

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

PURIFICAÇÃO DA α -LACTALBUMINA A PARTIR DO SORO DE
LEITE EM LEITO FIXO E EXPANDIDO DE RESINAS

Eng. Vinicius de Veredas

Aluno

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Orientador

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Novembro de 2000



UNIDADE	CD. C
N.º CHAMADA:	T1 / UNICAMP
	V585p
V.	Ex.
COMBO BC/	43745
PROC.	16-392/01
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC	R\$ 11,00
DATA	13/02/01
U.º CPD	

CM-00154298-0

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

V585p Veredas, Vinicius de
Purificação da α -Lactalbumina a partir do soro de
leite em leito fixo e expandido de resinas / Vinicius de
Veredas.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

1. Soro do leite. 2. Proteínas - Purificação. 3.
Adsorção. 4. Análise cromatográfica. I. Santana, Cesar
Costapinto. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Vinicius de Veredas e aprovada pela comissão julgadora em 08 de novembro de 2000.




Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Orientador


UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 08 de novembro de 2000 pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:

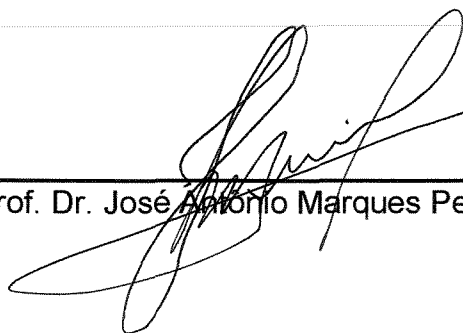


Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Orientador



Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno



Prof. Dr. José Antonio Marques Pereira

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

***Dedico este trabalho à memória de um homem
sábio e honrado, meu grande amigo e maior
ensinador: meu pai***

Francisco de Assis Pinheiro.

***“E preciso ter sonhos e a certeza de que tudo vai mudar.
É necessário abrir os olhos e descobrir que as coisas boas estão
dentro de nós, onde os sonhos não precisam de motivos e nem os
sentimentos de razão”.***

(John Lennon)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que nos deu sabedoria para descobrirmos nossa vocação, força para superarmos os obstáculos tornando um sonho realidade.

À minha Mãe Flauzina (Dona Flor); pelo amor, incentivo e dedicação constante e pelo exemplo de força e coragem que tenho recebido em todos os momentos de minha vida.

Ao meu irmão Ernesto Guevara de Veredas, meu melhor amigo, sempre me apoiando nos momentos mais difíceis.

À Ana Carolina pelo carinho e incentivo, sempre ao meu lado na elaboração deste trabalho, não deixando que eu esmoreça.

Ao Prof. Cesar Costapinto Santana que se revelou mais que um orientador, um grande amigo, sempre prestativo, me ajudando nas várias etapas deste trabalho sugerindo e orientando.

Ao Prof. Valdomiro Sgarbieri e toda a sua equipe de pesquisadores no Instituto de Tecnologia de Alimentos, pela amizade e oportunidade de trabalho durante a etapa de produção do concentrado protéico do soro de leite

À minha Tia Irene, pelo apoio na minha vinda a Campinas. Estou com saudades.

Aos meus primos Wilson D. J. Coimbra e Antônio J. C. Filho, amigos especiais, pela acolhida generosa em Campinas e a paciência mim dispensada.

Aos meus grandes amigos de Uberlândia em Campinas, André, Candice, Fabiano, Fernanda Colares, Cláudia, Eliana, Jean, Juliana e Virgínia, pela força, carinho e por me proporcionar momentos de muita alegria.

Aos companheiros de trabalho Elcimar da S. Nobrega e a Líbia S. Conrado, pela amizade, contribuições e sugestões que ajudaram na elaboração deste trabalho.

Aos grandes amigos do DPB, José Antônio, Fábio, Salah, Eduardo, Marisa, Cristiane Farinas, Alessandro, Patrícia, Elaine, Heron, Mirela, Maria Helena, Luciana, Adriano, Antenor, Cristiane, Samantha, Carla, Oselys, Victor, Rosana, Fernanda, Christiane Saraiva, que fizeram os dias no laboratório serem mais agradáveis.

À todos os Professores do Departamento de Processos Biotecnológicos, pelo que aprendi nos últimos anos, contribuindo em muito para a realização deste trabalho.

E a todos que de alguma forma, direta ou indireta colaboram e possibilitaram a realização deste trabalho.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANT

***Agradecimento Especial à Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo
apoio financeiro.***

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxv
NOMENCLATURA.....	xxvii
RESUMO.....	xxix
ABSTRACT.....	xxx
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. ESCOPO.....	01
1.2. OBJETIVO.....	04
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1. SORO DE LEITE.....	05
2.2. AS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE.....	07
2.2.1- α -Lactalbumina.....	09
2.2.2- β -Lactoglobulina.....	09
2.2.3- Albumina de soro bovino.....	10
2.2.4- Imunoglobulinas.....	10
2.2.5- Outras proteínas do soro de leite.....	11
2.3. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE.....	11
2.4. ADSORÇÃO EM MATRIZES SÓLIDAS.....	14
2.5. ASPECTOS GERAIS DOS PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS.....	15

2.5.1. Adsorção em leito fixo.....	16
2.5.2. Adsorção em leito expandido.....	17
2.6. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	18
2.7. CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA.....	20
2.8. TAMPÕES UTILIZADOS NOS PROCESSOS DE ADSORÇÃO.....	23
2.9. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO.....	25
2.10. CINÉTICA DE ADSORÇÃO EM TANQUE AGITADO.....	27
2.10.1. Tanque agitado.....	27
2.10.2. Modelo matemático de adsorção com cinética a taxa constante....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. MATÉRIA PRIMA.....	31
3.1.1. Proteínas Padrão.....	31
3.1.2. Concentrado protéico do soro de leite.....	32
3.2. ADSORVENTES UTILIZADOS.....	34
3.3. ENSAIOS DE ADSORÇÃO.....	36
3.3.1. Determinação das condições de operação.....	37
3.3.2. Isotermas de equilíbrio.....	39
3.3.3. Cinética de adsorção em tanque agitado.....	40
3.4. ENSAIOS EM COLUNAS CROMATOGRÁFICAS.....	41
3.5. MÉTODOS DE ANÁLISE.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
4.1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	47
4.2. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO	51
4.3. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO.....	59

4.4. CURVAS CINÉTICAS.....	61
4.5. ENSAIOS COM COLUNAS CROMATOGRÁFICAS.....	66
4.5.1. Estudo da expansão do leito.....	66
4.5.2. Dinâmica da adsorção em colunas.....	68
4.5.3. Etapa de eluição.....	71
4.6. ANÁLISE QUANTITATIVA PARA AS RESINAS HIDROFÓBICAS.....	76
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	83
5.1. CONCLUSÕES.....	83
5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.4.1	Fenômenos de transferência de massa numa partícula porosa.....	15
Figura 2.5.1	Curva de ruptura para a adsorção em coluna de leito fixo e expandido (BELTER <i>et al</i> , 1988). C_B é a concentração de ruptura no tempo T_B e C_E é a concentração de exaustão (saturação) no tempo T_E	17
Figura 2.5.2	Esquema dos passos na adsorção em leito expandido, onde as colunas mostram os diferentes estágios de operação dos sistema. As setas indicam a direção do escoamento (PHARMACIA-BIOTECH, 1996).....	18
Figura 2.6.1	Esquema do processo cromatográfico de separação de proteínas por troca aniônica (TOSHAAS).....	20
Figura 2.7.1	Ânions e cátions que influenciam na precipitação de proteínas, série de Hofmeister.....	22
Figura 2.7.2	Esquema do processo de recuperação da α -La empregando resina de interação hidrofóbica.....	23
Figura 3.1.1	Fluxograma geral da produção do concentrado protéico de soro de leite do tipo doce.....	33
Figura 3.3.1	Esquema do sistema de agitação simulando um tanque agitado para a obtenção dos ensaios de equilíbrio.....	39
Figura 3.3.2	Sistema montado para a obtenção da cinética de adsorção simulando um tanque agitado.....	41
Figura 3.4.1	Sistema de cromatografia líquida de média pressão – BIO-RA.....	43
Figura 4.1.1	Curva de calibração da absorbância à 280 nm em função da concentração de α -Lactalbumina em tampão Tris 30 mM e pH 7,5. Calfa é a concentração de α -Lactalbumina e Abs é referente ao valor de absorbância.....	48
Figura 4.1.2	Curva de calibração da diferença de absorbância (280-320) nm em função da concentração de CSL em tampão Tris 30 mM pH 7,5. CSL é a concentração do CSL e ABS é o valor de absorbância.....	48

Figura 4.1.3	Cromatograma obtido com a coluna MONO Q; injeção de 20 μ L de solução de α -La pura, e eluição com um gradiente de solução 350 mM de NaCl em um período de tempo igual a 25 min.....	49
Figura 4.1.4	Cromatograma obtido com a coluna MONO Q; injeção de 20 μ L da solução de β -Lg pura, e eluição com um gradiente de solução 350 mM de NaCl em um tempo igual a 25 min.....	49
Figura 4.1.5	Curvas de calibração da área em função da concentração de α -La e β -Lg, utilizando a coluna cromatográfica MONO Q HR 5/5. Onde Área é a área do pico de eluição obtido no cromatograma, C a-La é a concentração de α -La e C b-Lg é a concentração de β -Lg	50
Figura 4.1.6	Cromatograma de eluição obtido com a coluna MONO Q, para a injeção de IgG humana na concentração igual a 0,1 mg.mL ⁻¹	51
Figura 4.2.1	Capacidade de adsorção da α -La pura nas resina de troca iônica Accell Plus e Streamline DEAE, em função do pH do tampão de condicionamento, empregando o sistema de tanque agitado. Tampões de adsorção : Bis-Tris 30 mM pH 6,0, 6,5 e 7,0 e Tris 30 mM pH 7,5 a 9,0.....	52
Figura 4.2.2	Capacidade de adsorção das proteínas do CSL na resina Accell Plus em função do pH do tampão de condicionamento, empregando o sistema de tanque agitado. Tampões de adsorção: Piperazina 30 mM pH 4,5, 5,0, 5,5; Bis-Tris 30 mM pH 6,0, 6,5 e 7,0 e Tris 30 mM pH 7,5 a 9,0	52
Figura 4.2.3	Eletroforetograma das frações do CSL não adsorvidas na resina Accell Plus. A- pH 5,0, B- pH 6,0, C- pH 6,5, D- pH 7,0, E- pH 7,5, F- pH 8,0, G- pH 9,0, H – Soro do Leite e M- Marcadores Moleculares (kDa): 94,0 (Phosphorylase b), 67,0 (Bovine Serum Albumin), 43,0 (Ovalbumin), 30,0 (Carbonic Anhydrase), 20,1 (Soybean Trypsin inhibition), 14,4 (α -Lactalbumin).....	53
Figura 4.2.4	Eletroforetograma das frações do CSL eluídas da resina Accell Plus. A- pH 5,0, B- pH 6,0, C- pH 6,5, D- pH 7,0, E- pH 7,5, F- pH 8,0, G- pH 8,5, H- pH 9,0 e M- Marcadores Moleculares (kDa); 94,0 (Phosphorylase b), 67,0 (Bovine Serum Albumin), 43,0 (Ovalbumin), 30,0 (Carbonic Anhydrase), 20,1 (Soybean Trypsin inhibition), 14,4 (α -Lactalbumin).....	54

