *Journal of Chromatography A*, v. 719, p.327-331, 1996.

NEVES, B.S. Elaboração de bebidas lácteas a base de soro. Artigo Técnico. Rev. Leite e Derivados, n.10, p. 50-54, 1993.

OLIVEIRA, L. S. C. 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

Referências Bibliográficas

expandido de resina hidrofóbica. 2003. 147f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

OWEN, R.O.; CHASE, H.A. Direct purification of lysozyme using continuous countercurrent expanded bed adsorption. *Journal of Chromatography A*. v.757, p.41-49, 1997.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. T. B.; BALDINI, V. L.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos do soro de leite. *Ciência Tecnologia Alimentos*, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005.

PALSSON, E.; AXELSSON, A.; LARSSON, P.O. Theories of chromatographic efficiency applied to expanded beds. *Journal of Chromatography A*.v.912, p.235-248, 2001.

PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*. 1ª ed., Barueri-SP: Editora Manole Ltda, 2005, 448p.

PESSOA JUNIOR., A.; HARTMANN, R.; VITOLO, M.; HUSTEDT, H. Recovery of extracellular inulinase by expanded bed adsorption. *Journal of Biotechnology*. v.51, p.89-95, 1996.

PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY GUIDE, Junho de 1993.

PINOTTI, L.M. Produção e purificação de penicilina G Acilase. 2003. 303 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de São Carlos, São Carlos.

PONSANA, E. H. G.; PINTO, M. F.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Soro de leite – obtenção características e aproveitamento: revisão. *Semina: Ci Agr.*, v. 13, n. 1, p.92-96, 1992.

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

Referências Bibliográficas

RECIO, I.; VISSER, S. Antibacterial and Binding Characteristics of Bovine, Ovine and Caprine Lactoferrins: a comparative study, *International Dairy Journal*, vol. 10, p. 597-605, 2000.

REDE AMBIENTE. Educação Ambiental. Disponível em: [HTTP:redeambiente.org.br/dicionário.asp?letra=Deid_word=236](http://redeambiente.org.br/dicionário.asp?letra=Deid_word=236). Acesso em: 17 de jan. 2007.

RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo: perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. *Food Ingredients*, v. 3, n. 17, p. 20-27, 2002.

RICHARDS, N. S. P. S. Uso racional do soro lácteo. *Revista Industria de Laticínios*, v. 2, n.9, p. 67-69, 1997.

SADANA, A. BEELARAM, A. .M Efficiency and economics of bioseparation: some case studies. *Bioseparation*. v. 4, p. 221-223, 1994.

SANTANA, J. C. C. *Caracterização e recuperação das enzimas α e β -amilase por sistema de adsorção em leito expandido*. 2006, 194f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

SANTOS, E. S., *Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leito expandido*. 2001. 152f. Tese (Doutorado em Engenharia Química. Faculdade de Engenharia Química. Universidade de Campinas.

SAPDING, B. J. Downtream processing: key to slashing production coast 100 fold. *Bio/Technology*. v. 9, p. 229-233, 1991.

SERRANO, M. E. D. Actividades antibacterianas de lactoferrina. *Enf. Inf. .Microbiol.* v.26, n.2, p.58-63. 2006.

Referências Bibliográficas

SEVERO JUNIOR, J. B. *et al.* Comparação entre α -amilase cristalizada e purificada por adsorção em leite expandido com resina de troca iônica. *Brazilian Journal of food technology*. v. 10, n. 1, jan/mar, 2007.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.8, n.1, p.43-56, jan./mar, 2005.

SIERRA, O. A. P. *Adsorção de glicomacropéptido por interação hidrofóbica em leite expandido*. 2007, 105f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, K. Sorvetes com diferentes produtos de soro de leite bovino: avaliações sensoriais, físico-químicas e ultra-estruturais. 2004. 125f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade de Campinas.

SINGLETON, A.D. *The use of whey in dairy products*. Illinois, 1972.

SISO, M. I. G. The biological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, v. 57, p. 1-11, 1996.

SMITHERS GW, *et al.* New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, v. 79, p; 1454-1459, 1996.

SOUSA, R. C. S. *Separação da lisozima, conalbumina e ovalbumina presentes na clara do ovo: aspectos tecnológicos e termodinâmicos*. 2008, 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa.

TARDIOLI, P.W.; PEDROCHE, J; GIORDANO, R.L.C.; FERNANDEZ-LA FUENTE, R.; GUIBAN, J.M. Hidrolysis of proteins by immobilized-stabilized alcalase-glyoxyl agarose. *Biotechnol. Prog.*, v. 19, p. 352-360, 2003.

TECNINVEST. Estudo de mercado do soro lácteo em Portugal (T90101/2000). Associação Nacional dos Industriais de Lacticínios, 2000.

Referências Bibliográficas

THELEN, T.V.; RAMIREZ, W.F. Bed-height dynamics of expanded beds. *Chemical Engineering Science*. v.52,p. 3333-3344, 1997.

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*, v.964, p.77-89, 2002.

THÖMMES, J.; BADER, A.; HALFAR, M. KARAU, A. Isolation of monoclonal Antibodies from Cell Containing Hybridoma Broth using a protein A coated adsorbent in Expanded Beds. *Journal Chromatography A*. v. 752, p. 111-122, 1996.

THÖMMES, J.; WEIHER, M.; KARAU, A.; KULA, M-R. Hydrodynamics and performance in fluidized bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 48, p. 367-374, 1995.

TIMMER, C. J. *Dental care product*. European Patent Application 1449513. 2004.

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. 261-271, 2003.

TORRES, D.P.M. *Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino. Comportamento de sistemas aquosos mistos péptidopolissacarídeos*. 2005. 118p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia/ Engenharia de Bioprocessos). Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Braga.

TSUDA, H. *et al.*, Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin, *Mutation Research*, vol. 462, p. 227-233, 2000.

TULLIO, L. T. Isolamento e caracterização do glicomacropéptido do soro de leite. 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná.

USDEC News Ingredients. *Versatilidade dos ingredientes lácteos*, v. 4, n. 4, São Paulo, 2002.

Referências Bibliográficas

USDEC, U.S. Dairy export council. Disponível em: <http://www.ustec.org>. Acesso em: março de 2003.

VEREDAS, V. Purificação da α -Lactalbumina a partir do Soro de Leite em Leito Fixo e Expandido de Resinas. 2000. 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas.

VIEIRA, M. C. Conservação do soro de queijo minas com peróxido de hidrogênio. 1984. 66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agroquímica). Universidade de Viçosa.

VON SPERLING, M. *Introdução à qualidade e ao tratamento de esgotos*. Editora UFMG: Belo Horizonte, v. 1, 3 ed., 2005.

VOUTE, N.; BOSCHETTI, E. Highly dense bed sorbents suitable for Fluidized bed Applications. *Bioseparation*, v.0, p. 115-120, 1999.

WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 42, p. 353 - 375, 2002.

WIT J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 597-608, 1998.

WONG, D.W.S.; CARMIRAND, W.M.; PAVLAT, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* v.36, n.8, p.807-844, 1996.

YEMIKO, M. Seleção de linhagens de produtoras de inulinase visando a obtenção de frutooligossacarídeos: caracterização na enzima e otimização das etapas de produção e purificação. 2005. 198f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas.

ZYDNEY, A. L., Protein separations using membrane filtration: New Opportunities for Whey Fractionation. *International Dairy Journal*, v. 8, p.243-250, 1998.

ANEXO I
Grau de expansão

Grau de expansão

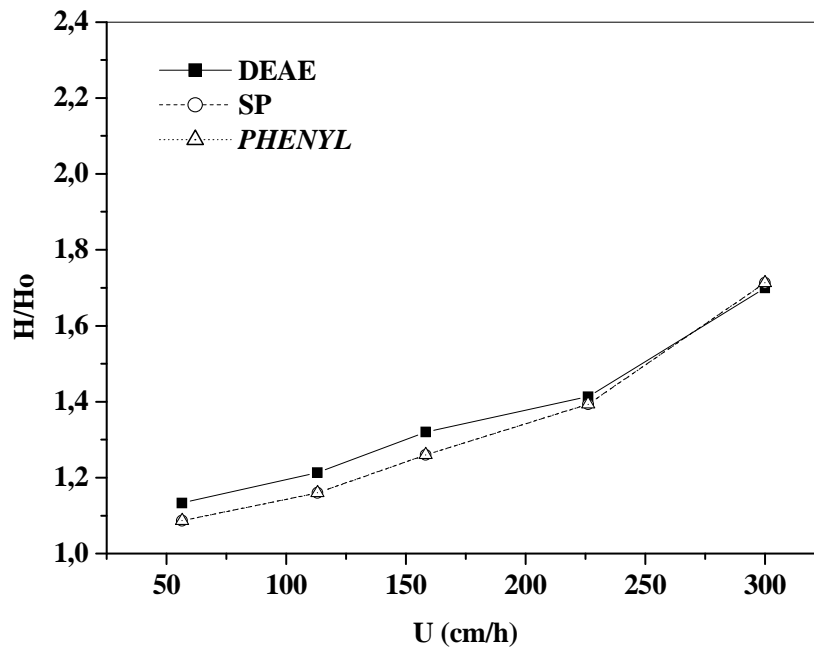


Figura A1.1: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 30 mM, pH 7,0).

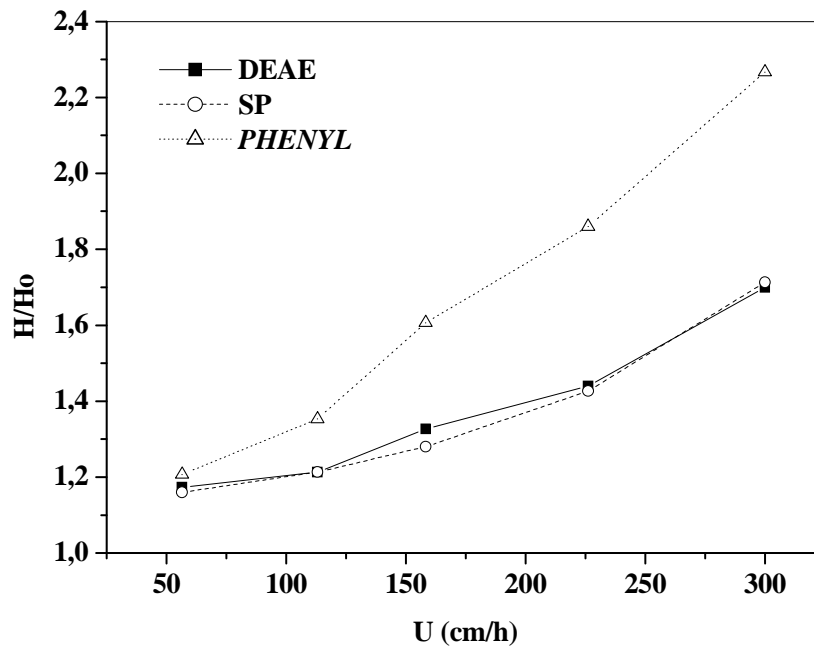


Figura A1.2: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 30 mM, pH 7,5).

Grau de expansão

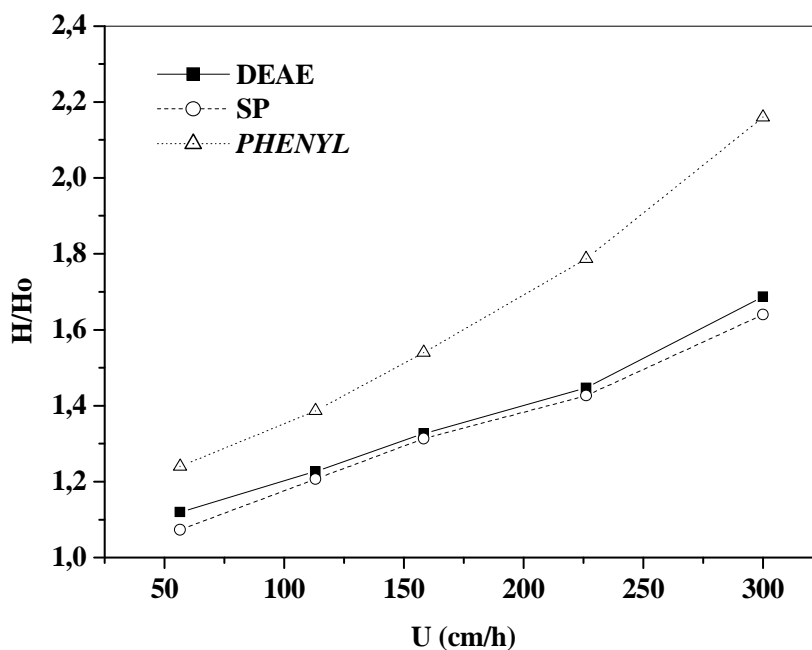


Figura A1.3: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0= 5,0$ cm, 30 mM, pH 8,0).