Figura 4.2.5	Capacidade de adsorção das proteínas do CSL em função do pH de adsorção nas resinas Streamline Phenyl e Phenyl Sepharose CL-4B, com EDTA a 20 mM no tampão de condicionamento (Tampões de adsorção: Piperazina 50 mM pH 5,5; Bis-Tris 50 mM pH 6,0, 6,5 e 7,0 e Tris 50 mM pH 7,5 a 9,0).....	55
Figura 4.2.6	Capacidade de adsorção da proteínas do CSL em função da concentração de EDTA, no pH igual 7,5.....	56
Figura 4.2.7	Eletroforetograma das proteínas dos ensaios com resinas de interação hidrofóbica. MM- marcador de massa molecular, de A a E são ensaios em Streamline Phenyl, onde: A- Sobrenadante da concentração protéica no tampão 35 mM de EDTA e pH 7,5; B, C, D, E são respectivamente concentração de EDTA a 20; 35; 50 e 100 mM; F e o ensaio com Phenyl Sepharose CL-4B com EDTA a 35 mM e pH 7,5.....	57
Figura 4.2.8	Capacidade de adsorção das proteínas do CSL em função da variação da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na solução de CSL em tampão 50 mM Tris, adição de 35 mM de EDTA e pH igual a 7,5.....	58
Figura 4.3.1	Isoterma de adsorção da α -Lactalbumina pura em Accell Plus QMA, tampão Tris 30 mM pH 7,5.....	59
Figura 4.3.2	Isoterma de adsorção da α -La pura em Streamline DEAE, tampão Tris 30 mM pH 7,5.....	59
Figura 4.3.3	Isoterma de adsorção para o sistema α -La pura em Streamline Phenyl, tampão Tris 50 mM com 35mM de EDTA e pH 7,5.....	60
Figura 4.3.4	Isoterma de adsorção para o sistema α -La e Phenyl Sepharose CL-4B, no tampão Tris 50mM com EDTA a 35mM e pH igual 7,5.....	60
Figura 4.4.1	Curvas cinéticas de adsorção da proteína α -La em adsorventes de interação hidrofóbica, tampão Tris 50 mM com 35 mM de EDTA no pH 7,5, à temperatura de $24\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, utilizando o sistema de tanque agitado.....	62
Figura 4.4.2	Curva cinética de adsorção da proteína α -La, com concentração igual a $0,52\text{ mg.mL}^{-1}$, na resina Phenyl Sepharose CL-4B: Comparação de valores experimentais e calculados através do modelo empírico.....	63
Figura 4.4.3	Curva cinética de adsorção da proteína α -La, com concentração igual a $1,33\text{ mg.mL}^{-1}$, na resina Phenyl Sepharose CL-4B: Comparação de valores experimentais e calculados através do modelo empírico.....	63

Figura 4.4.4	Curva cinética de adsorção da proteína α -La, com concentração igual a $0,54 \text{ mg.mL}^{-1}$, na resina Streamline Phenyl: Comparação de valores experimentais e calculados através do modelo empírico.....	64
Figura 4.4.5	Curva cinética de adsorção da proteína α -La, com concentração igual a $1,56 \text{ mg.mL}^{-1}$, na resina Streamline Phenyl: Comparação de valores experimentais e calculados através do modelo empírico.....	64
Figura 4.5.1	Curva de expansão do leito com os adsorventes Streamline DEAE e Streamline Phenyl, colunas de 1,0 e 1,6 cm de diâmetros, tampão Tris-HCl 30 mM no pH igual a 7,5.....	67
Figura 4.5.2	Curvas de ruptura em leito fixo, obtida para solução de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ do CSL no tampão Tris 30 mM e pH igual a 7,5, vazão de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, e resinas Accell Plus e Streamline DEAE.....	69
Figura 4.5.3	Curvas de ruptura em leito fixo, obtida para solução de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ do CSL no tampão Tris 50 mM e EDTA 35 mM com pH 7,5, vazão de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, empregando as resinas hidrofóbicas Phenyl Sepharose CL-4B e Streamline Phenyl, na condição de leito fixo.....	69
Figura 4.5.4	Curvas de ruptura em leito expandido, obtidas para as resinas Streamline Phenyl (hidrofóbica) e Streamline DEAE (aniônica) na condição de leito expandido.....	70
Figura 4.5.5	A-Cromatograma de eluição das proteínas do CSL obtido em leito fixo de Accell Plus QMA e B-Eletroforetograma dos picos de eluição, onde as raias de 1 a 8 são referentes aos picos do cromatograma de eluição.....	72
Figura 4.5.6	A - Cromatograma de eluição das proteínas do CSL obtido em leito fixo de Streamline DEAE, B - Eletroforetograma dos picos de eluição, onde as raias de 1 a 9 são referentes aos picos do cromatograma de eluição.....	72
Figura 4.5.7	A -Cromatograma de eluição das proteínas do CSL obtido em leito fixo de Streamline Phenyl e B -Eletroforetograma do Cromatograma de eluição (raia 3) e das amostras do materiais de adsorção (raia 1) e de lavagem (raia 2).....	73

Figura 4.5.8	A -Cromatograma de eluição das proteínas do CSL obtido em leito fixo de Phenyl Sepharose CL-4B e B -Eletroforetograma dos picos de eluição (raias 4 e 5) e das amostras dos materiais de adsorção (raia 1) e de lavagem (raias 2 e 3) e a raia 6 é a amostra de α -La pura (Sigma®).....	74
Figura 4.5.9	A - Cromatograma de eluição das proteínas do CSL adsorvidas em leito expandido de Streamline DEAE e B - Eletroforetograma dos picos de eluição, em que as raia de 1 a 7 são referentes aos picos do cromatograma de eluição.....	75
Figura 4.5.10	A - Cromatograma de eluição das proteínas do CSL em leito expandido de Streamline Phenyl e B - Eletroforetograma dos picos de eluição (raia 2) e etapa de lavagem (raia 1).....	76
Figura 4.6.1	Cromatogramas da amostra do CSL e das etapas cromatográficas da resina Streamline Phenyl com vazão de adsorção igual a $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, obtidos com a coluna MONO Q no sistema HPLC.....	78

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1.1	Composição do soro de queijo doce e ácido.....	06
Tabela 2.1.2	Composição protéica do leite humano e leite bovino.....	07
Tabela 2.2.1	Influência da concentração de proteína, na dieta de camundongos sobre os valores de PER para diferentes proteínas.....	08
Tabela 2.2.2	Algumas das principais propriedades das proteínas no soro de leite bovino.....	08
Tabela 2.3.1	Métodos de separação geralmente empregados em purificação.....	12
Tabela 2.8.1	Tampões geralmente empregados em cromatografia de troca iônica.....	24
Tabela 3.1.1	Composição e solubilidade dos concentrados protéicos de soro de leite (base seca).....	33
Tabela 4.3.1	Valores dos parâmetros q_m e k_d na adsorção de α -lactalbumina, nas resinas estudadas.....	61
Tabela 4.4.1	Valores calculados para as constantes cinéticas de associação (k_1) e de dessorção (k_2), obtidos no ensaio de adsorção da α -La em resinas hidrofóbicas no sistema de tanque agitado.....	65
Tabela 4.6.1	Análise da concentração da α -La com a coluna MONO Q.....	79
Tabela 4.6.2	Análise de rendimento, pureza e fator de purificação, da purificação da α -La utilizando resinas de interação hidrofóbica em leito fixo e expandido.....	78

NOMENCLATURA

CSL	Concentrado protéico do soro de leite bovino	
FP	Fator de purificação	
PER	Quociente de eficiência proteica	
C	Concentração de proteínas em solução	(mg.mL ⁻¹)
C _i	Concentração inicial de proteínas	(mg.mL ⁻¹)
C _f	Concentração final de proteínas em solução	(mg.mL ⁻¹)
C _o	Concentração inicial de proteínas em solução	(mg.mL ⁻¹)
h	Altura final do leito expandido	(Cm)
h _o	Altura inicial do leito na condição de leito fixo	(Cm)
K ₁	Constante cinética de adsorção	(mL.min ⁻¹ .mg ⁻¹)
k ₂	Constante cinética de dessorção	(min ⁻¹)
k _d	Constante de dissociação	(mg.mL ⁻¹)
q	Concentração de adsorvato na fase de sólido	(mg.g ⁻¹)
q _m	Capacidade máxima do adsorvente	(mg.g ⁻¹)
M	Massa de adsorvente	(g)
t	Tempo	(min)
V	Volume de solução	(mL)
v	Volume de adsorvente	(mL)

RESUMO

O crescente interesse e aplicações dos produtos biotecnológicos vem aumentando o desenvolvimento de novos processos de recuperação e purificação de proteínas. O soro de leite bovino, obtido da manufatura da caseína para a produção de queijo, é em sua maioria descartado em mananciais de água, causando sérios problemas ambientais devido a sua alta demanda biológica de oxigênio (DBO). As proteínas presentes no lactosoro apresentam um excelente valor nutritivo e farmacológico, porém, o seu uso no enriquecimento de produtos alimentícios é limitado devido a baixa concentração destas proteínas. As principais proteínas do lactosoro são: β -lactoglobulinas, α -lactalbumina, albuminas de soro bovino, imunoglobulinas, lactoperoxidase, lactoferrina, lisozima e outras proteínas de menor proporção, que apresentam um alto valor agregado. A α -lactalbumina atua no organismo estimulando os agentes do sistema imunológico por proporcionar a elevação de glutathione em vários órgãos e no sangue, resultando em benefícios para pacientes portadores de doenças degenerativas como os males de Parkinson e Alzheimer, câncer e AIDS. Neste trabalho foi estudado o processo de separação da α -lactalbumina, através de técnicas cromatográficas empregando a metodologia de leito fixo e expandido. O leito expandido possibilita a redução nos custos do processo de purificação, eliminando etapas de separação necessárias quando o extrato apresenta material em suspensão, que é o caso dos lactosoros. Nos ensaios realizados foram estudados as melhores condições de adsorção da α -lactalbumina visando a sua purificação empregando adsorventes de troca iônica e de interação hidrofóbica. Também foram realizados ensaios em sistemas de tanque agitados para a 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.

Palavras Chave: Soro do leite, α -Lactalbumina, Adsorção, Cromatografia, Troca iônica, Interação hidrofóbica.

ABSTRACT

The interest and applications of biotechnology products has been increasing the development of new recovery and purification processes for proteins. The bovine milk serum, obtained from casein manufacture for cheese production, is mostly rejected into watercourse, causing problems to the environment due to its high biological oxygen demand (BOD). The proteins of milk serum have excellent nutritious and pharmaceutical value, however, its application for protein enrichment of food products is limited due to its low content in the milk serum. The main proteins of milk serum are: β -lactoglobulins, α -lactalbumine, bovine serum albumine, immunoglobulins, lactoperoxidase, lactoferrin, lisozyme and other lower content proteins which have a high aggregate value. The α -lactalbumine acts in the human organism by stimulating the agents of the immunologycal system due to increasing on glutathione level in several organs and blood, resulting in benefits for patients of some diseases like Parkinson and Alzheimer's ill, cancer and AIDS. It was studied in this work the separation processes of α -lactalbumine, by chromatographic techniques making use of fixed and expanded bed methods. The expanded bed enables cost reduction on purification process by reducing separation steps used for removing suspended solids, as in case of milk serum extracts. In our experiments were studied the adsorption conditions of α -lactalbumine aiming at its purification by using ionic exchange and hydrophobic interaction adsorbents. Other experiments were accomplished at stirred tank systems for the determination of isotherms and adsorption kinetics. It was obtained, in this work, an α -lactalbumine purity higher than 80%, with a five fold purification factor by using the hydrophobic interaction resins in a single purification step.

Keywords: Milk serum, α -Lactalbumine, Adsorption, Ionic exchange, Hydrophobic interaction.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. ESCOPO

As proteínas possuem um lugar de destaque entre os produtos da indústria biotecnológica, principalmente por suas propriedades enzimáticas, nutricionais e terapêuticas. Como consequência, a utilização de proteínas tem-se tornado cada vez mais crescente, devido ao seu vasto campo de atuação e aplicação.

Proteínas são componentes essenciais das células e estão relacionadas a praticamente todas as funções fisiológicas. Elas são utilizadas na regeneração de tecidos, funcionam como catalisadores nas reações químicas que ocorrem nos organismos vivos e que envolvem enzimas e hormônios, são necessárias nas reações imunológicas e juntamente com os ácidos nucleicos são indispensáveis nos fenômenos de crescimento e reprodução (LEHNINGER, 1982).

As fontes protéicas podem ser classificadas em convencionais e não convencionais. Dentre as convencionais temos as de origem animal e vegetal, por serem largamente consumidas pela grande maioria dos povos e que constituem a base protéica das dietas humanas. Por outro lado, as fontes de proteína de origem não convencionais são aquelas que embora contenham proteínas em quantidade para serem introduzidas na dieta humana, são raramente consumidas, por

exemplo as de origem microbiana e de subprodutos da indústria animal (SGARBIERI, 1996).

A viabilidade da comercialização e da produção em escala industrial de substâncias obtidas por meio da biotecnologia, depende significativamente das técnicas empregadas na purificação dos compostos desejados. A baixa concentração inicial, a sensibilidade térmica e a necessidade de preservação das características funcionais dos compostos, bem como os requisitos de alta pureza dos produtos tornam esta etapa uma das mais onerosas nos custos globais de produção (COIMBRA, 1995). Portanto, um dos principais objetivos na recuperação de bioprodutos é o estudo de métodos de purificação biocompatíveis e econômicos, que tornem o bioproduto mais atraente ao mercado em termos de custo e qualidade.

Visando reduzir os custos e minimizar etapas de purificação na produção industrial em larga escala, a adsorção em leito fixo e expandido de resinas vem sendo amplamente empregada na recuperação de proteínas (KAUFMANN, 1997). O leito expandido ou fluidizado, possibilita o processamento de soluções brutas, tais como aquelas provenientes de meios de fermentação que contenham material particulado, evitando a colmatagem ou entupimento do leito de resinas, fenômeno que geralmente ocorre quando se opera soluções brutas sem pré-tratamento no leito fixo tradicional. Assim, no leito expandido são eliminadas as etapas primárias de clarificação, como a precipitação, centrifugação e filtração em membrana, reduzindo os custos de produção e purificação.

Um grupo de proteínas com potencial para tratamento tanto em leito fixo como em leito expandido é aquele composto pelas proteínas do soro de leite, obtido da produção do queijo. Nos anos 70 a produção mundial de soro de leite foi estimada em torno de 90 milhões de toneladas por ano (LEBENTHAL, 1975), e no início dos anos 90 foi em torno de 145 milhões de toneladas por ano (MORR & HA, 1993).

Normalmente, 60% do soro de leite é utilizado para a produção de lactose e ração animal. O restante é geralmente manipulado como resíduo ou descartado sem tratamento prévio em mananciais de água, aumentando os riscos de poluição

ambiental devido ao alto valor da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de 40.000 a 50.000 ppm (COIMBRA, 1995).

O soro de leite bovino contém cerca de 20% das proteínas existentes inicialmente no leite, com concentração na faixa de 5,0 a 9,0 g.L⁻¹ (McKENZEY, 1970; SGARBIERI, 1996). Além de ser uma fonte de proteínas de baixo custo, apresenta a vantagem de não necessitar de pré-tratamento para o seu processamento em larga escala (COIMBRA, 1995).

A ação conjunta das proteínas do soro de leite quando ingeridas em quantidade suficiente, proporciona a elevação de glutathione em vários órgãos e no sangue. A elevação de glutathione está relacionada com a ativação do sistema imunológico, tanto celular como humoral, podendo resultar em benefícios para pacientes portadores de doenças degenerativas como os males de Parkinson e Alzheimer, câncer, AIDS e cardiovasculares (BRINK, 1996).

A β -lactoglobulina (β -Lg) e a α -Lactalbumina (α -La) são as proteínas encontradas em maior abundância no soro de leite, aproximadamente 50% e 20% do total de proteínas do soro, respectivamente. Estas proteínas apresentam ponto isoelétrico e massa molecular semelhantes, o que dificulta a sua purificação em resinas trocadoras de íons (HAHN *et al*, 1998). Na literatura encontram-se diversos trabalhos sobre a separação destas duas proteínas. Alguns pesquisadores acreditam que a β -Lg tem importância biológica devido a sua participação na ligação e transporte do retinol, esta ligação é responsável pela proteção contra oxidações enzimáticas no organismo. (JAMES, 1994). Outro fator para a separação destas proteínas demanda do fato que a β -Lg é tida como o principal componente alérgico do leite bovino, quando utilizada pelo uso direto do leite ou do soro de leite no enriquecimento protéico de alimentos infantis (McKENZEY, 1970).

A α -La possui alto valor nutricional devido a sua composição de aminoácidos, e sua aplicação é importante na dieta alimentar de crianças. É conhecida como sendo subunidades da lactose sintetase e é importante na biossíntese da lactose pela galactose e glicose (JAMES, 1994). Possui hidrofobicidade média de 1020 kcal/resíduo (MORR & HA, 1993), pode se ligar ao

íon cálcio (Ca^{2+}), sendo assim caracterizada como uma proteína metálica (HIRAOKAL *et al*, 1980). É importante observar que esta ligação com o cálcio diminui a sua hidrofobicidade. Explorando a hidrofobicidade e outras características físico-químicas da α -La a sua separação e purificação a partir do soro do leite bovino pode ser conseguida utilizando técnicas de cromatografia empregando resinas de interação hidrofóbica e troca iônica (NOPPE *et al*, 1998).

1.2. OBJETIVO

Este trabalho de pesquisa propõe o desenvolvimento de uma estratégia de purificação da proteína α -Lactalbumina (α -La), presente no soro de leite, utilizando processos de cromatografia em leito fixo e expandido, empregando resinas de troca iônica e interação hidrofóbica.

Outros aspectos do processo de adsorção foram estudados, entre eles destacam-se:

- Determinação dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos para a α -La do soro de leite, tais como as isothermas de equilíbrio e cinética de adsorção em tanque agitado.
- Testes de um modelo matemático que descreva o comportamento cinético da adsorção da α -La em tanque agitado.
- Verificação experimental e medidas quantitativas no ciclo adsorção, lavagem e eluição.
- Estudo individualizado da recuperação da α -La a partir de um concentrado protéico do soro do leite, utilizando as resinas de troca iônica e de interação hidrofóbica.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo descreve sucintamente os conceitos básicos das técnicas empregadas neste trabalho, juntamente com informações relevantes retiradas da literatura, tais como: fundamentos de purificação de proteínas, características do soro do leite, cromatografia de troca iônica e de interação hidrofóbica.

2.1. SORO DE LEITE

O soro de leite é um subproduto oriundo da manufatura da caseína para a produção de queijos, contém aproximadamente 10% de sólidos e representa cerca de 85% do volume inicial do leite. A composição natural do soro de leite é rica em lactose (4,0 a 4,5% p/v), proteínas (0,7 a 0,9% p/v) e possui pequenas quantidades de ácidos orgânicos, lipídios e sais minerais que possibilitam o aproveitamento comercial de seus nutrientes. Este aproveitamento pode ser feito de forma direta como alimentação animal, ou indiretamente após a ultrafiltração para produção de lactose, concentrados protéicos e de compostos orgânicos por via fermentativa com etanol e ácido láctico (McKENZEY, 1970; MORR & HA, 1993).

Existem dois tipos de soro de leite: o proveniente da produção de queijo

doce (sweet) e o da produção do queijo ácido ou caseiro (cottage). No entanto, suas composições são muito semelhantes, com respeito a lactose, proteínas e outros minerais, (MORR & HA, 1993), conforme pode ser observado na Tabela 2.1.1.

O elevado conteúdo de proteínas presentes no soro de leite motivou o desenvolvimento de formulações alimentares para o consumo humano, visando regular a relação proteína / caseína do leite materno na alimentação de crianças prematuras. Quando comparadas as composições do soro de leite bovino e humano (Tabela 2.1.2), observa-se que há elevada concentração de β -Lg no soro bovino, inviabilizando sua adição direta “in natura” em alimentos infantis, uma vez que a β -Lg é considerada uma proteína alergênica. A lactoferrina e as imunoglobulinas também são proteínas presentes no soro, porém em menores quantidades. Estas são de fundamental importância devido às suas propriedades imunológicas, nas formulações de alimentos infantis (COIMBRA, 1995).

Tabela 2.1.1: Composição do soro de queijo doce e ácido.

Constituinte (%)	Doce (pH 6,3)	Ácido (pH 4,6)
Cinza	0,53	0,69
Lactose	4,77	4,71
Proteína	0,82	0,75
Gordura	0,07	0,03
Ácido Láctico	0,15	0,55
Cálcio	0,05	0,13
Sódio	0,07	0,06
Potássio	0,13	0,15
Fósforo	0,06	0,09

Fonte MORR & HA, 1993

Tabela 2.1.2: Composição protéica do leite humano e leite bovino.

Proteínas	Conc. Leite Humano (g.L ⁻¹)	Conc. Leite Bovino (g.L ⁻¹)
Fração de caseína	3,6	26
β-lactoglobulina	Traços	3,7
α-lactalbumina	2,8	1,2
Albumina	0,6	0,4
Lisozima	0,4	Traços
Lactoferrina	2,0	0,1
Imunoglobulinas	1,0	0,7

Fonte MORR & HA, 1993

2.2. AS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE.

As proteínas de soro de leite são aquelas que permaneceram retidas no soro proveniente da produção de queijo, após a coagulação da caseína, geralmente realizada a 25 °C e pH 4,6 (IMAFIDON *et al*, 1997). Têm excelente valor nutritivo, apresentando quociente de eficiência protéica (PER) da ordem de 3,4, superando inclusive o da caseína que fica em torno de 3,0 (DELANEY, 1976). 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. A Tabela 2.2.1 mostra a influência da concentração de proteína no valor do PER para várias proteínas, inclusive para a α-La (SGARBIERI, 1987).

A utilização direta do soro como alimento é bastante limitada devido ao alto teor de água (> 90%) e baixo teor protéico (< 0,9 %), fazendo com que os custos para concentração e secagem se tornem muito elevados. Na maioria das indústrias de queijos, para cada 10 litros de leite utilizado, obtém-se 1 quilograma de queijo fresco e 9 litros de soro como subproduto daí a relevância econômica de se dar um destino mais nobre para este material. Na Tabela 2.2.2, estão presentes

as principais propriedades físico-químicas das principais proteínas do soro de leite bovino.

Tabela 2.2.1: Influência da concentração de proteína, na dieta de camundongos sobre os valores de PER para diferentes proteínas.

Concentração de proteína (%)		PER
α -Lactalbumina	(6)	3,34
	(9)	4,10
	(12)	3,86
Caseína	(6)	2,05
	(9)	3,00
	(12)	3,32
Proteína de Soja	(6)	0,95
	(9)	1,86
	(12)	2,44
Mistura de Carne e Vegetais	(6)	1,50
	(9)	2,35
	(12)	2,63

Fonte, SGARBIERI, 1987

Tabela 2.2.2: Algumas das principais propriedades das proteínas do soro de leite bovino.

Proteínas	Concentração (g/L)	Massa Molecular (kDa)	Ponto Isoelétrico (pI)
β -lactoglobulina	3,0-4,0	18,4	5,2
α -lactalbumina	1,5	14,2	4,7
Soralbumina	0,3-0,6	69	4,9
IgG, IgA, IgM	0,6-0,9	150-900	5,8-7,3
Lactoperoxidase	0,06	78	9,6
Lactoferrina	0,05	78	8,0

Fonte McKENZIEY (1970)

2.2.1- α -Lactalbumina

A α -lactalbumina (α -La) é uma importante proteína presente na composição do leite de muitos animais mamíferos, sendo uma das principais proteínas do leite humano. Trata-se de uma proteína hidrofóbica, que se liga a íons metálicos como o cálcio e zinco, sendo assim classificada como uma metaloproteína. É constituída por 123 resíduos de aminoácidos apresentando-se na forma esférica, altamente compacta e sua estrutura globular possui quatro ligações de dissulfetos. Possui massa molecular próxima de 14,0 kDa e ponto isoelétrico de 4,8, representando cerca de 20% do total de proteínas presentes no soro de leite bovino (JAMES, 1994). É um componente auxiliar na quebra ou união de ligações glicosídeas $\alpha(1-4)$, mesmo quando não se encontra no centro da lactose sintetase (SGARBIERI, 1996). A α -La é susceptível ao tratamento térmico, desnaturando-se em pH 6,7 e 65 °C, com 80 a 90% de reversibilidade sob resfriamento (MORR & HA, 1993).

Possui tendência de formar associações em pHs abaixo de seu ponto isoelétrico. No pH natural do leite, e acima deste, a α -La aparece como monômero. Duas variantes genéticas (A e B) já foram identificadas, mas somente a variante B tem sido observada em leites das raças bovinas ocidentais. Mudanças de hidrofobicidade superficial da α -La, podem ser ocasionadas pela adição ou remoção de íons Ca^{+2} de sua estrutura. Foi demonstrado que a descalcificação da α -La expõe os domínios hidrofóbicos, os quais tornam-se menos acessíveis à medida que o íon cálcio liga-se à proteína (EYNARD *et al*, 1992).