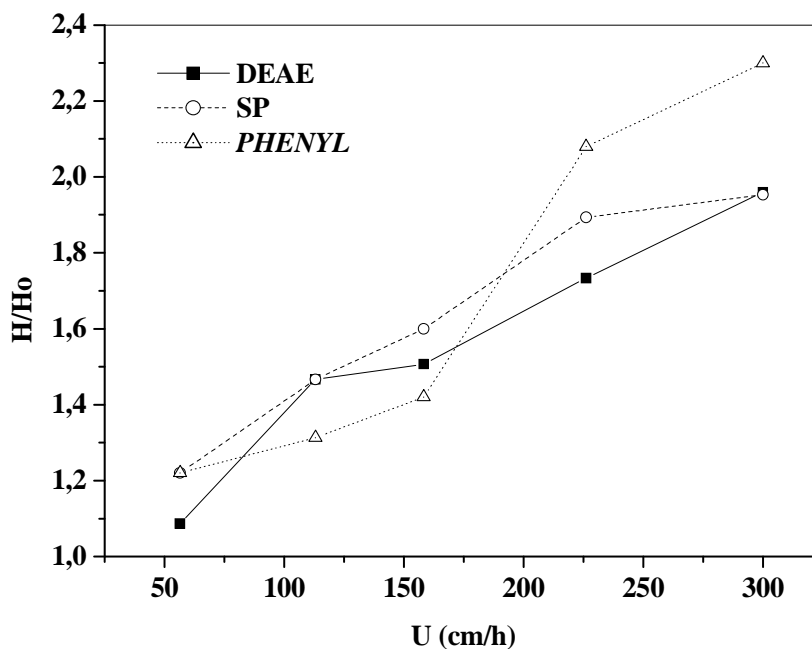


Figura A1.4: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0= 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0).

Grau de expansão

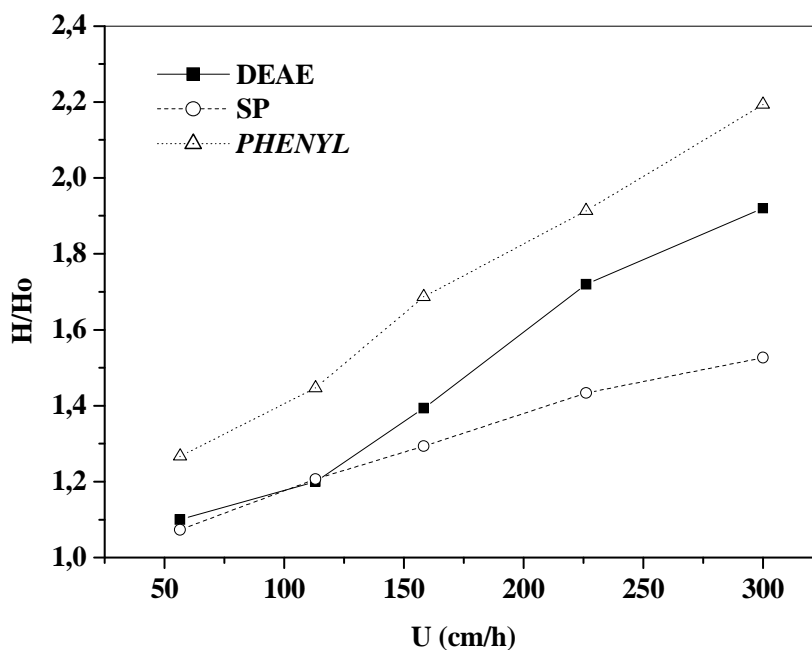


Figura A1.5: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,5).

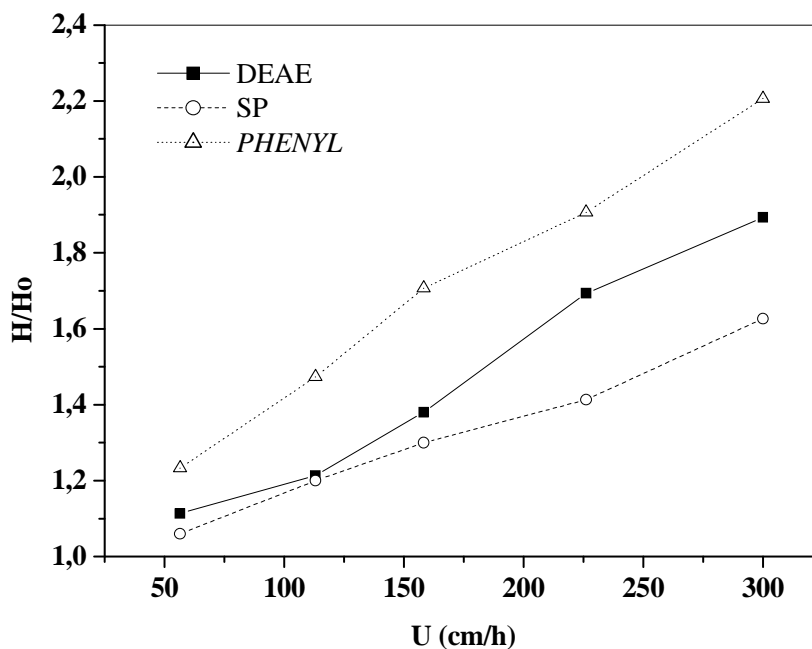


Figura A1.6: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 8,0).

Grau de expansão

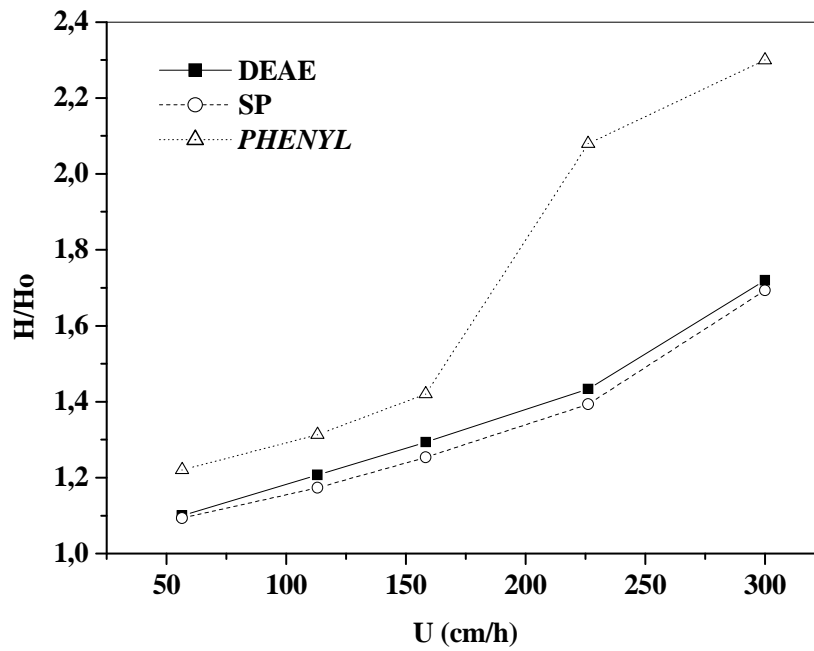


Figura A1.7: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 70 mM, pH 7,0).

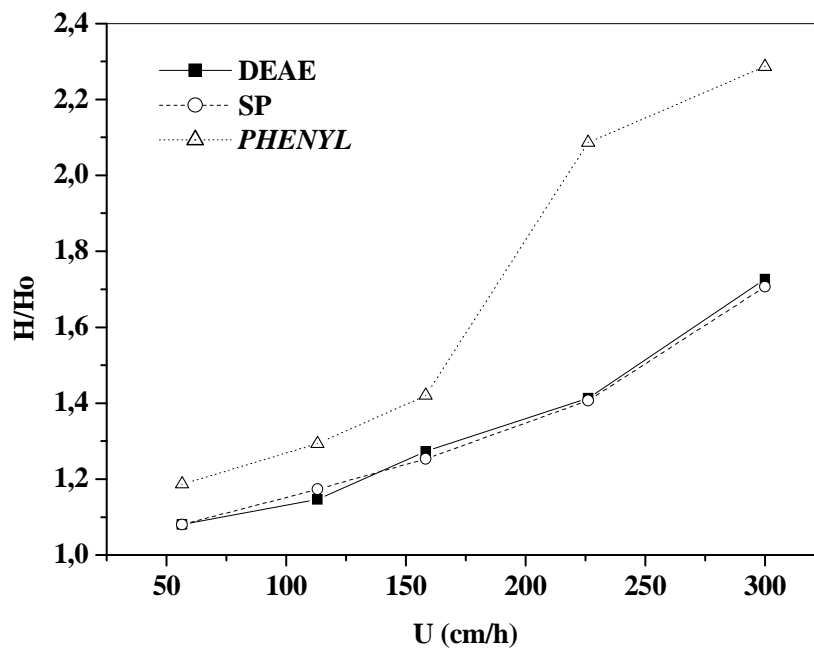


Figura A1.8: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 70 mM, pH 7,5).

Grau de expansão

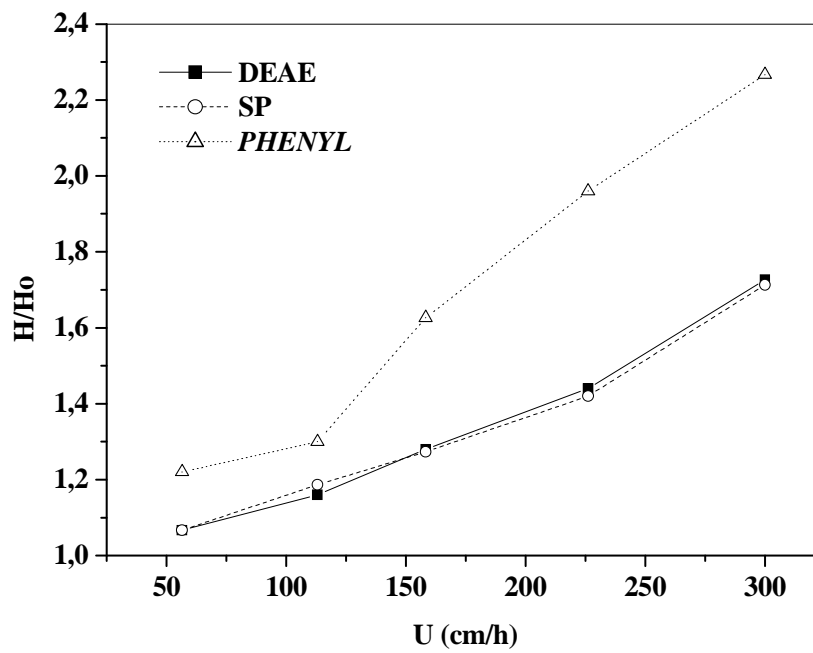


Figura 33: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 70 mM, pH 8,0).

Grau de expansão

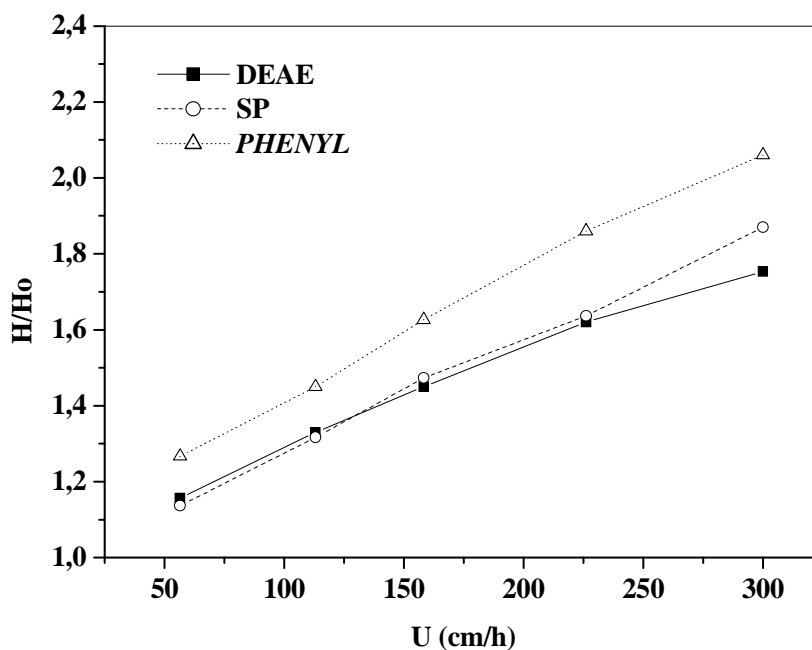


Figura A1.10: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e PHENYL ($H_0 = 10,0$ cm, 30 mM, pH 7,0).