2.2.2- β -Lactoglobulina

A β -lactoglobulina (β -Lg) é a proteína mais abundante no soro de leite representando aproximadamente 50% do total de proteínas. É constituída por 162 resíduos de aminoácidos com a massa molecular de 18,3 kDa e ponto isoelétrico entre o pH 5,35 e 5,49. A β -Lg, como a α -La, é também sensível a temperatura,

sendo desnaturada reversivelmente até a temperaturas de 65 °C, porém com extensa mudança conformacional. Se torna mais estável com o aumento da concentração de íons fosfato nas soluções. Uma propriedade importante desta proteína é a capacidade de ligação “in vitro” a algumas substâncias hidrofóbicas, tais como ácidos graxos e retinol (COIMBRA, 1995). São encontradas duas variantes genéticas, A e B, da β -Lg. A estrutura β -Lg é extremamente dependente do pH, ela existe como um dímero de massa molecular igual a 36,7 kDa em solução acima do ponto isoelétrico de 5,5 até o pH 7,5. Na faixa de pH 3,5 a 5,2, o dímero polimeriza para um octômero de massa molécula 147 kDa. Abaixo de pH 3,5 ou acima de pH 7,5 dissocia-se nos monômeros correspondentes (MORR & HA, 1993).

2.2.3- Albumina de soro bovino

A albumina de soro bovino (BSA) está presente no leite em concentrações próximas de 0,1 a 0,4 g.L⁻¹. Possui massa molecular de 69 kDa e ponto isoelétrico igual a 4,9, é constituída de 582 resíduos de aminoácidos, sendo a proteína com maior cadeia de polipeptídio das proteínas do soro, possuindo 17 ligações de dissulfetos e um grupo de sulfidrílico livre no resíduo 34 (MORR & HA, 1993). A ligação da BSA com ácidos graxos estabiliza as moléculas evitando a desnaturação pelo calor, é solúvel em água até 35% a 3 °C, mas nota-se uma extensiva precipitação na faixa de temperatura de 40 a 50 °C.

2.2.4- Imunoglobulinas

As imunoglobulinas (Ig), pertencem a família heterogênea das glicoproteínas com massa molecular variando de 150 a 1000 kDa e ponto isoelétrico na faixa de 5,8 a 7,3. São classificadas em cinco tipos, IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, as quais têm sido identificadas no leite e no soro sangüíneo. As Ig estão presentes no leite em concentrações entre 0,6 a 1,0 g.L⁻¹, sendo que 80% das Ig são do tipo IgG. Estas proteínas são extremamente termoestáveis devido

principalmente às interações com BSA através da formação de ligações de dissulfetos, porém exibem alta desnaturação com a temperatura quando em presença da α -La e β -Lg, (JAMES, 1994; SGARBIERI, 1996).

2.2.5- Outras proteínas do soro do leite

As proteínas presentes no soro em menores concentrações têm sido também isoladas, por possuírem importantes propriedades biológicas e antimicrobianas, com alto valor nutricional e imunológico. Dentre estas destacam-se: lactoperoxidase, lactoferrinas e lisozima (MORR & KA, 1993).

Dentre estas frações menores merece destaque a lactoferrina, que se liga fortemente a dois átomos de ferro, sendo classificada também de metaloproteína, como a α -La. Com o conteúdo normal de ferro essa proteína é bastante resistente à desnaturação térmica e química e à ação enzimática. Possui massa molecular entre 80 kDa e 92 kDa, e ponto isoelétrico entre 8,4 e 9,0 (JAMES, 1994). Por causa do seu alto ponto isoelétrico, a lactoferrina mostra notável tendência para se complexar com outras macromoléculas, tais como DNA, BSA e β -Lg. Devido a esta característica da lactoferrina de fixar o ferro na forma de quelato, ela exerce ação bacteriostática contra microrganismos patogênicos presentes no leite que dependem de ferro livre (SGARBIERI, 1996).

2.3. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

Diferentes métodos para purificar as proteínas do soro têm sido descritos. Os métodos freqüentemente propostos para a separação são: precipitação, extração em duas fases aquosas, ultrafiltração, eletrodialise e a cromatografia que envolve técnicas de troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade e filtração em gel. O principal objetivo da purificação é a obtenção do máximo rendimento com alta pureza, evitando a perda de atividade e o aumento dos custos efetivos. A Tabela 2.3.1, apresenta algumas características dos métodos de separação e purificação mais utilizados.

Tabela 2.3.1: Métodos de separação geralmente empregados em purificação.

Métodos	Propriedade Explorada	Capacidade	Resolução	Rendimento	Custo
Precipitação com mudança de pH	Carga	Alta	Muito Baixa	Médio	Baixo
Precipitação (NH ₄) ₂ SO ₄	Hidrofobicidade	Alta	Muito Baixa	Alto	Baixo
Extração em duas Fases Aquosas	Bioafinidade	Alta	Muito Baixa	Alto	Baixo
Cromatografia por Troca Iônica	Carga	Média	Média	Médio	Médio
Cromatografia por Interação Hidrofóbica	Hidrofobicidade	Média	Média	Médio	Médio
Cromatografia por Afinidade	Bioafinidade	Média	Alta	Baixo	Alto
Cromatografia por Filtração em Gel	Tamanho	Muito baixa	Baixa	Alto	Médio

Fonte HARRIS & ANGAL 1990.

Vários trabalhos de purificação de proteínas do soro do leite relatados na literatura envolvem a maioria das técnicas apresentadas na Tabela 2.3.1. KANEKO *et al* (1985) concentraram β -Lg e α -La do soro por precipitação com FeCl₃. AL-MASHIKI e NAKAI (1987) reduziram a quantidade de β -Lg do soro por precipitação com polifosfatos. MEHRA e DONNELLY (1993) empregaram separação por membrana de ultrafiltração e eletrodialise para o fracionamento das proteínas do soro. CHEN (1992) descreveu a utilização de um sistema aquoso bifásico, composto de PEG-fosfato de potássio, para a separação da β -Lg e α -La do soro.

IMAFIDON *et al* (1997) utilizaram a precipitação e a cromatografia de troca iônica com as resinas DEAE-Sephadex A-50 e a DEAE-Sepharose, para a

separação e purificação das proteínas do soro de leite, entre elas a α -La e a β -Lg, utilizando Imidazol-HCl com NaCl como tampão de eluição. O uso do Imidazol-HCl como tampão, é limitado e não deve ser utilizado para purificar proteínas com destinos alimentares.

ASCHARFFERBURG e DREWRY (1957) e ASCHARFFERBURG (1968) desenvolveram métodos de precipitação para obtenção da β -Lg e α -La, respectivamente, que ainda hoje são utilizados para aumentar a pureza dessas proteínas em determinada etapa do processo de purificação.

YOSHIDA (1990) separou as proteínas do soro de leite em cinco frações através de filtração em gel usando Sephacryl S-200. Uma das frações (fração 5), possuía a β -Lg na forma de dímero, onde as duas variantes foram separadas por cromatografia de troca iônica em pH 6,8. A quinta fração possuía a α -La que foi separada por cromatografia de troca iônica (DEAE).

CARRÉRE *et al* (1996) recuperaram a α -La e a β -Lg utilizando cromatografia de troca iônica em leite fluidizado, sem clarificação prévia do soro de leite. O adsorvente utilizado foi QMA Spherosil e HCl como solução de eluição. O principal objetivo deste trabalho foi propor um modelo simplificado que representasse as etapas de adsorção, eluição e lavagem em um processo cíclico. Foi também realizado uma otimização econômica do processo.

HANS *et al*, (1998) estudaram diversas resinas de troca catiônica na purificação das proteínas do lacto-soro e do colostro bovino, usando colunas com leite fixo. Os adsorventes avaliados foram a S-Sepharose FF, Fractogel EMD (S), S-Hyper D-F e a Macro-Prep High S, a eluição foi realizada com gradiente de 0,1M a 1,0 M de NaCl, independente do adsorvente estudado. Os adsorventes que apresentaram forte interação com a β -Lg obtendo frações concentradas de eluição foram as resinas S-Hyper D-F e a Macro-Prep High S.

A cromatografia de interação hidrofóbica pode ser aplicada na purificação da α -La com sucesso, uma vez que esta proteína possui a maior quantidade de resíduos hidrofóbicos entre as proteínas do soro de leite. LINDAHL e VOGEL (1984) separaram a α -La do leite bovino, suíno e caprino utilizando um leite fixo com a resina de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose. O tampão de adsorção

utilizado foi o Tris-HCl, pH 7,5 e 1 mM de EDTA, na eluição o EDTA foi substituído pelo íon Ca^{+2} , explorando a propriedade da α -La de se ligar a este íon. Este procedimento foi bem sucedido em obter α -La na forma pura. Esta resina não adsorve a β -Lg na presença do tampão Tris-EDTA, com concentração de 50 mM do EDTA. Devido a presença do cálcio no tampão de eluição, este íon se liga a α -La tornando esta proteína hidrofílica favorecendo a sua dessorção da resina hidrofóbica.

2.4. ADSORÇÃO EM MATRIZES SÓLIDAS

A adsorção é um fenômeno que ocorre quando um soluto dissolvido é ligado a um adsorvente sólido, concentrando sobre sua superfície sem haver uma mudança química, onde as principais forças que governam a adsorção são as de Van der Waals e de polaridade. Tanto a adsorção quanto a extração são processos usados para isolar solutos de soluções diluídas. A adsorção tende a ter um menor rendimento, porém apresenta maior seletividade que a extração. Devido ao fato do equilíbrio ser não linear e das fortes interações do soluto, a adsorção é um processo que requer vários experimentos laboratoriais (BELTER *et al*, 1988).

A adsorção é um fenômeno que envolve um número de passos distintos que contribuem para a resistência à transferência de massa, conforme a Figura 2.4.1, onde se tem a transferência de massa da solução de adsorbato para a superfície externa da partícula de adsorvente; que é a resistência à difusão na película líquida, difusão dentro dos poros da partícula e a reação química na superfície da partícula (ARAUJO, 1996).

Um ou mais destes fenômenos podem ser considerados controladores no desenvolvimento de modelos matemáticos, a depender do sistema adsorbato-adsorvente e das condições hidrodinâmicas do experimento, com isto cada um destes fenômenos devem ser analisados em conjunto ou separadamente.

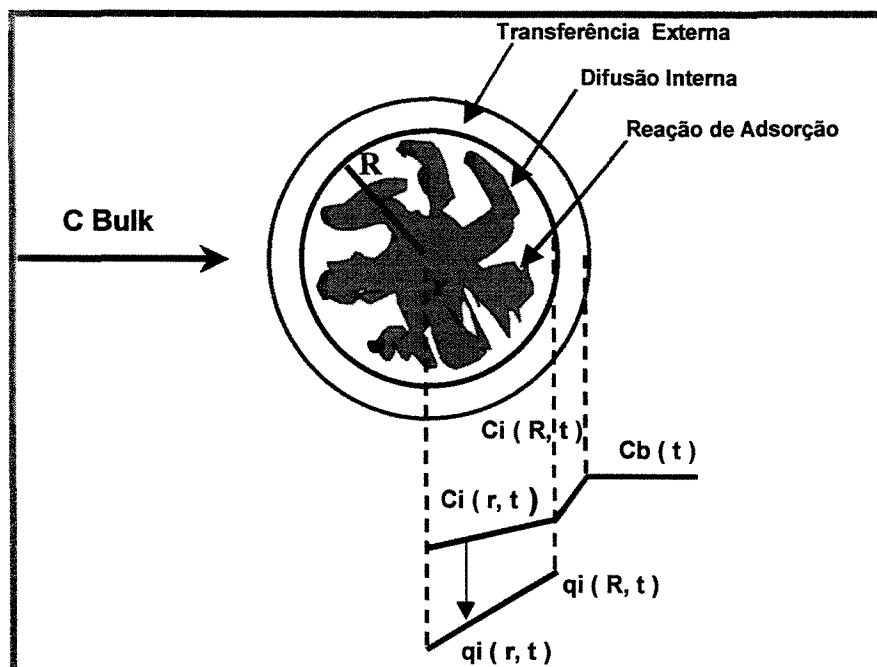


Figura 2.4.1: Fenômenos de transferência de massa numa partícula porosa (CARRÈRE, 1993).

2.5. ASPECTOS GERAIS DOS PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS

Um leito constituído de partículas de resinas sólidas percolado pelo líquido contendo as proteínas (colunas cromatográficas) é a principal forma de contato para a recuperação e separação desses compostos. A fase sólida é denominada fase estacionária enquanto a fase que contém a mistura a ser separada é a fase móvel. O princípio de separação de uma mistura consiste na existência de interação entre os constituintes da mistura e a fase estacionária, fazendo com que cada uma das espécies a ser separada seja transportada com diferentes velocidades e diferentes forças de interação com a fase estacionária, ocasionando a separação dos diversos constituintes da mistura (ARAUJO, 1996).

A interação reversível de um componente da mistura com a matriz, sob determinadas condições, possibilita a concentração desse componente, quando a eluição é realizada por alterações do meio, tais como força iônica e pH (PEREIRA, 1999).

Na cromatografia preparativa, o processo da injeção de amostra na coluna é denominado de adsorção frontal. As proteínas são injetadas continuamente até

que todo leito de resina seja percorrido, atingido o topo da coluna ocasionando assim o rompimento “breakthrough” da solução de proteína, no topo da coluna, com a resina. Geralmente, neste tipo de cromatografia a adsorção das proteínas em mistura não é independente uma das outras, e assim, quando o adsorvente torna-se saturado, ocorre a competição pelos sítios de adsorção entre as diferentes espécies presentes, conduzindo a um comportamento não linear para a adsorção. Além disso, a distribuição de cada espécie de proteína ao longo da coluna é variável devido ao efeito de deslocamento. As curvas de ruptura ou “breakthrough” expressam a concentração de proteína total em função do volume injetado, ou do tempo, quando a vazão volumétrica é constante (JAMES, 1994).

2.5.1- Adsorção em leito fixo

Um leito fixo é constituído de um tubo cilíndrico, na posição vertical preenchido por partículas de adsorvente. O fluido contendo o soluto de interesse flui da extremidade inferior do cilindro e sai na extremidade superior. Inicialmente, a concentração de soluto no efluente é baixa, uma vez que o soluto é adsorvido, ao longo do processo. A concentração do efluente aumenta, vagarosamente no começo, e aumenta abruptamente assim que há uma saturação das partículas do adsorvente, ocasionando a ruptura (breakthrough) como ilustra a Figura 2.5.1. O material adsorvido é então elutriado pela lavagem do leito (BELTER *et al*, 1988).

A quantidade total de adsorbato adsorvido em uma resina pode ser calculada pela área achurada da curva de ruptura na Figura 2.5.1. CHASE (1984a) afirma que na prática deve-se interromper a alimentação na coluna quando o nível de adsorbato na saída sobe acima de um certo nível, aproximadamente 10% da concentração inicial. Isto se deve ao fato de que há uma perda considerável do composto de interesse, que passa pela coluna sem ser adsorvido. Segundo CHASE (1984b) o cálculo do rendimento do processo de adsorção é definido pela expressão 2.5.1:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{quantidade de material adsorvido}}{\text{quantidade de material injetado na coluna}} * 100 \quad (2.5.1)$$

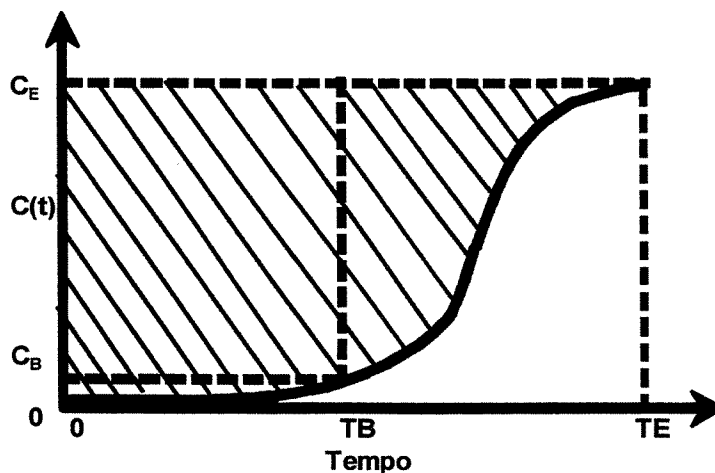


Figura 2.5.1: Curva de ruptura para a adsorção em coluna de leito fixo e expandido (BELTER *et al*, 1988). C_B é a concentração de ruptura no tempo T_B e C_E é a concentração de exaustão (saturação) no tempo T_E .

Quando a solução inicial apresenta material particulado, por exemplo extrato de meios de fermentação, há a necessidade de uma etapa de filtração antes do processo de adsorção. Este material particulado pode-se acumular nos distribuidores de fluxo da coluna ou nos espaços vazios existentes entre as partículas no leito fixo, ocasionando o entupimento ou colmatagem do leito, proporcionando um aumento na queda de pressão do sistema, inviabilizando o processo.

2.5.2- Adsorção em leito expandido

No leito expandido, as partículas do adsorvente não estão fixas, apresentando uma grande mobilidade. Essa concepção tem sido explorada por fabricantes de resinas e adsorventes, como são os casos da Pharmacia® Biotech e da Waters®, que têm procurado obter resinas mais densas e portanto mais apropriadas à operação em leitos expandidos.

A utilização de leito expandido apresenta a vantagem de operar com soluções que contenha material particulado, uma vez que neste sistema há uma porosidade global mais elevada, simplificando o processo de purificação através

da eliminação de etapas preliminares de remoção de partículas. Um detalhe importante na operação em leito expandido é que durante a etapa de eluição o leito assume a condição de leito fixo, pois assim evita-se a diluição do material dessorvido exigindo assim colunas apropriadas para a operação em leito expandido (PHARMACIA-BIOTECH, 1996).

Na Figura 2.5.2 é apresentado o esquema do ciclo completo de operação em leito expandido com as etapas de adsorção, lavagem e eluição.

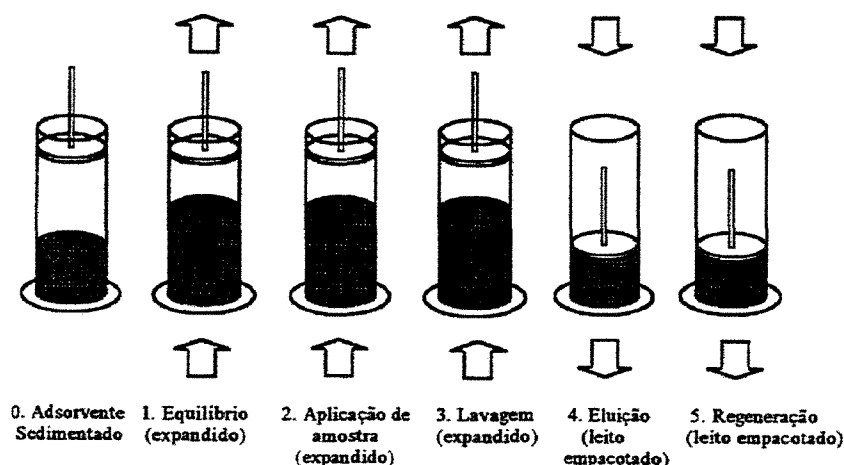


Figura 2.5.2: Esquema dos passos na adsorção em leito expandido, onde as colunas mostram os diferentes estágios de operação dos sistema. As setas indicam a direção do escoamento (PHARMACIA -BIOTECH, 1996).

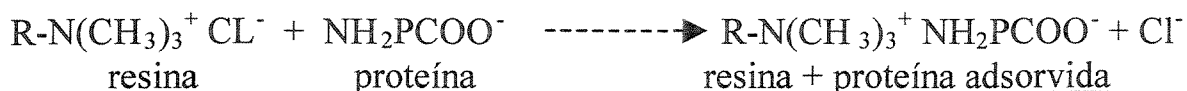
2.6. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

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 e BRAGA, 1990).

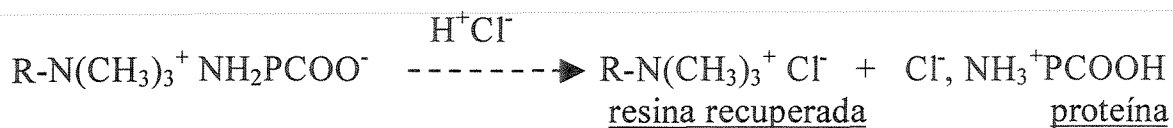
As resinas trocadoras de íons apresentam estrutura macroporosas rígidas, com elevada capacidade de adsorção, geralmente constituídas de sílica, quartzo ou agarose, apresentando boa estabilidade em uma ampla faixa de pH.

As proteínas são adsorvidas nas resinas trocadoras de íons por ligações do tipo eletrostática que se formam entre as cargas da superfície da proteína e os grupos carregados das resinas. As cargas são balanceadas por contra-íons tais como íons cloreto, íons metálicos ou mesmo íons existentes na própria solução tampão. A molécula de proteína desloca os contra-íons que se situam nos poros da resina e se liga ao adsorvente. Como resultado global, a região do adsorvente se torna eletricamente neutra e o saldo de carga da proteína será de mesmo sinal que os contra-íons deslocados, resultando daí o nome troca de íons para o mecanismo de adsorção (ARAÚJO, 1996).

Como exemplo, tomemos 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 da proteína. A dessorção ou eluição da proteína é obtida numa etapa suplementar através da modificação do pH para um valor inferior ao pI da proteína, com a adição de um ácido como o HCl.



Esta eluição também poderia ser feita com o aumento da força iônica do meio, com a adição de sal, por exemplo o cloreto de sódio. Os ciclos de adsorção e eluição permitem obter uma concentração apropriada da proteína alvo (Figura 2.6.1).

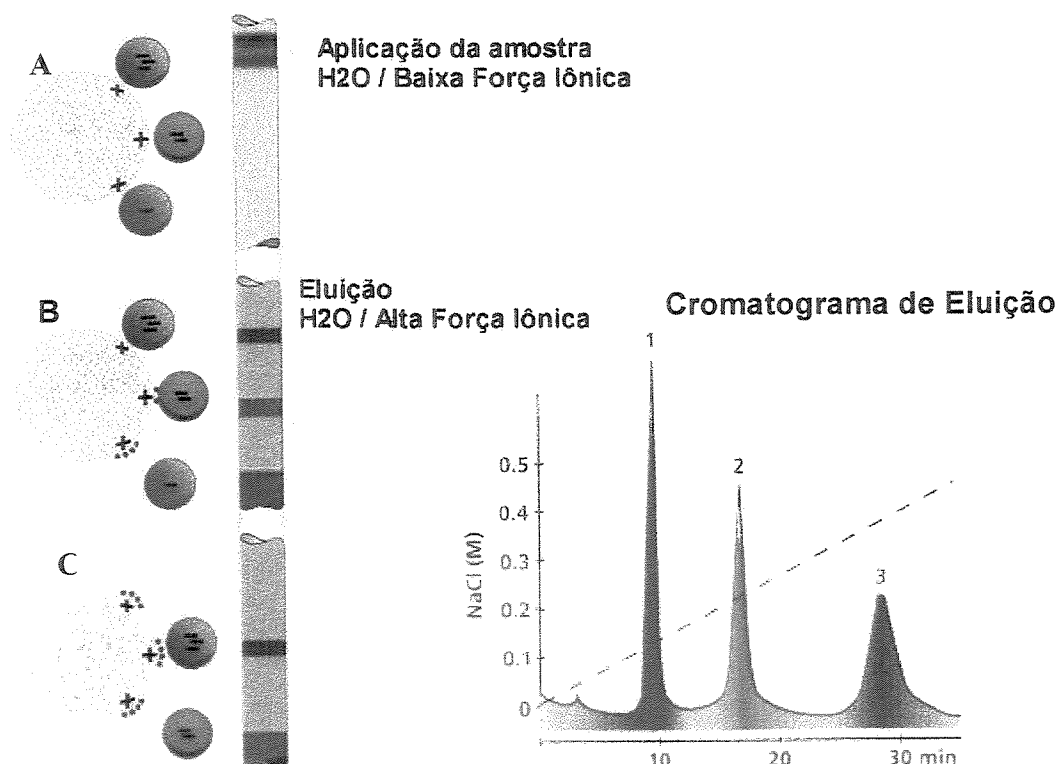


Figura 2.6.1: Esquema do processo cromatográfico de separação de proteínas por troca aniônica (TOSOHAAS).

Na Figura 2.6.1 uma solução contendo três proteínas, é introduzida em um leito de resinas de troca aniônica. Após a adsorção das proteínas na posição A, segue a etapa de eluição das proteínas com a adição de uma solução de NaCl, na forma de um gradiente crescente da concentração deste sal, como mostra o cromatograma de eluição com os picos de cada uma das proteínas eluídas ao longo do tempo. A medida que se aumenta a força iônica do meio as proteínas com menor atração pela resina, vão sendo eluídas gradativamente, posição B e C.