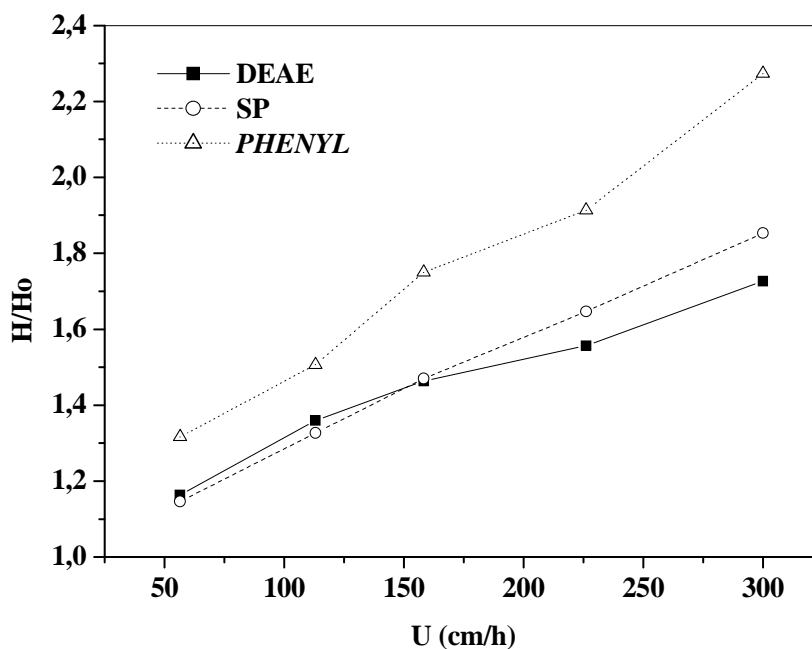


Figura A1.11: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e PHENYL ($H_0 = 10,0$ cm, 30 mM, pH 7,5).

Grau de expansão

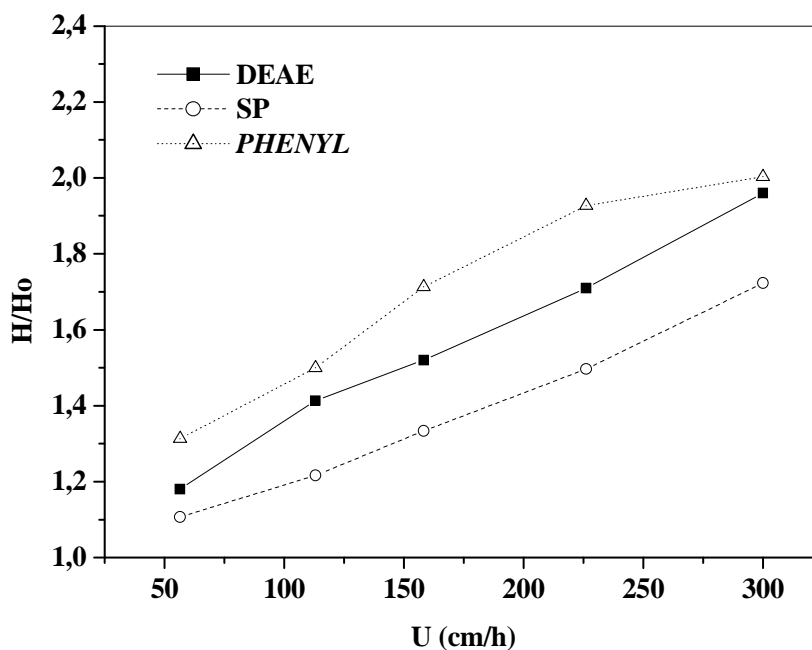


Figura A1.12: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e PHENYL ($H_0 = 10,0$ cm, 30 mM, pH 8,0).

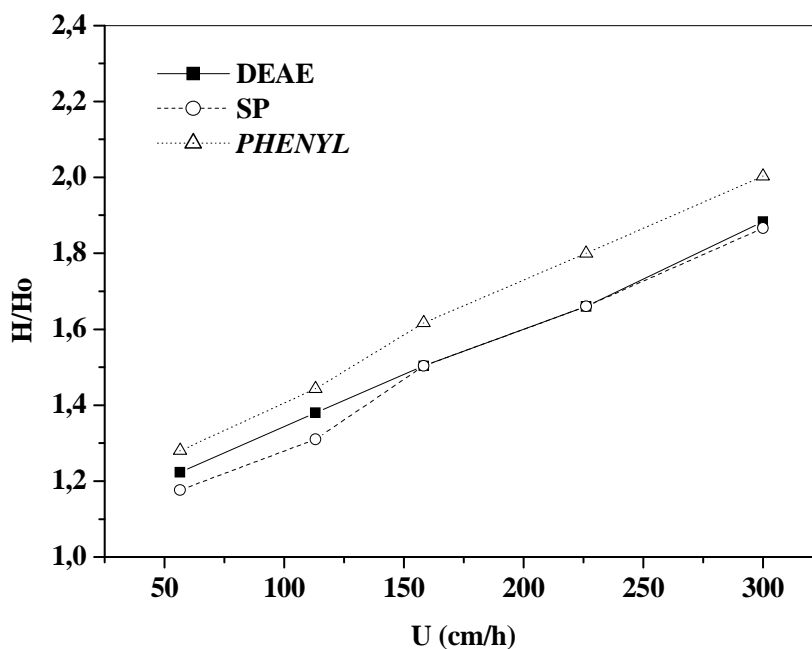


Figura A1.13: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e PHENYL ($H_0 = 10,0$ cm, 50 mM, pH 7,0).

Grau de expansão

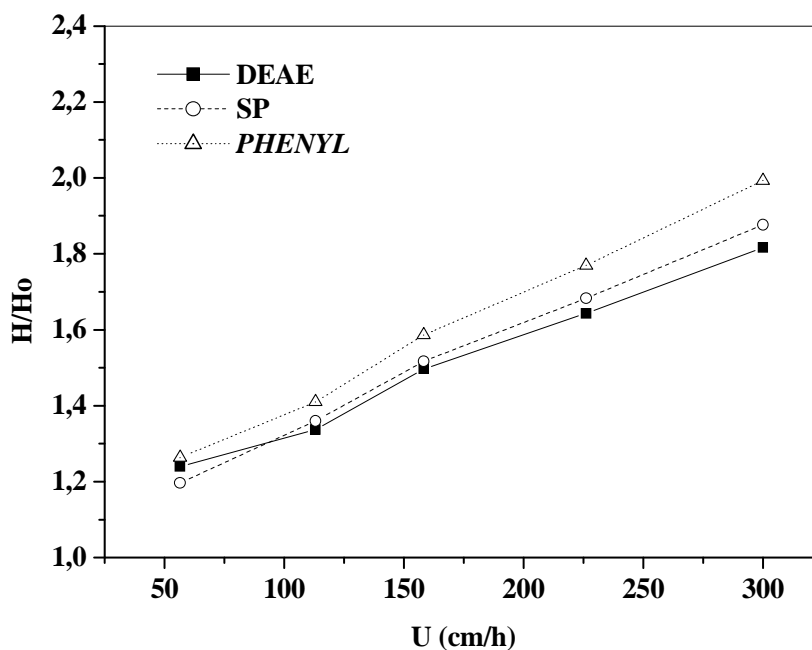


Figura A1.14: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e PHENYL ($H_0 = 10,0$ cm, 50 mM, pH 7,5).

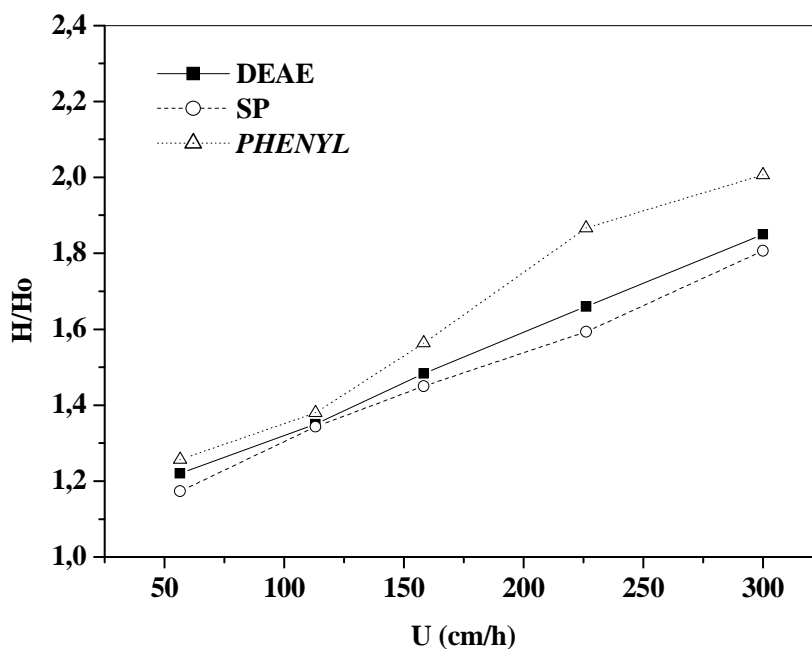


Figura A1.15: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e PHENYL ($H_0 = 10,0$ cm, 50 mM, pH 8,0).

Grau de expansão

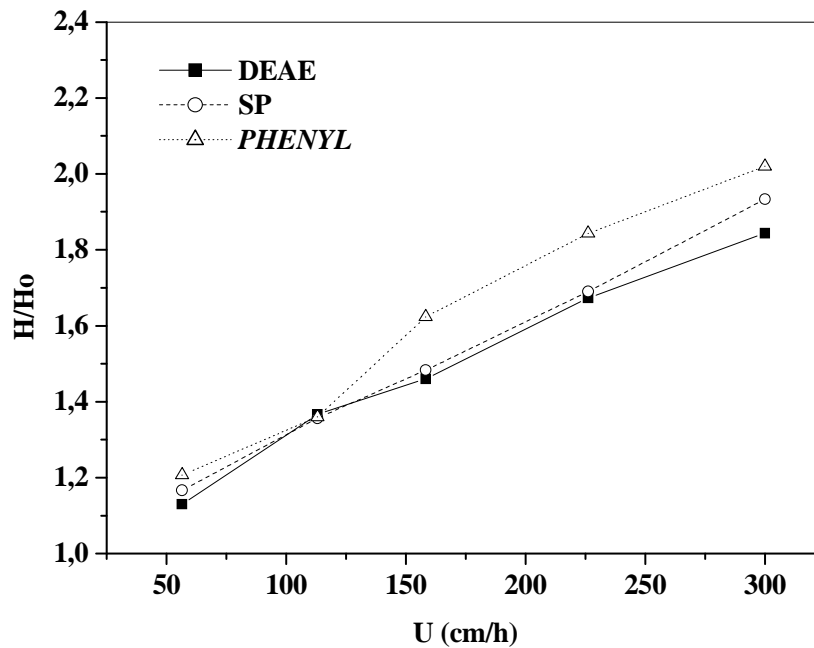


Figura A1.16: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e PHENYL ($H_0 = 10,0$ cm, 70 mM, pH 7,0).

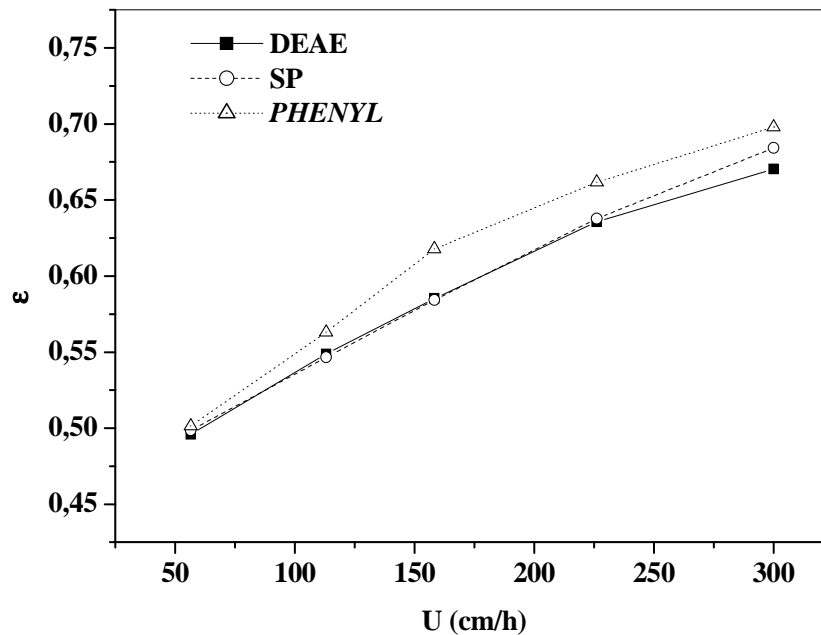


Figura A1.17: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e PHENYL ($H_0 = 10,0$ cm, 70 mM, pH 7,5).

Grau de expansão

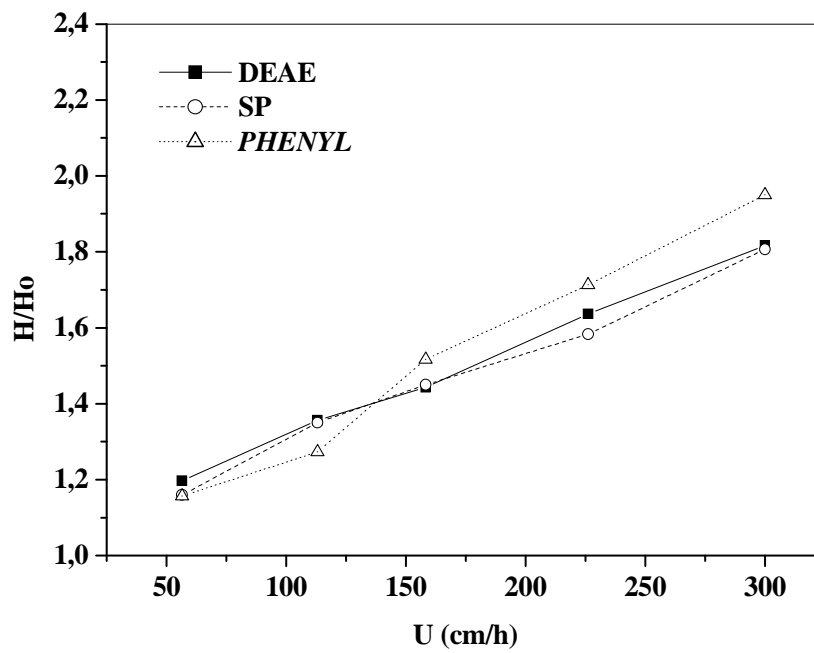


Figura A1.18: Curva de expansão do leito utilizando a resina Streamline DEAE, SP e PHENYL ($H_0 = 10,0$ cm, 70 mM, pH 8,0).

TABELA A1.1: Coeficiente de correlação do Expansão do leito para os sistemas estudados, quando a altura inicial era 5,0 cm e a velocidade 300 cm/h.

RESINAS	CONCENTRAÇÃO DE		R ²
	TAMPÃO Tris/HCl (mM)	pH	
DEAE	30	7,0	0,9770
	30	7,5	0,9749
	30	8,0	0,9920
	50	7,0	0,9747
	50	7,5	0,9902
	50	8,0	0,9909
	70	7,0	0,9844
	70	7,5	0,9785
	70	8,0	0,9884
SP	30	7,0	0,9731
	30	7,5	0,9652
	30	8,0	0,9965
	50	7,0	0,9813
	50	7,5	0,9940
	50	8,0	0,9962
	70	7,0	0,9745
	70	7,5	0,9790
	70	8,0	0,9860
Phenyl	30	7,0	0,9731
	30	7,5	0,9939
	30	8,0	0,9919
	50	7,0	0,9978
	50	7,5	0,9979
	50	8,0	0,9970
	70	7,0	0,9614
	70	7,5	0,9641
	70	8,0	0,9884

TABELA A1.2: Coeficiente de correlação do Expansão do leito para os sistemas estudados, quando a altura inicial era 10,0 cm e a velocidade 300 cm/h.

RESINAS	CONCENTRAÇÃO DE		R ²
	TAMPÃO Tris/HCl (mM)	pH	
DEAE	30	7,0	0,9950
	30	7,5	0,9874
	30	8,0	0,9970
	50	7,0	0,9991
	50	7,5	0,9966
	50	8,0	0,9996
	70	7,0	0,9940
	70	7,5	0,9993
	70	8,0	0,9990
SP	30	7,0	0,9950
	30	7,5	0,9874
	30	8,0	0,9970
	50	7,0	0,9991
	50	7,5	0,9966
	50	8,0	0,9996
	70	7,0	0,9940
	70	7,5	0,9993
	70	8,0	0,9990
Phenyl	30	7,0	0,9935
	30	7,5	0,9946
	30	8,0	0,9763
	50	7,0	0,9984
	50	7,5	0,9988
	50	8,0	0,9895
	70	7,0	0,9900
	70	7,5	0,9978
	70	8,0	0,9942

ANEXO II
POROSIDADE DO LEITO

Porosidade do Leito

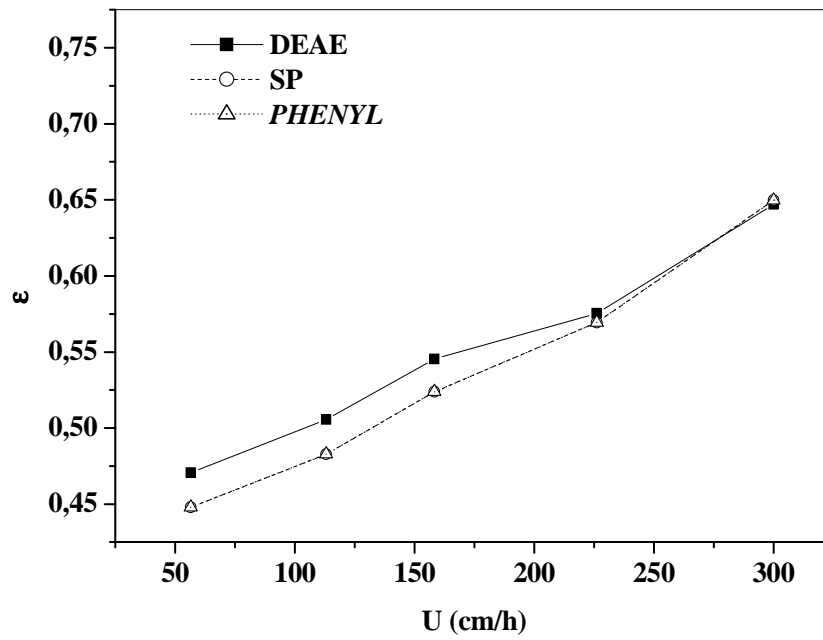


Figura A2.1: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e PHENYL ($H_0 = 5,0$ cm, 30 mM, pH 7,0).

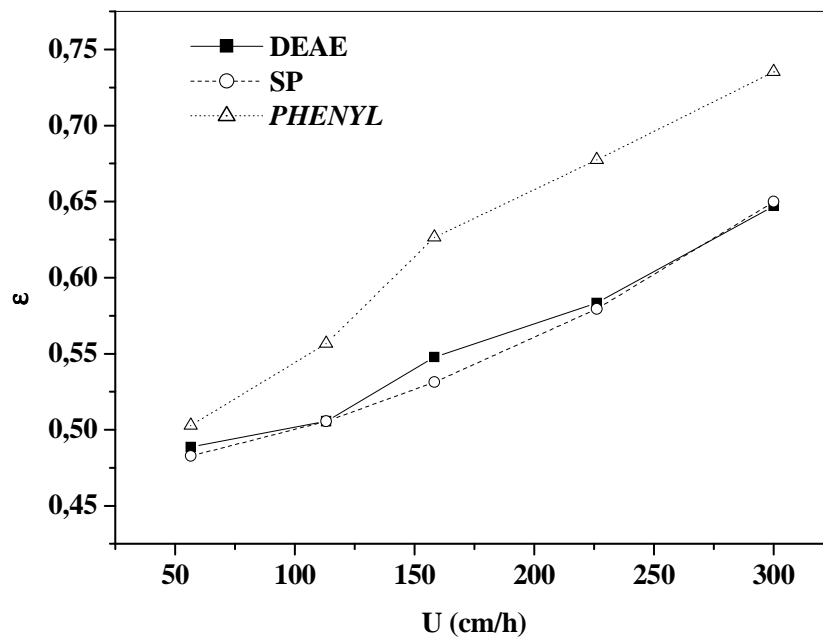


Figura A2.2: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e PHENYL ($H_0 = 5,0$ cm, 30 mM, pH 7,5).

Porosidade do Leito

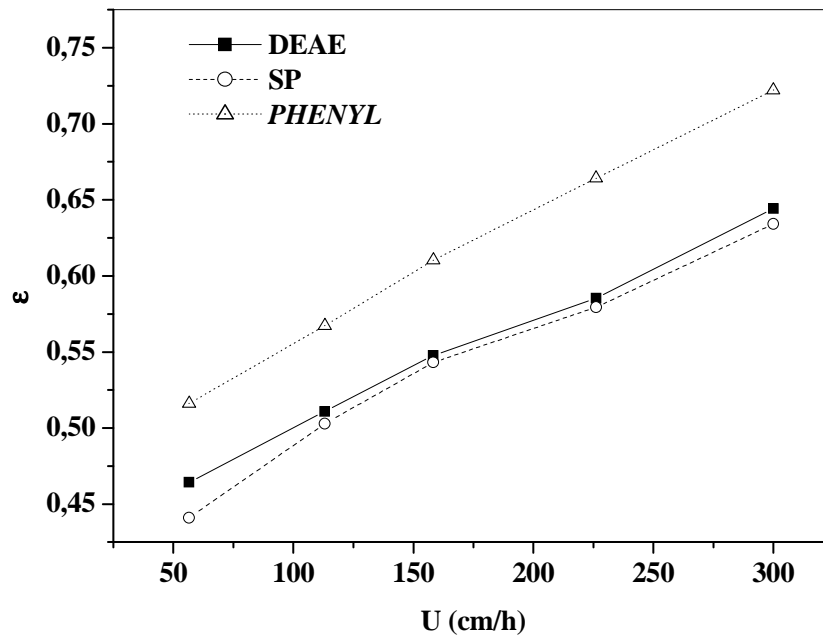


Figura A2.3: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 30 mM, pH 8,0).

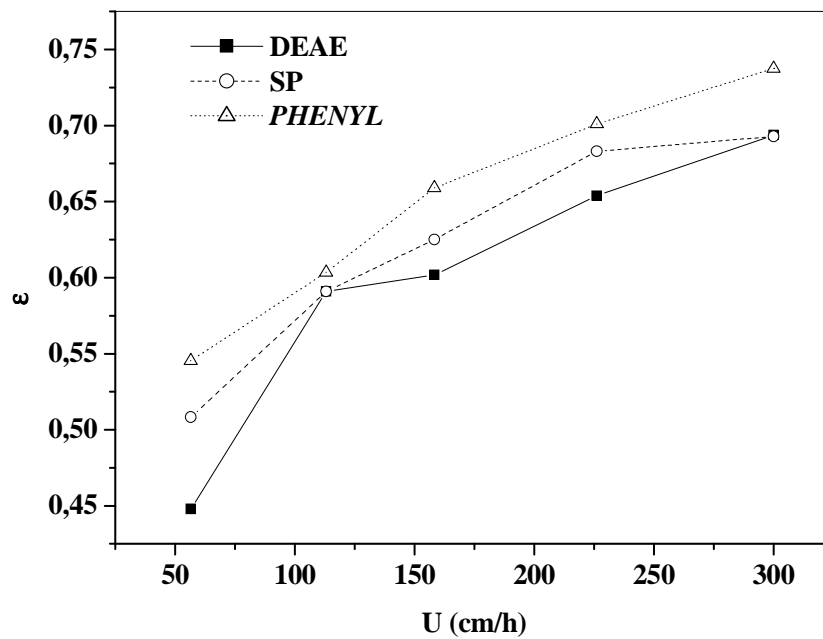


Figura A2.4: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,0).