2.7. CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA

A cromatografia de interação hidrofóbica teve o seu crescimento a partir da década de 70, com o desenvolvimento de adsorventes para a separação de biopolímeros, explorando as propriedades hidrofóbicas das espécies presentes.

Esta técnica cromatográfica tem sido amplamente aplicada com grande sucesso na recuperação e purificação de proteínas (PHARMACIA - BIOTECH, 1993).

Esta técnica requer o pré-tratamento das amostras, sendo mais efetiva quando utilizada em combinação com outras técnicas de purificação. Inicialmente, a utilização da cromatografia de interação hidrofóbica na adsorção de proteínas era de complementar a cromatografia de troca iônica ou de filtração em gel, dando um acabamento final no processo de purificação. Atualmente, com a melhoria dos adsorventes hidrofóbicos e da sua disponibilidade comercial, a cromatografia de interação hidrofóbica vem sendo empregada na purificação de uma grande variedade de biomoléculas, como as proteínas do soro, ácidos nucleicos, hormônios, proteínas recombinantes, entre outras, tanto em laboratórios de pesquisa quanto na indústria.

O princípio da cromatografia de interação hidrofóbica baseia-se no ganho entrópico do sistema protéico, devido a 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 a exposição dos grupos apolares existentes em sua cadeia de aminoácidos. Estes grupos apolares normalmente ficam escondidos dentro das estruturas das proteínas quando em meio aquoso (PHARMACIA - BIOTECH, 1993; ARRUDA, 1999).

Os íons “salting-out” tendem a se solvatarem fortemente, aumentando a tensão superficial da água, removendo as moléculas de água estruturadas na proteína que resguardavam os resíduos aminoácidos apolares da influência do meio. A remoção da camada de água permite a interação hidrofóbica destas porções apolares, acabando por promover a precipitação das proteínas. Entretanto, para os processos cromatográficos, a adição de sal deve ser controlada de modo que não atinja o ponto de precipitação das proteínas, mas sim potencialize a afinidade de adsorção das proteínas com os adsorventes hidrofóbicos (HARRIS & ANGAL, 1995).

Os íons salting-in ou caotrópicos, ao contrário, previnem a interação hidrofóbica por desorganizar a estruturação da água do meio. As proteínas adsorvidas podem ser eluídas com aplicação destes íons ou com uma redução da concentração de sal no tampão de adsorção. Na Figura 2.7.1 são ilustrados alguns ânions e cátions que influenciam na precipitação de proteínas e o sentido em que os íons salting-out e salting-in aumentam ou diminuem, respectivamente, a hidrofobicidade do meio. Este conjunto de íons é também conhecido como a série de HOFMEISTER (PHARMACIA - BIOTECH, 1993).

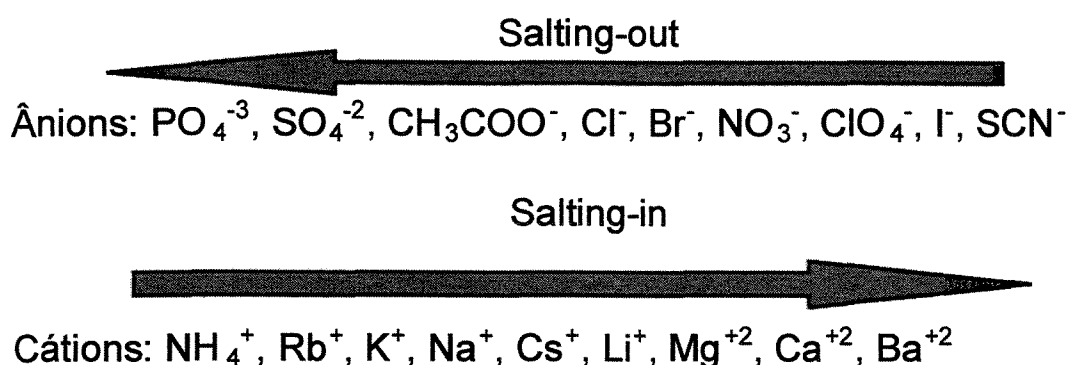


Figura 2.7.1: Ânions e cátions que influenciam na precipitação de proteínas, série de Hofmeister .

No soro de leite há uma alta concentração de íons Ca^{+2} (Tabela 2.1.1), que certamente se ligam a α -La tornando-a hidrofílica. A remoção destes íons Ca^{+2} da estrutura da α -La pode ser feita adicionando ao soro de leite, um agente quelante, por exemplo o EDTA (ácido etilenodiaminatetracético), que complexa principalmente os íons bivalentes. Livre dos íons Ca^{+2} a α -La apresenta suas características hidrofóbicas, potencializando sua adsorção nos adsorventes hidrofóbicos (NOPPE *et al*, 1998). O esquema do processo de adsorção da α -La do soro de leite empregando adsorventes hidrofóbicos está apresentado na Figura 2.7.2.

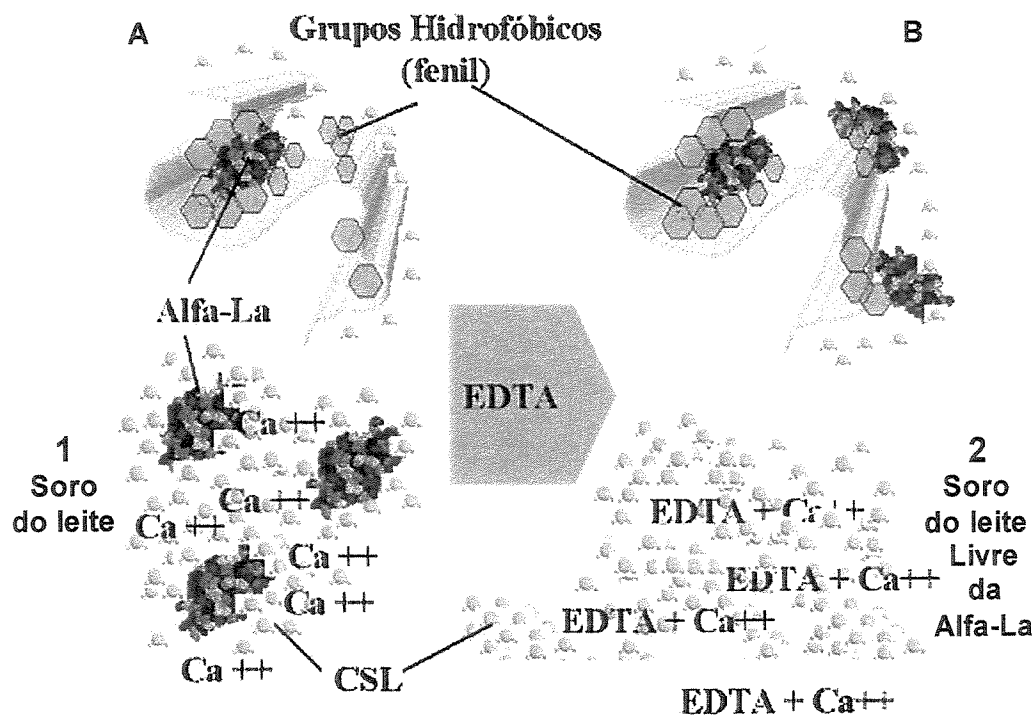


Figura 2.7.2: Esquema do processo de recuperação da α -La empregando resina de interação hidrofóbica.

Na Figura 2.7.2 tem-se o soro de leite in natura em presença de íons Ca^{+2} (posição 1), fazendo com que α -La apresente-se com baixa hidrofobicidade, adsorvendo assim pequenas quantidades nas resinas hidrofóbicas (posição A). Com a adição do agente quelante EDTA, que se complexa os íons Ca^{+2} presente no soro de leite, aumentando assim a da hidrofobicidade da α -La, potencializando uma maior adsorção desta proteína nas resinas hidrofóbicas (posição B). Com este procedimento a uma recuperação da α -La presente no soro de leite, com uma única etapa cromatográfica (posição 2).

2.8. TAMPÕES UTILIZADOS NOS PROCESSOS DE ADSORÇÃO

As soluções tamponantes empregadas nos processos de adsorção são constituídas por algum tipo de sal, escolhido de forma adequada à faixa de pH na qual se vai trabalhar. Normalmente são diluídos em água, uma vez que as

propriedades eletrolíticas da água contribuem para a dissociação dos grupos ionizáveis e crescimento da matriz. A fase móvel na cromatografia deve estar sempre tamponada para evitar flutuações no pH, o que também afetaria as cargas nas proteínas e o equilíbrio entre as fases móvel e estacionária.

Quando se empregam resinas de troca iônica, os íons das soluções tamponadas devem ser iguais aos grupos ionizáveis presentes na superfície da matriz. Na Tabela 2.8.1 são apresentados os principais tampões empregados em cromatografia de troca iônica. A solução tampão mais apropriada para um processo de purificação dependerá da escolha do trocador iônico e do pH de adsorção (PEREIRA, 1999).

Tabela 2.8.1: Tampões geralmente empregados em cromatografia de troca iônica.

Trocadores de Íons	Tampão	Faixa de pH Tamponante
Catiônicos	Citrato	2,6-3,8
	Acetato	4,8-5,3
	MÊS	5,5-6,8
	Fosfato	6,7-7,6
	HEPES	7,6-8,2
Aniônicos	Piperazina	5,0-6,0
	Bis-Tris	5,7-6,6
	Trietanolamina	7,3-7,7
	Tris	7,5-8,5
	Etanolamina	9,0-9,5

Fonte: PHARMACIA – BIOTECH, 1999

Na cromatografia de interação hidrofóbica, a adição de determinados tipos de sais neutros tanto no tampão de equilíbrio, quanto na solução protéica promove uma variação na interação entre a proteína e no ligante da matriz. O tipo de sal a ser empregado irá depender da etapa cromatográfica: na adsorção a adição de sal deve ser controlada de modo a aumentar a hidrofobicidade das proteínas sem

atingir o seu ponto de precipitação, efeito salting-out, na etapa de eluição é comumente fazer uma diminuição do gradiente de sal, ou empregar um íon caotrópico, efeito salting-in. A escolha do tipo de sal geralmente segue a série de HOFMEISTER, Figura 2.7.1. O pH de operação deve ser escolhido com cautela, em geral, o aumento do pH debilita a hidrofobicidade devido ao aumento dos grupos carregados, conduzindo assim para um aumento aparente da hidrofiliabilidade das proteínas. Por outro lado, a diminuição no valor do pH resulta em um aumento na interação hidrofóbica. As proteínas que não se ligam ao adsorvente hidrofóbico em pH neutro, ligam-se a pH ácido, uma faixa recomendada para valores de pH é entre 5,0 a 8,5 (PHARMACIA - BIOTECH, 1993).

2.9. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Isotermas de adsorção na condição de equilíbrio, é um termo utilizado para descrever a relação entre a quantidade de proteína ligada e a concentração de proteína que permanece em solução nas condições estabelecidas para a adsorção. A análise da adsorção é baseada no equilíbrio entre as fases envolvidas e nos balanços de massa, que é apresentado na forma de isoterma de adsorção.

A adsorção da α -La nos adsorventes (resinas) de troca iônica e de interação hidrofóbica, pode ser representada pela reação:



onde A é a proteína a ser adsorvida, B é o adsorvente (resina), AB é o complexo proteína-adsorvente e k_1 e k_2 são as constantes cinéticas intrínsecas da relação adsorção e de dessorção, onde pode estar incluídos as resistência externa à transferência de massa, resistência à difusão nos poros e resistência à reação na superfície. Esta aproximação menos rigorosa torna a formulação matemática mais facilmente tratável (TABOADA, 1999).

A velocidade de reação da adsorção que é a taxa de variação da

concentração de proteína na superfície do adsorvente é dada por (CHASE, 1984a):

$$r_q = \frac{dq}{dt} = k_1 C(q_m - q) - k_2 q \quad (2.9.2)$$

onde C ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) é a concentração de proteína em solução, k_1 ($\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) e k_2 (min^{-1}) são as constantes da reação de adsorção e dessorção, q ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) é a concentração de proteína por unidade de massa do adsorvente, q_m ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) é a capacidade máxima de adsorção do adsorvente e t (min) representa o tempo.

Na condição de equilíbrio a Equação 2.9.2 iguala-se a zero, e rearranjando a equação, a velocidade de reação corresponde a equação de Langmuir (1916), conforme a equação 2.9.3.

$$q^* = \frac{q_m \cdot c^*}{k_d + c^*} \quad (2.9.3)$$

onde k_d é a constante de dissociação que descreve o equilíbrio da reação de adsorção ($k_d = k_2 / k_1$), e o superescrito (*) denota a condição de equilíbrio entre as fases de sólido e líquido.

O modelo de Langmuir se baseia nas seguintes hipóteses:

- a) a adsorção é limitada a uma camada;
- b) a superfície interna do sólido é homogênea e apresenta um número de sítios finito;
- c) as moléculas adsorvidas não interagem entre si;
- d) no caso da adsorção competitiva de compostos diversos, a entalpia de adsorção é a mesma para todas as moléculas.

Apesar de sua simplicidade, a isoterma do tipo Langmuir ajusta com boa precisão na adsorção de proteínas (HORSTMANN e CHASE, 1989; DRAEGER e CHASE, 1984a; JAMES, 1994; ARAUJO, 1996; PEREIRA, 1999).

2.10. CINÉTICA DE ADSORÇÃO EM TANQUE AGITADO

2.10.1. Tanque Agitado

Um sistema de tanque agitado, consiste de um sistema de adsorção em batelada com dispositivos de agitação. Neste sistema um volume V (mL) de solução protéica com concentração inicial C_o (mg.mL⁻¹), fase de líquido é colocado em contato, sob agitação, com um volume v (mL) de adsorvente, fase de sólidos. A concentração de proteína na fase de líquido diminui com o tempo, até que o equilíbrio seja atingido entre as fases de líquido e sólido (PEREIRA, 1999). Após um dado intervalo de tempo pode-se calcular a concentração de proteínas adsorvidas no adsorvente, fazendo um balanço de massa no tanque, que resulta na Equação 2.10.1:

$$q = (C_o - C_b) \frac{V}{v} \quad (2.10.1)$$

onde C_b (mg.mL⁻¹) é a concentração de proteínas em solução no final do intervalo de tempo considerado.

2.10.2. Modelo matemático de adsorção com cinética a taxa constante

Os processos de adsorção envolvendo macromoléculas, como as proteínas, são geralmente controlados pela resistência à transferência de massa, que inclui a resistência difusiva no filme externo, a resistência difusiva na superfície e nos poros, e a resistência no sítio ativo. Muitos modelos podem ser encontrados na literatura com vários graus de complexidade. Entretanto, a dificuldade encontrada na determinação dos parâmetros dos modelos utilizando técnicas experimentais limita a utilização de um modelo ou de outro (HASHIM *et al*, 1996; CRUZ, 1997).

Um modelo cinético empírico, simplificado, descrito por SKIDMORE *et al*, (1990), descreve o processo de adsorção e dessorção, sendo que a taxa constante da cinética é determinada experimentalmente. De acordo com este modelo, a taxa de reação na superfície é baixa em comparação com a taxa de transferência de massa, de tal forma que a concentração do adsorbato é a mesma fora e no interior dos poros da partícula de adsorvente (PEREIRA, 1999), sendo a taxa controladora do processo de adsorção. A função da taxa leva em conta a natureza reversível da interação adsorvente-proteína.

A partir das Equações 2.9.2 e 2.10.1, pode se obter a taxa da variação da concentração de proteína na fase de líquido utilizando um sistema de tanque agitado, obtendo a Equação 2.10.2.

$$\frac{dC_b}{dt} = -(k_1 q_m \eta) C_b + k_1 (C_o - C_b) C_b + (k_1 k_d) (C_o - C_b) \quad (2.10.2)$$

em que $\eta = v / V$, que é a razão do volume do adsorvente (fase sólida) pelo volume da solução protéica (fase de líquido). A solução analítica da equação 2.10.2, apresentada por SKIDMORE *et al*, (1990), é:

$$C_b = C_o - \eta \left[\frac{(b+a)(1 - \exp\{-2ak_1\eta t\})}{\left(\frac{b+a}{b-a}\right) - \exp\{-2ak_1\eta t\}} \right] \quad (2.10.3)$$

em que

$$a^2 = b^2 - \left(\frac{C_o}{\eta} \right) q_m \quad (2.10.4)$$

e,

$$b = \frac{1}{2} \left(\frac{C_o}{\eta} + q_m + \frac{k_d}{\eta} \right) \quad (2.10.5)$$

Este modelo foi utilizado por PEREIRA (1999), ajustando-se bem a adsorção da enzima β -Galactosidase, e utilizado também por CRUZ (1997), para a adsorção de insulina, em ambos trabalhos foi utilizado a resina de troca iônica Accell Plus QMA.

CAPÍTULO 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. MATÉRIA PRIMA

3.1.1- Proteínas padrão

A proteína padrão utilizada neste estudo foi a α -lactalbumina - α -La com pureza de 85%, adquirida da Sigma® Chemical Co. (EUA). A α -La foi utilizada para a obtenção das curvas de isothermas de equilíbrio e cinética de adsorção em tanques agitados.

Duas outras proteínas padrão foram utilizadas, a β -Lactoglobulina - β -Lg com 80% de pureza também adquirida da Sigma® Chemical Co. (EUA), e a Imunoglobulina G – IgG, humana, obtida da Centeon Pharma (Alemanha), ambas utilizadas somente na quantificação das frações de proteínas obtidas nas etapas eluição dos processos cromatográficos.

3.1.2- Concentrado protéico do soro de leite

O concentrado protéico do soro de leite bovino (CSL) utilizado neste trabalho para a recuperação e purificação da α -Lactalbumina é proveniente da produção de queijo. Foi produzido e fornecido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas, SP.

O concentrado do soro do leite e os demais subprodutos da produção de queijo, mostrados no fluxograma da Figura 3.1.1, foram produzidos em uma planta piloto do TECNOLAT, órgão do próprio ITAL, com o leite fornecido pela Cooperativa dos Produtores de Leite da Região de Campinas, localizada em Jaguariúna, SP. O leite, já desnatado e pasteurizado a 72 °C por 15 segundos, foi estocado em tanques encamisados de aço inox, e aquecido a uma temperatura de 35 °C para coagulação prévia.

A adição do coalho, que contém a enzima quimosina, foi feita a uma proporção de 30 mL coalho para cada 100 L de leite, juntamente com uma solução de 50% de CaCl_2 em uma proporção de 25 mL para cada 100 L de leite, concentrações referentes a produção do queijo do tipo doce. O material foi homogeneizado e mantido em repouso por um período de 40 a 60 minutos para a coagulação. O material já coagulado foi cortado para a melhor separação do soro.

O soro do leite obtido foi estocado em tanque inox de 200 L, aquecido a 37°C, e submetido a um processo de ultrafiltração através de membranas com diâmetro de corte para moléculas maiores que de 5 kDa, até atingir um fator de concentração variando de 8 a 10 vezes, seguido de 12 ciclos de diafiltração. Após o término do processo, o soro concentrado foi acondicionado em bandejas e congelado em câmara a -20°C, e posteriormente submetido a desidratação por liofilização, possibilitando assim a estocagem do CSL por longo período, sob refrigeração de 0 °C a 8 °C.

Uma vez hidratado o CSL, suas características protéicas são quase que completamente reconstituídas. Na Tabela 3.1.1 pode-se observar algumas características dos concentrados protéicos, para o soro doce e ácido, obtidos a partir do leite bovino.

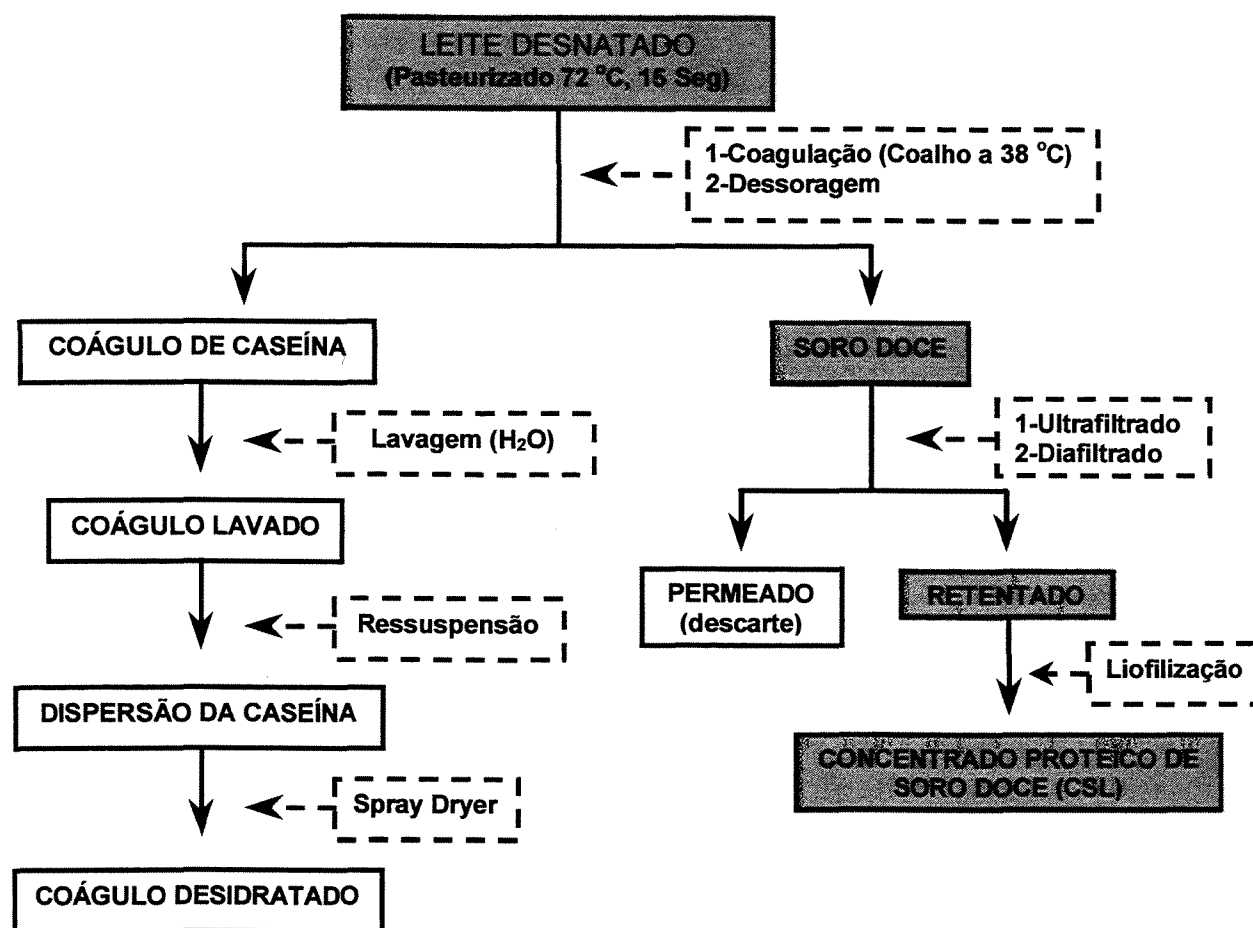


Figura 3.1.1: Fluxograma geral da produção do concentrado protéico de soro de leite do tipo doce.

Tabela 3.1.1: Composição e solubilidade dos concentrados protéicos de soro de leite (base seca).

Análises	Soro Doce	Soro ácido
% Sólidos Totais	96,37	93,84
% Proteína	83,84	87,23
% Cinza	2,77	1,11
% Lactose	8,87	9,58
% Lipídios Totais	4,48	2,60
% Solubilidade em pH 4,6	93,09	90,95

A existência de partículas em suspensão no CSL, notada pela sua solubilidade de 93,09 % em água, faz com que este material apresente características adequadas para trabalhos de adsorção em leite expandido.

3.2. ADSORVENTES UTILIZADOS

Quatro adsorventes foram empregados no estudo da purificação da α -La do CSL: dois de troca de ânions e dois de interação hidrofóbica, todos aprovados para a utilização em processos de produção farmacêutica e alimentícia.

Os adsorventes de troca de ânions foram Accell Plus QMA (Waters®-Division of Millipore) e Streamline DEAE (PHARMACIA - BIOTECH). O emprego destes adsorventes aniônicos na separação da α -La se justifica porque em condições de adsorção com valores de pH acima do pI da proteína, no caso da α -La de 4,8, ocorre troca de ânions entre os grupos trocadores do adsorvente e as cargas livres na superfície das proteínas.