Porosidade do Leito

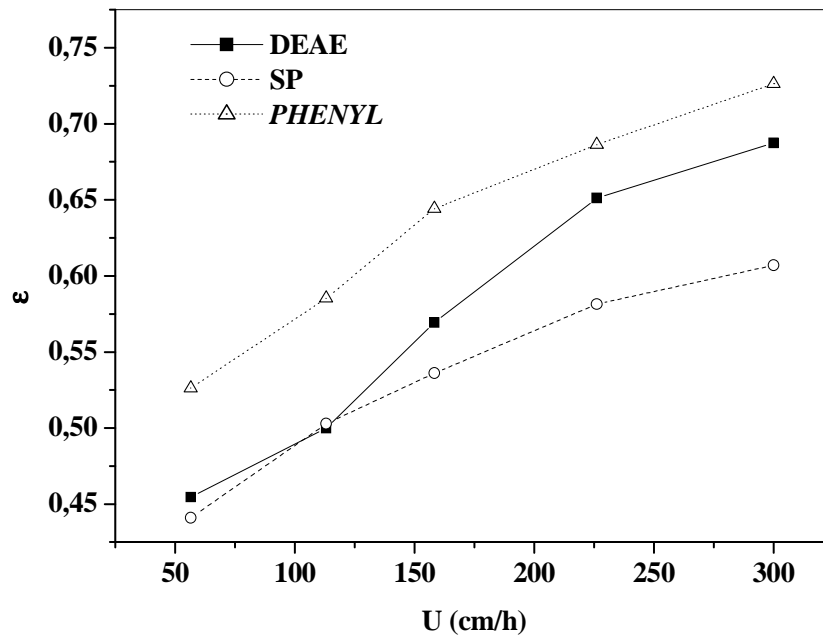


Figura A2.5: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 7,5).

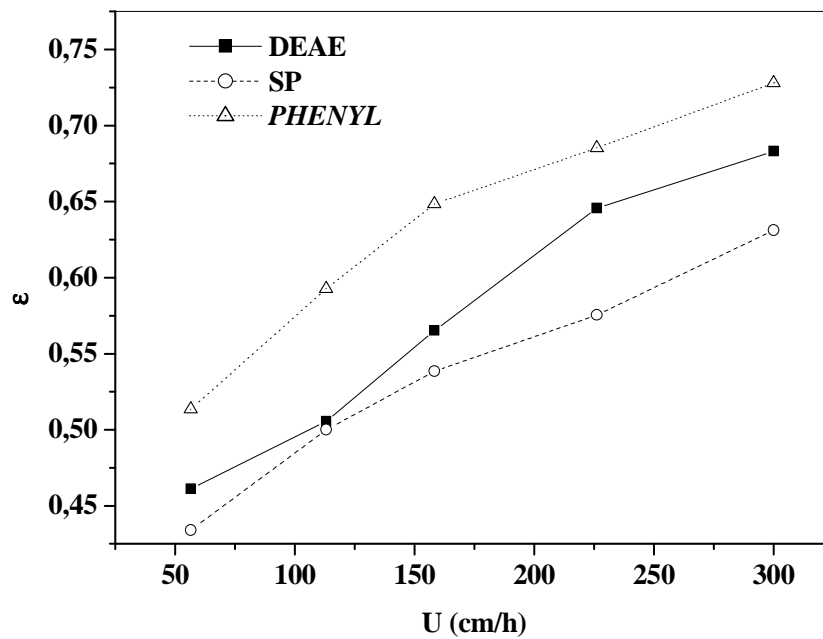


Figura A2.6: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 50 mM, pH 8,0).

Porosidade do Leito

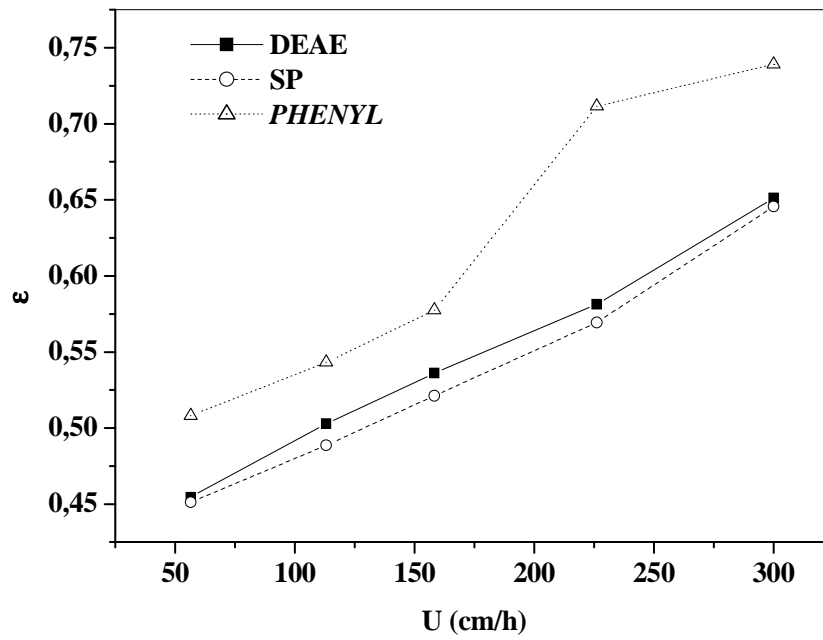


Figura A2.7: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 70 mM, pH 7,0).

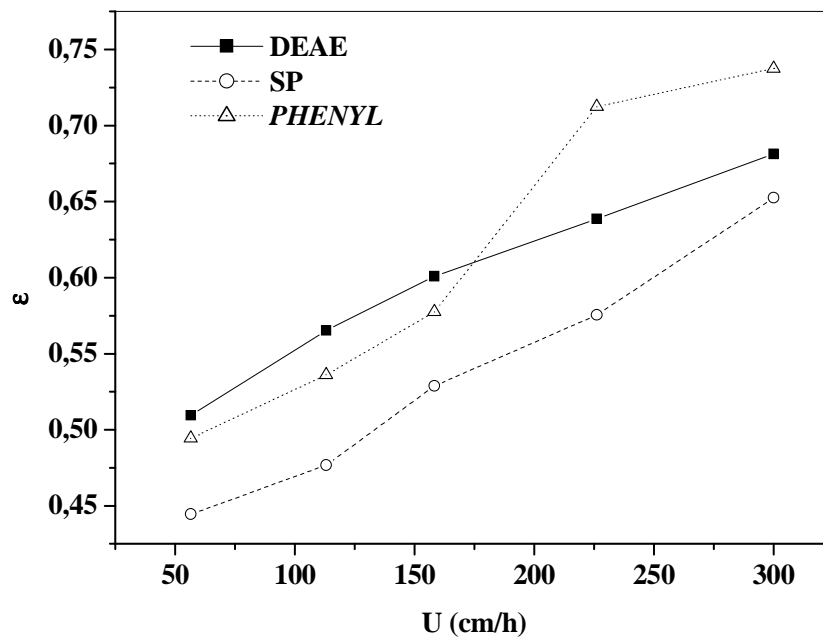


Figura A2.8: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 70 mM, pH 7,5).

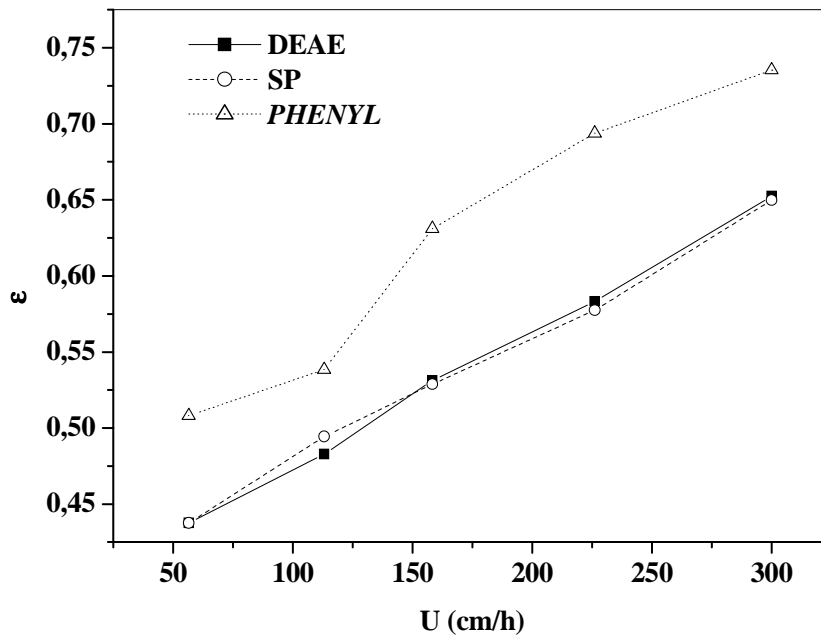


Figura A2.9: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 5,0$ cm, 70 mM, pH 8,0).

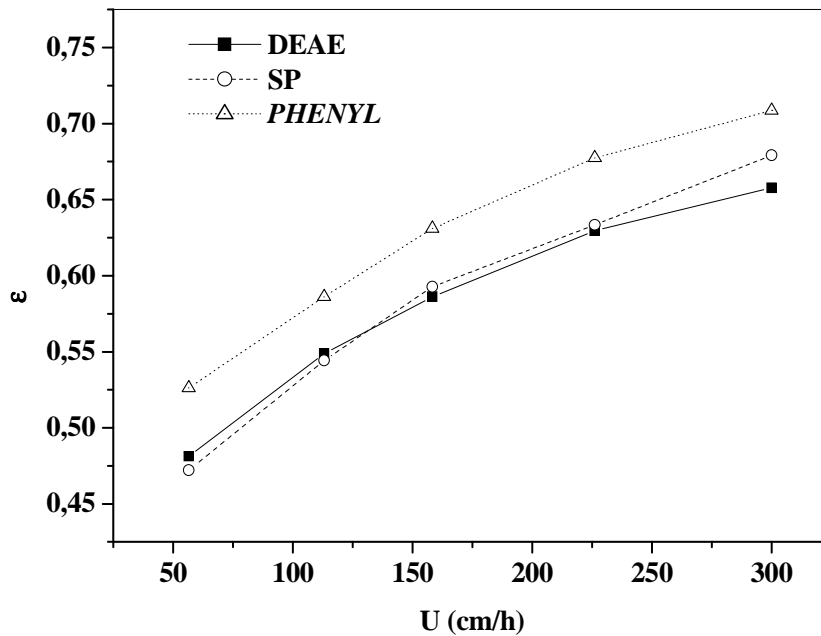


Figura A2.10: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 10,0$ cm, 30 mM, pH 7,0).

Porosidade do Leito

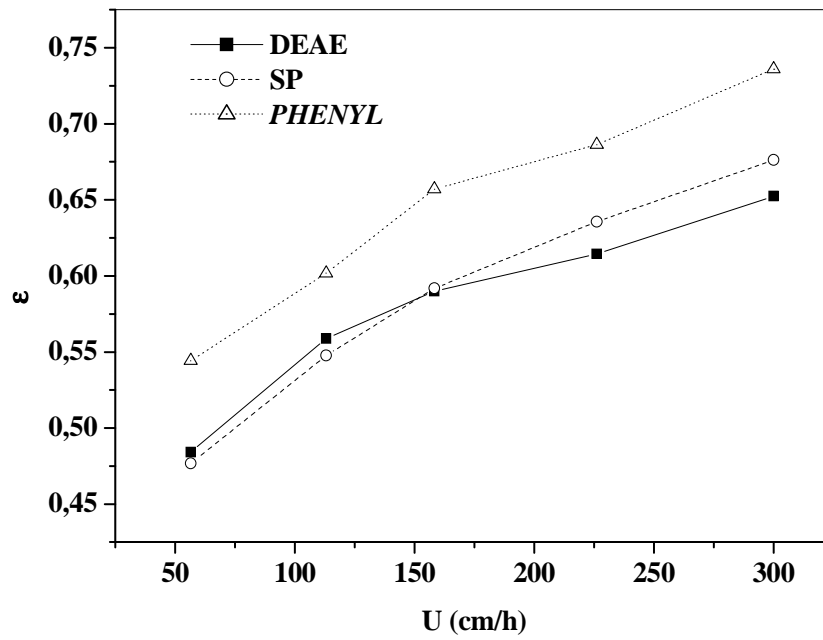
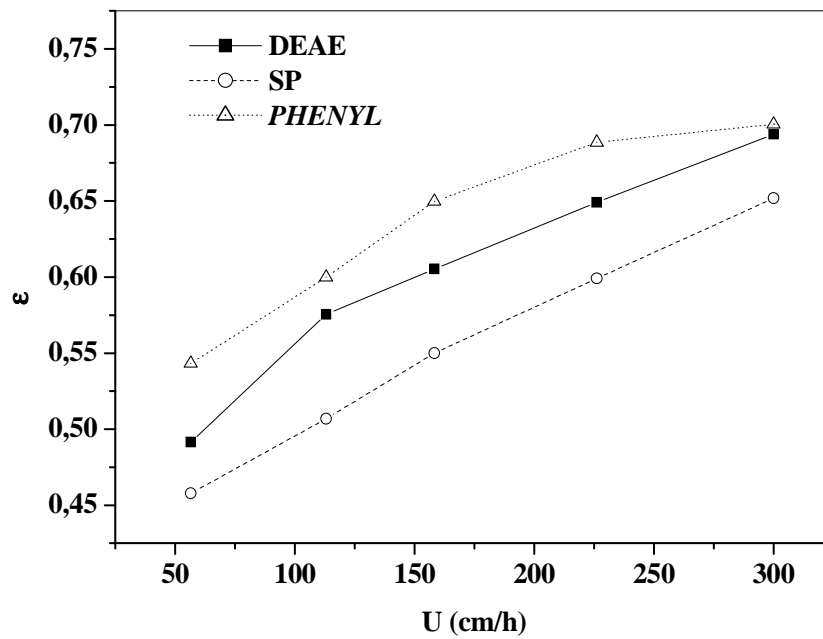


Figura A2.11: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e PHENYL ($H_0 = 10,0$ cm, 30 mM, pH 7,5).



Porosidade do Leito

Figura A2.12: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0= 10,0$ cm, 30 mM, pH 8,0).

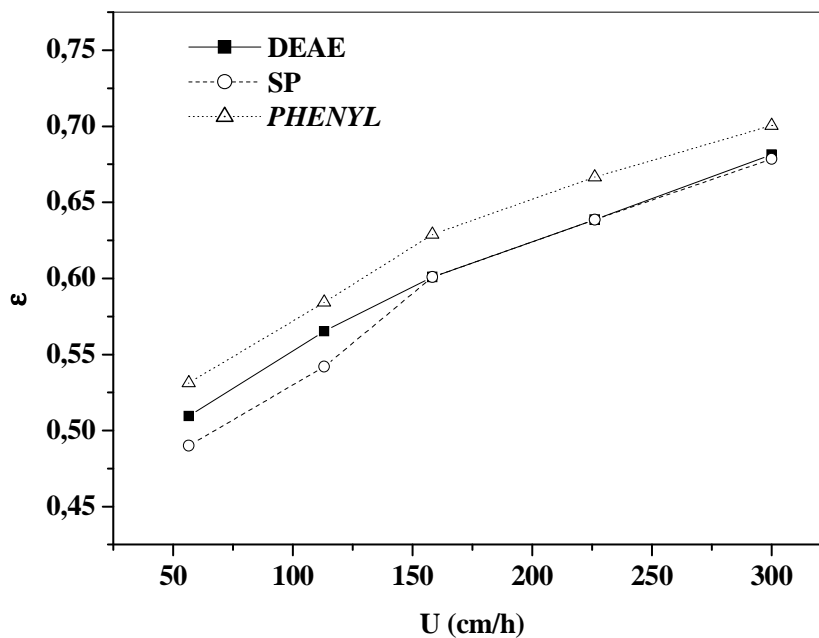


Figura A2.13: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0= 10,0$ cm, 50 mM, pH 7,0).

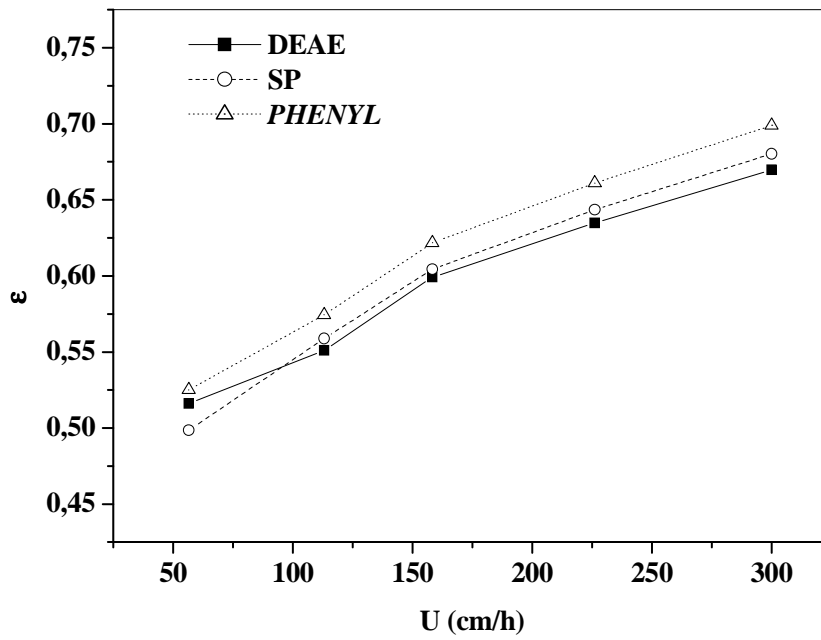


Figura A2.14: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 10,0$ cm, 50 mM, pH 7,5).

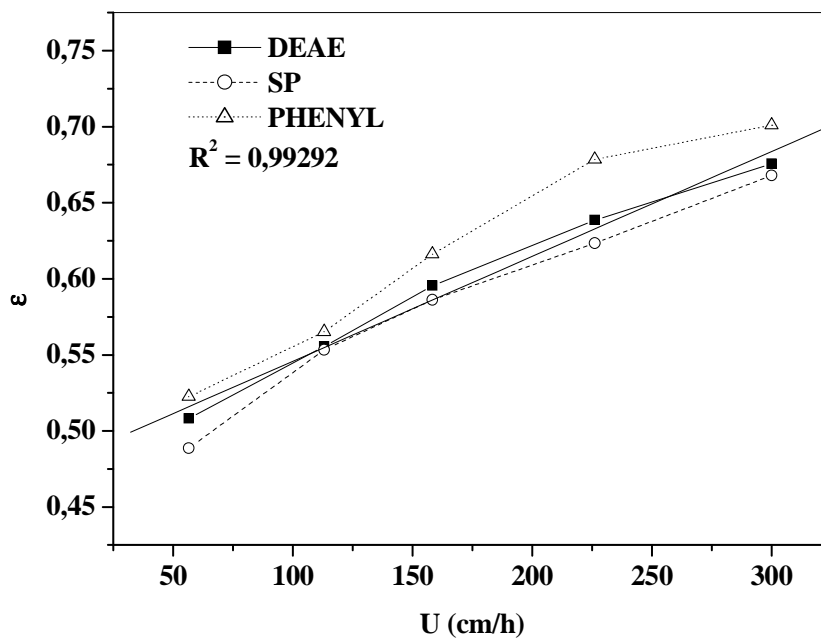


Figura A2.15: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 10,0$ cm, 50 mM, pH 8,0).

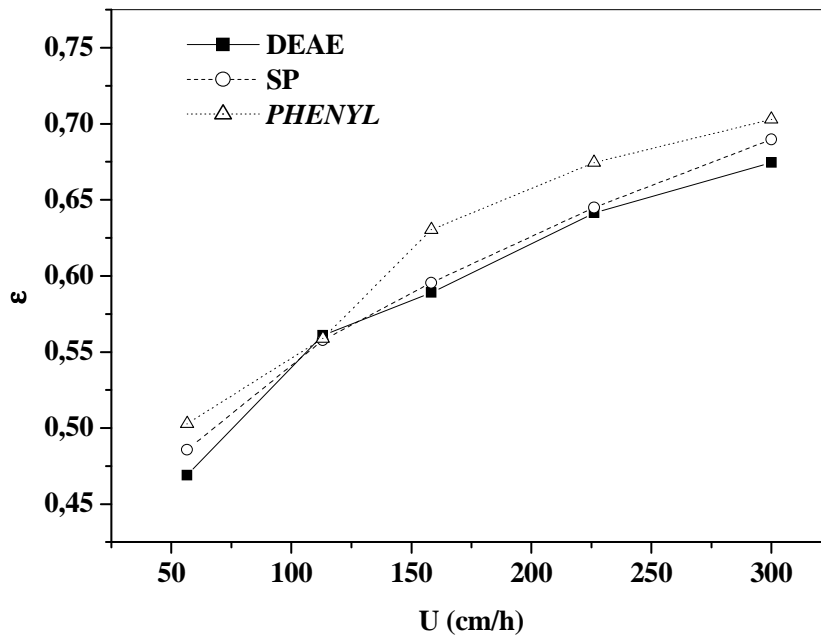


Figura A2.16: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 10,0$ cm, 70 mM, pH 7,0).

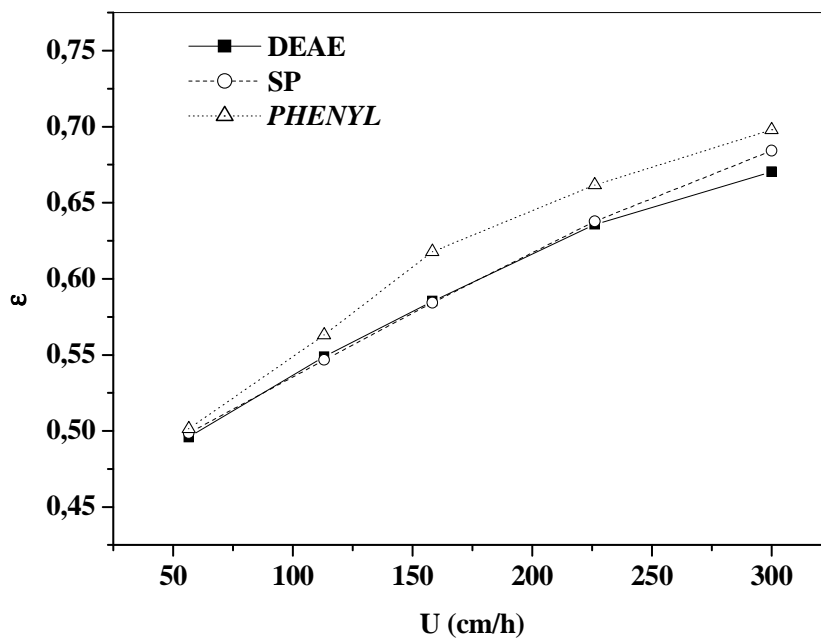


Figura A2.17: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 10,0$ cm, 70 mM, pH 7,5).

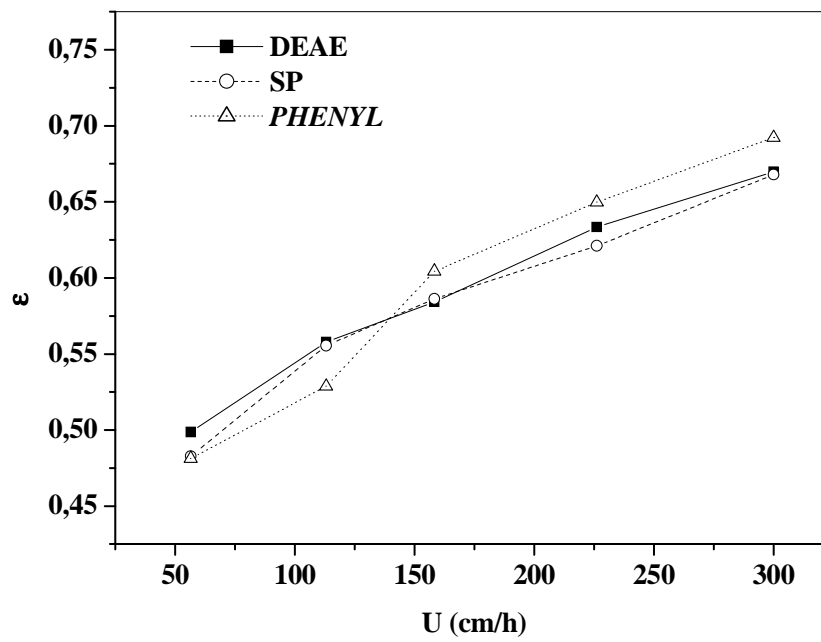


Figura A2.18: Curva da porosidade do leito em função da velocidade utilizando a resina Streamline DEAE, SP e *PHENYL* ($H_0 = 10,0$ cm, 70 mM, pH 8,0).

ANEXO III

Determinação do tempo de residência

Determinação do tempo de residência

TABELA A3.1: Parâmetros estudados (N, Pe e D_{axial}), quando se utilizou o tampão Tris/HCl com concentração 30 Mm e $H_0 = 5,0$ cm.

RESINA	pH	N	Pe	D_{axial} ($\times 10^{-6}$ m ² /s)
DEAE	7,0	99,9	39,15	$2,2 \times 10^{-6}$
	7,5	24,15	9,88	$8,90 \times 10^{-6}$
	8,0	22,11	8,67	$9,8 \times 10^{-6}$
SP	7,0	39,65	15,45	$5,5 \times 10^{-6}$
	7,5	21,00	8,232	$1,03 \times 10^{-6}$
	8,0	20,86	8,17	$1,04 \times 10^{-6}$
<i>Phenyl</i>	7,0	38,03	14,91	$5,7 \times 10^{-6}$
	7,5	20,85	8,17	$1,04 \times 10^{-6}$
	8,0	20,77	20,73	$4,1 \times 10^{-6}$

TABELA A3.2: Parâmetros estudados (N, Pe e D_{axial}), quando se utilizou o tampão Tris/HCl com concentração 50 Mm e $H_0 = 5,0$ cm.

RESINA	pH	N	Pe	D_{axial} ($\times 10^{-6}$ m ² /s)
DEAE	7,0	97,73	33,8	$1,98 \times 10^{-6}$
	7,5	23,54	9,23	$7,67 \times 10^{-6}$
	8,0	20,34	7,56	$8,56 \times 10^{-6}$
SP	7,0	40,6	36,77	$5,9 \times 10^{-6}$
	7,5	22,53	9,05	$1,34 \times 10^{-6}$
	8,0	19,67	7,89	$1,09 \times 10^{-6}$
<i>Phenyl</i>	7,0	40,3	16,74	$4,74 \times 10^{-6}$
	7,5	23,56	10,53	$1,56 \times 10^{-6}$
	8,0	20,47	20,56	$4,3 \times 10^{-6}$

Determinação do tempo de residência

TABELA : Parâmetros estudados (N, Pe e D_{axial}), quando se utilizou o tampão Tris/HCl com concentração 70 Mm e $H_0 = 5,0$ cm.

RESINA	pH	N	Pe	D_{axial} ($\times 10^{-6}$ m ² /s)
DEAE	7,0	87,44	31,44	$1,89 \times 10^{-6}$
	7,5	20,62	8,78	$6,50 \times 10^{-6}$
	8,0	18,54	6,82	$6,34 \times 10^{-6}$
SP	7,0	38,45	33,54	$4,48 \times 10^{-6}$
	7,5	19,38	8,37	$1,09 \times 10^{-6}$
	8,0	20,58	8,45	$1,50 \times 10^{-6}$
<i>Phenyl</i>	7,0	38,67	15,37	$3,48 \times 10^{-6}$
	7,5	22,72	8,53	$1,04 \times 10^{-6}$
	8,0	18,38	17,73	$3,9 \times 10^{-6}$

ANEXO IV
AVALIAÇÃO CINÉTICA DE ADSORÇÃO DAS
RESINAS

Avaliação Cinética de Adsorção das Resinas

TABELA A4.1: Quantidade (mg) de proteínas adsorvidas/mL de resina para as três concentrações iniciais em 30 mL para o sistema formado pela resina DEAE, pH 7,0 e concentração Tris/HCl 30 mM.

CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PROTEÍNA (C₀)			
RESINA	11,6 mg/mL	4,6 mg/mL	2,2 mg/mL
QUANTIDADE DE PROTEÍNA (mg) ADSORVIDA/mL DE RESINA			
Streamline DEAE	249,16	9,39	14,39
Streamline SP	303,60	73,15	16,19
Streamline <i>Phenyl</i>	270,82	16,30	8,97

TABELA A4.2: Quantidade (mg) de proteínas adsorvidas/mL de resina para as três concentrações iniciais em 30 mL para o sistema formado pela resina DEAE, concentração Tris/HCl 30 mM e pH 7,5.

CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PROTEÍNA (C₀)			
RESINA	11,6 mg/mL	4,6 mg/mL	2,2 mg/mL
QUANTIDADE DE PROTEÍNA (mg) ADSORVIDA/mL DE RESINA			
Streamline DEAE	230,21	57,81	11,98
Streamline SP	275,03	49,09	13,18
Streamline <i>Phenyl</i>	260,29	61,12	11,38

TABELA A4.3: Quantidade (mg) de proteínas adsorvidas/mL de resina para as três concentrações iniciais em 30 mL para o sistema formado pela resina DEAE, concentração Tris/HCl 30 mM e pH 8,0.

CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PROTEÍNA (C₀)			
RESINA	11,6 mg/mL	4,6 mg/mL	2,2 mg/mL
QUANTIDADE DE PROTEÍNA (mg) ADSORVIDA/mL DE RESINA			
Streamline DEAE	290,97	62,32	11,38
Streamline SP	199,23	71,05	14,69
Streamline <i>Phenyl</i>	181,19	16,61	1,153

Avaliação Cinética de Adsorção das Resinas

TABELA A4.4: Quantidade (mg) de proteínas adsorvidas/mL de resina para as três concentrações iniciais em 30 mL para o sistema formado pela resina SP, concentração Tris/HCl 50 mM e pH 7,0.

CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PROTEÍNA (C₀)			
RESINA	11,6 mg/mL	4,6 mg/mL	2,2 mg/mL
QUANTIDADE DE PROTEÍNA (mg) ADSORVIDA/mL DE RESINA			
Streamline DEAE	249,16	9,39	14,39
Streamline SP	290,97	62,32	3,86
Streamline <i>Phenyl</i>	230,22	57,81	4,76

TABELA A4.5: Quantidade (mg) de proteínas adsorvidas/mL de resina para as três concentrações iniciais em 30 mL para o sistema formado pela resina SP, concentração Tris/HCl 50 mM e pH 7,5.

CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PROTEÍNA (C₀)			
RESINA	11,6 mg/mL	4,6 mg/mL	2,2 mg/mL
QUANTIDADE DE PROTEÍNA (mg) ADSORVIDA/mL DE RESINA			
Streamline DEAE	230,22	57,81	11,98
Streamline SP	304,51	70,75	42,66
Streamline <i>Phenyl</i>	182,39	2,47	11,98

TABELA A4.6: Quantidade (mg) de proteínas adsorvidas/mL de resina para as três concentrações iniciais em 30 mL para o sistema formado pela resina SP, concentração Tris/HCl 50 mM e pH 8,0.

CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PROTEÍNA (C₀)			
RESINA	11,6 mg/mL	4,6 mg/mL	2,2 mg/mL
QUANTIDADE DE PROTEÍNA (mg) ADSORVIDA/mL DE RESINA			
Streamline DEAE	290,97	62,32	11,38
Streamline SP	270,22	27,73	8,37
Streamline <i>Phenyl</i>	161,04	5,48	4,16

Avaliação Cinética de Adsorção das Resinas

TABELA A4.7: Quantidade (mg) de proteínas adsorvidas/mL de resina para as três concentrações iniciais em 30 mL para o sistema formado pela resina *PHENYL*, concentração Tris/HCl 70 mM e pH 7,0.

CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PROTEÍNA (C ₀)			
RESINA	11,6 mg/mL	4,6 mg/mL	2,2 mg/mL
QUANTIDADE DE PROTEÍNA (mg) ADSORVIDA/mL DE RESINA			
Streamline DEAE	249,16	9,39	14,39
Streamline SP	280,75	7,89	1,75
Streamline <i>Phenyl</i>	113,8138	29,84	1,15

TABELA A4.8: Quantidade (mg) de proteínas adsorvidas/mL de resina para as três concentrações iniciais em 30 mL para o sistema formado pela resina *PHENYL*, concentração Tris/HCl 70 mM e pH 7,5.

CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PROTEÍNA (C ₀)			
RESINA	11,6 mg/mL	4,6 mg/mL	2,2 mg/mL
QUANTIDADE DE PROTEÍNA (mg) ADSORVIDA/mL DE RESINA			
Streamline DEAE	230,21	157,8	11,98
Streamline SP	316,84	74,66	21,00
Streamline <i>Phenyl</i>	121,33	33,15	1,153

TABELA A4.9: Quantidade (mg) de proteínas adsorvidas/mL de resina para as três concentrações iniciais em 30 mL para o sistema formado pela resina *PHENYL*, concentração Tris/HCl 70 mM e pH 8,0.

CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PROTEÍNA (C ₀)			
RESINA	11,6 mg/mL	4,6 mg/mL	2,2 mg/mL
QUANTIDADE DE PROTEÍNA (mg) ADSORVIDA/mL DE RESINA			
Streamline DEAE	290,97	62,32	11,38
Streamline SP	305,41	78,27	21,30
Streamline <i>Phenyl</i>	157,43	39,77	4,461

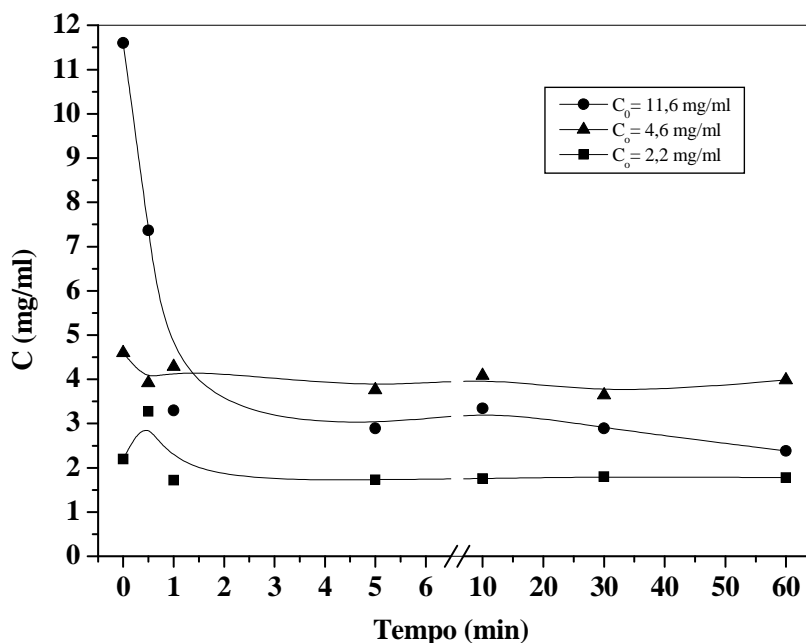


Figura A4.1: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline DEAE e solução tampão Tris/HCl 30 mM e pH 7,0.

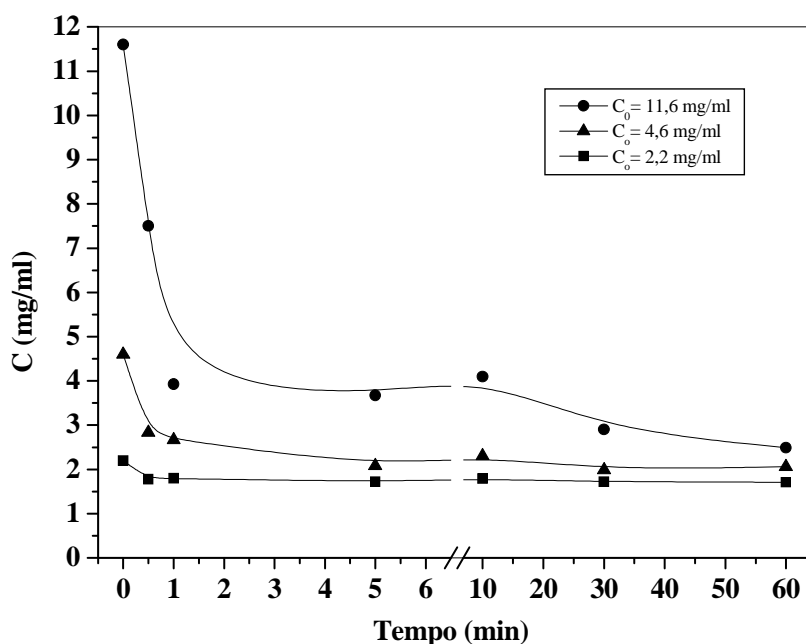


Figura A4.2: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline DEAE e solução tampão Tris/HCl 30 mM e pH 7,5.

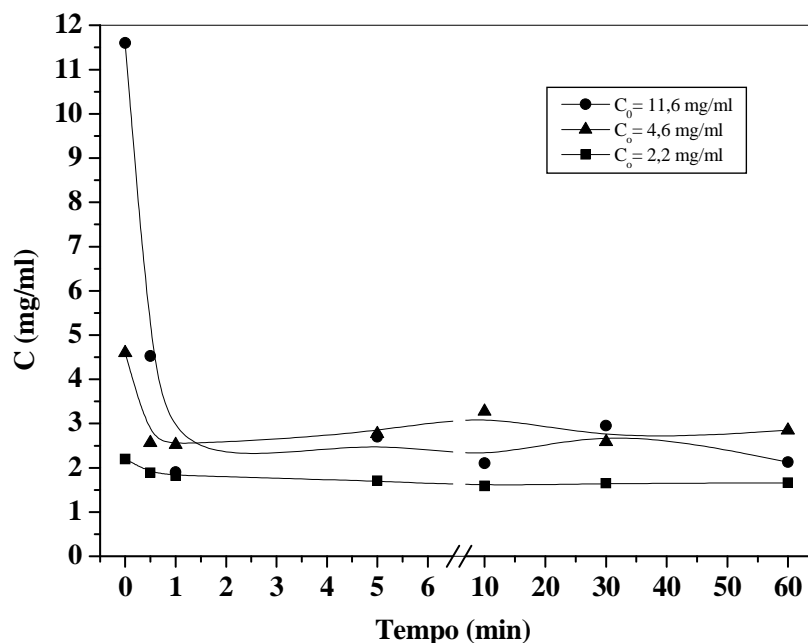


Figura A4.3: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline DEAE e solução tampão Tris/HCl 30 mM e pH 8,0.

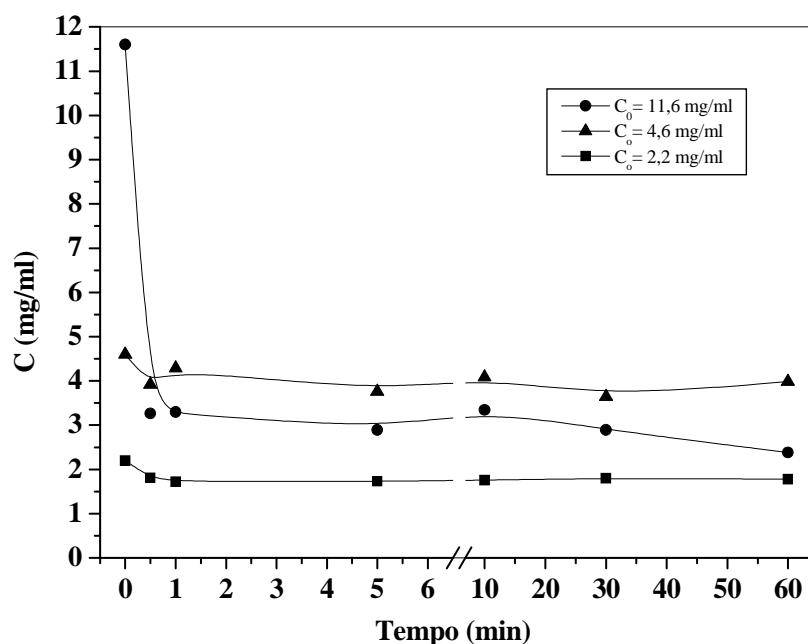


Figura A4.4: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline DEAE e solução tampão Tris/HCl 50 mM e pH 7,0.

Avaliação Cinética de Adsorção das Resinas

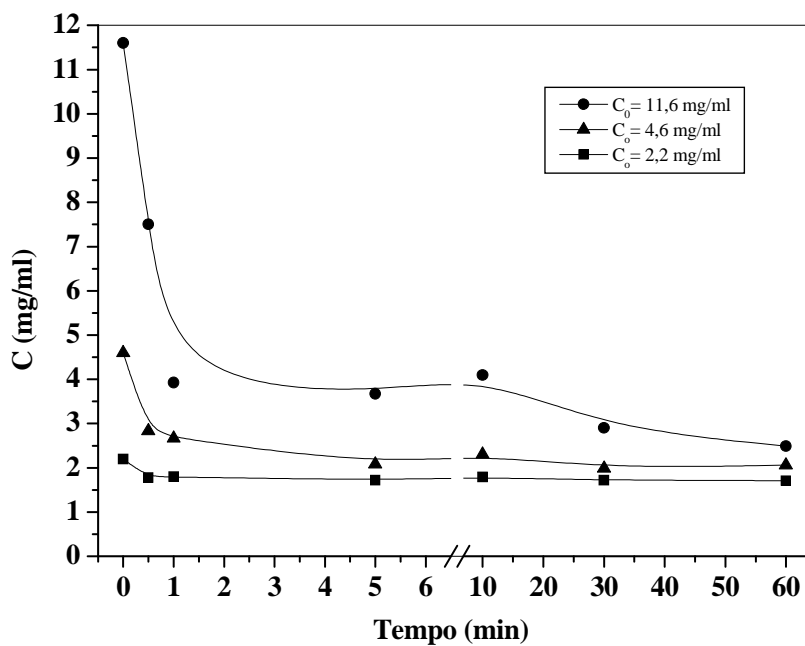


Figura A4.5: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline DEAE e solução tampão Tris/HCl 50 mM e pH 7,5.

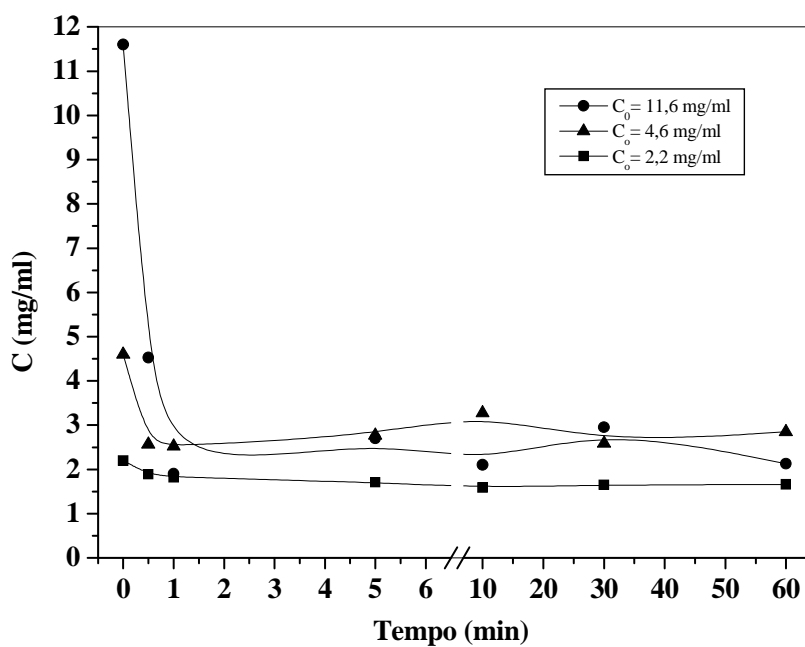


Figura A4.6: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline DEAE e solução tampão Tris/HCl 50 mM e pH 8,0.

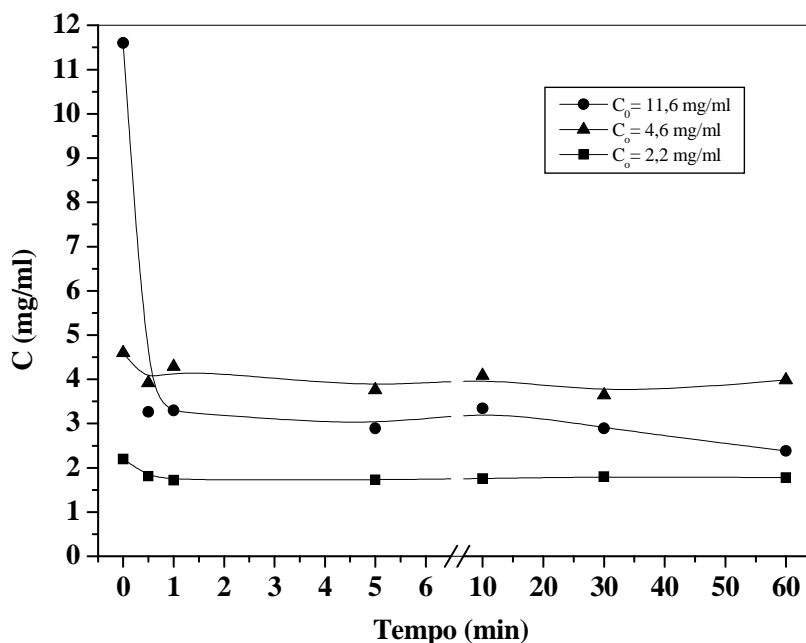


Figura A4.7: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline DEAE e solução tampão Tris/HCl 70 mM e pH 7,0.

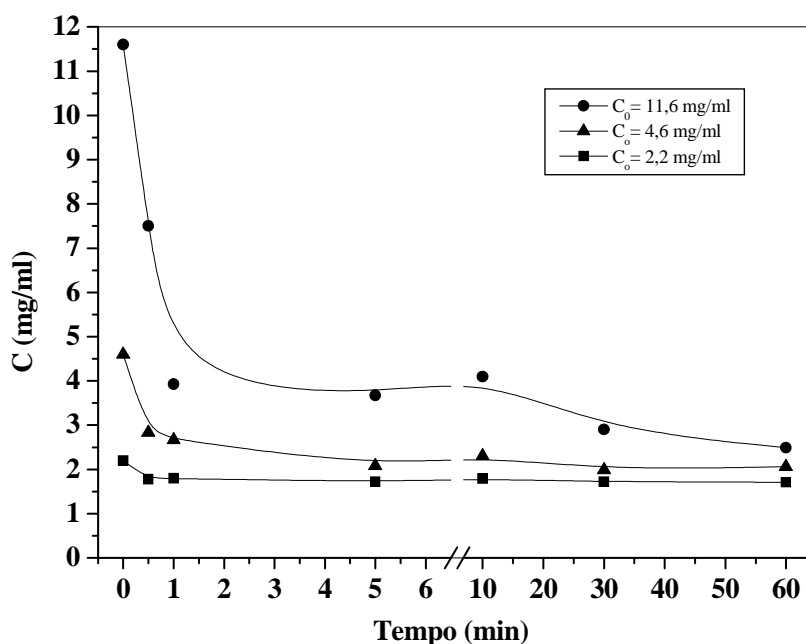


Figura A4.8: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline DEAE e solução tampão Tris/HCl 70 mM e pH 7,5.

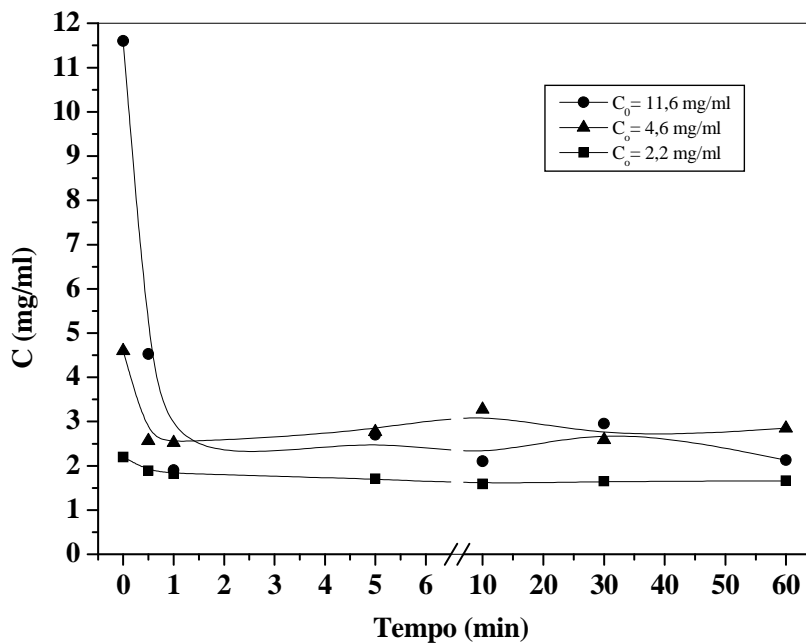


Figura A4.9: Cinética de adsorção de proteínas do soro de leite bovino, em resina Streamline DEAE e solução tampão Tris/HCl 70 mM e pH 8,0.

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](#)