O trocador de ânions Accell Plus QMA é preparado por um processo de polimerização que encapsula a base rígida de sílica com um ligante hidrofílico e um ligante funcional reticulado altamente estável. Este adsorvente possui um grupo de troca do tipo amino quaternário fornecendo uma excelente recuperação e alta resolução na separação de biomoléculas. Sua estrutura rígida e incompressível o faz altamente adequado para a purificação e o isolamento de proteínas e enzimas (Waters Guide, 1987). Suas características são:

Faixa de tamanho das partículas (μm): 37 - 55;

Tamanho dos poros (\AA): 500;

Massa específica das partículas secas à 22 °C (g.cm^{-3}): 1,16;

Massa específica das partículas após embebido em líquido (g.cm^{-3}): 2,32;

Porosidade da partícula: 0,60.

O segundo adsorvente de troca iônica utilizado neste estudo, Streamline DEAE, possui boas características fluidodinâmicas quando operando em leito expandido. Mantém altas capacidades de troca na faixa de pH entre 2 e 9, sendo que o número de grupos ligantes carregados varia com o valor do pH (PHARMACIA - BIOTECH, 1996). Suas características são :

Faixa de tamanho das partículas (μm): 100 - 300;
Tamanho dos poros (\AA): 500;
Massa específica média das partículas (g.cm^{-3}): 1,2;
Grau de expansão (H.Ho^{-1}) a 300 cm.h^{-1} : 2 – 3;
Porosidade da partícula: 0,65.

Os adsorventes de interação hidrofóbica estudados foram a Phenyl Sepharose CL-4B e Streamline Phenyl, ambos da PHARMACIA. O emprego destes adsorventes visou explorar as características hidrofóbicas da α -La presente no CSL, utilizando EDTA no tampão de adsorção para seqüestrar os íons cálcio ligados a α -La aumentando sua hidrofobicidade através da exposição dos sítios.

A Streamline Phenyl é uma resina hidrofóbica densa, adequada para operação em leito expandido, que apresenta uma matriz com estrutura rígida constituída de agarose e 6% de quartzo e com grupamentos fenil ligados fortemente. Apresenta alta hidrofobicidade com o mínimo de propriedades iônicas e estabilidade em pH na faixa de 3 a 13, podendo ser regenerada em até 300 ciclos de adsorção (PHARMACIA – BIOTECH, 1998). Suas características são:

Faixa de tamanho das partículas (μm): 100 – 300;
Tamanho dos poros (\AA): 500;
Massa específica média das partículas(g.cm^{-3}): 1,2;
Grau de expansão (H.Ho^{-1}) a 300 cm.h^{-1} : 2 – 3;
Velocidade superficial máxima (cm.h^{-1}): 400;
Porosidade da partícula: 0,65.

O outro adsorvente hidrofóbico estudado, Phenyl Sepharose CL-4B, apresenta-se estável em uma faixa de pH de 3 a 12, na maioria de tampões aquosos. Possui estrutura esférica contendo 4% de agarose com grupamento fenil. Esta resina é destinada a operação em leito fixo e baixa velocidade superficial (PHARMACIA – BIOTECH, 1998). Suas características são:

Tamanho médio de partículas (μm): 90;

Faixa de tamanho das partículas (μm): 45-165;

Tamanho dos poros (\AA): 400;

Massa específica média das partículas (g.cm^{-3}): 1,05;

Velocidade superficial recomendada (cm.h^{-1}): 30;

Porosidade da partícula: 0,60.

3.3. ENSAIOS DE ADSORÇÃO

Para os estudos de adsorção empregou-se dois sistemas: um em tanque agitado e outro de cromatografia líquida do tipo HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), ambos operados em batelada.

Os ensaios em tanque agitado foram realizados para determinação das melhores condições das soluções tampão (concentrações e pH) a serem utilizadas nos processos de adsorção da α -La e do CSL, com os quatro adsorventes estudados. O tanque agitado também foi empregado para a obtenção das isotermas de equilíbrio e das curvas cinéticas utilizando a α -La.

O sistema de cromatografia líquida foi utilizado na operação com as colunas cromatográficas para a obtenção das curvas de ruptura, empregando o CSL, e obtenção dos perfis de eluição das proteínas adsorvidas nas resinas. A concentração protéica do CSL utilizada foi semelhante a do soro do leite “in natura”.

As proteínas adsorvidas nas resinas foram eluídas e coletadas em frações, que posteriormente foram submetidas a uma análise qualitativa através de

eletroforese SDS-PAGE. As frações que apresentaram a α -La purificada, foram analisadas quantitativamente em uma coluna analítica de troca aniônica, possibilitando o cálculo da concentração de cada proteína no material eluído, obtendo-se o rendimento do processo de purificação, a pureza das proteínas obtidas, bem como os fatores de purificação.

3.3.1 – Determinação das condições de operação

Para determinar as condições de operação dos adsorventes, foram realizados ensaios experimentais em diferentes condições (concentração e pH) das soluções tampão. Estas soluções foram utilizadas para o condicionamento das proteínas e para o equilíbrio das resinas empregadas nos processos cromatográficos.

Nos ensaios de adsorção utilizando as resinas de troca de ânions houve a necessidade de verificar o pH mais adequado para a adsorção, em termos de capacidade de ligação e purificação das proteínas no CSL. A força iônica foi mantida constante, uma vez que o seu aumento diminui a capacidade de adsorção das proteínas nas resinas aniônicas (ARAUJO,1996). A faixa de pH estudada foi de 4,5 a 9,0, para isto três diferentes soluções tampão foram utilizadas, com concentração igual a 30 mM, foram utilizadas para o condicionamento das proteínas e dos adsorventes. Para valores de pH entre 4,5 e 5,5 a solução tampão utilizada foi de Piperazina, nos valores entre 6,0 e 7,0 foi utilizado Bis-Tris e para os valores entre 7,5 e 9,0 foi utilizado Tris. Esta variação de pH foi realizada visando determinar em qual valor ocorre o maior índice de adsorção de proteínas quando utilizando resinas aniônicas. Na etapa de eluição aumentou-se a força iônica acrescentando-se ao tampão de condicionamento 1,0 M de NaCl.

Um estudo semelhante de avaliação de pH foi realizado para as resinas hidrofóbicas, a concentração de EDTA no tampão de condicionamento do CSL e equilíbrio das resinas, também foi avaliada. Este estudo foi importante para definir qual é a concentração de agente quelante suficiente para a quelatar os íons cálcio

presentes no CSL, fazendo com que a α -La fique mais apta a adsorção nas resinas hidrofóbicas, através da exposição dos seus sítios hidrofóbicos, e assim verificar o comportamento destas resinas quanto a capacidade de adsorção e purificação da α -La presente no CSL. A faixa de pH estudada foi a mesma estudada com as resinas de troca de íons sendo que as mesmas soluções tampão, porém com concentração de 50 mM onde variou-se a concentração do agente quelante EDTA em 20, 35, 50, 65 e 100 mM. Para a etapa de eluição, no tampão de condicionamento sem EDTA, adicionou-se 1,5 mM de CaCl_2 , no pH igual a 7,5 (NOPPE *et al*, 1995).

Além disso, foi realizado um estudo a fim de verificar-se a influência da adição de sal no tampão de condicionamento, na hidrofobicidade do meio. Para isto utilizou-se um sal neutro, que segundo a série de Hofmeister, favoreça a adsorção das proteínas nos adsorventes estudados. O sal selecionado para este estudo foi o sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com concentrações variando de 0,01 a 1,0 M.

A realização destes ensaios em tanque agitado foi possível adaptando colunas de plásticos de 3 mL utilizadas para processos de filtração, providas de um filtro em sua extremidade para evitar a passagem e perda da resina. Uma massa conhecida de 100 mg de resina foi colocada no interior da coluna e equilibrada com os respectivos tampões de adsorção, para cada uma das resinas anteriormente especificadas. Após o condicionamento das resinas, o tampão de condicionamento foi substituído por um volume de 2,5 mL da solução protéica. Para os ensaios com as resinas de troca iônica a concentração do CSL foi de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e para a α -La foi de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Os ensaios com as resinas de interação hidrofóbica foram conduzidos somente com o CSL na concentração de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. As colunas foram mantidas sob agitação constante por três horas, em um sistema semelhante ao esquematizado na Figura 3.3.1.

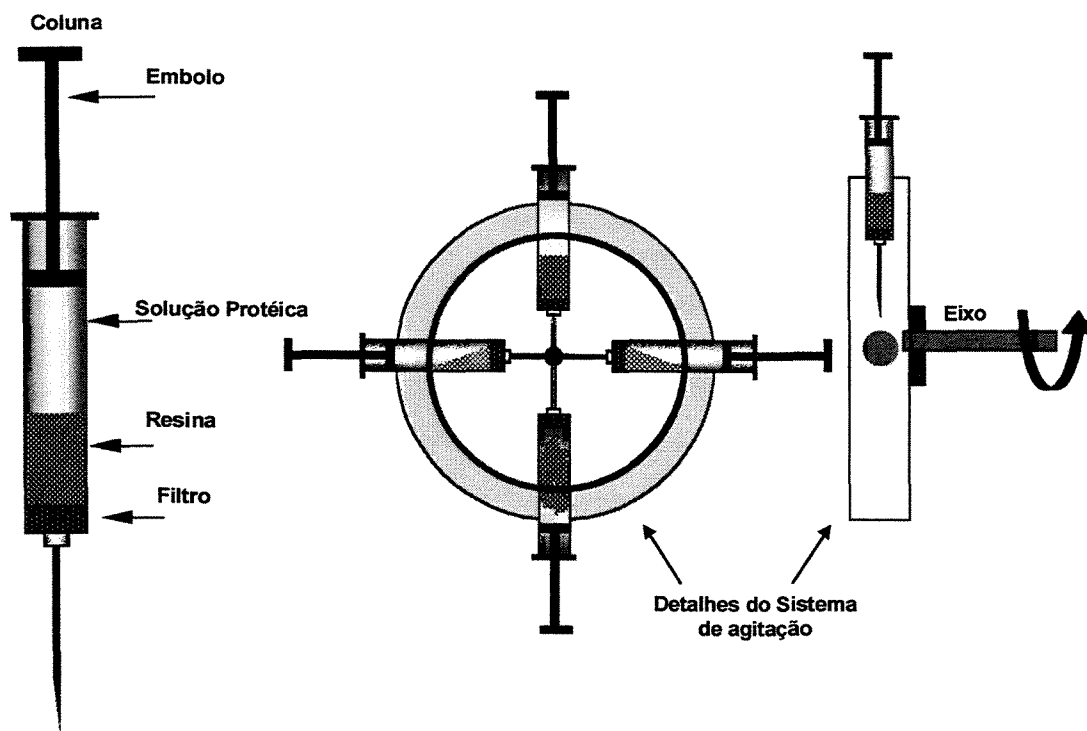


Figura 3.3.1: Esquema do sistema de agitação simulando um tanque agitado para a obtenção dos ensaios de equilíbrio.

3.3.2 – Isotermas de equilíbrio

Depois de determinadas as condições dos tampões de operação (concentração e pH), para cada adsorvente estudado, o equilíbrio da α -La foi avaliado através de ensaios utilizando diferentes concentrações iniciais de α -La, no sistema de agitação representado na Figura 3.3.1.

Os parâmetros de equilíbrio foram calculados a partir do modelo de Langmuir (equação 2.9.3), a capacidade máxima de adsorção (q_m) e a constante de dissociação (k_d) foram calculados utilizando um programa computacional, através de regressão não linear pelos métodos dos mínimos quadrados.

Uma massa de resina, 100 mg para as resinas aniônicas e 300 mg para as resinas hidrofóbicas, juntamente com 2,5 mL dos respectivos tampões de equilíbrio, foram adicionados a cada uma das colunas e mantido sob constante agitação por um tempo de três horas. Posteriormente, um volume de 2,5 mL de solução de α -La, com concentrações na faixa de 0,1 a 8,0 mg.mL⁻¹, foram

adicionadas a cada uma das colunas em substituição ao tampão de equilíbrio. As colunas permaneceram em constante agitação, também por um tempo de três horas, até que a condição de equilíbrio fosse atingida; a temperatura foi de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi então retirado e a concentração de α -La restante na solução era determinada.

A quantidade de proteína adsorvida por massa de resina é calculada fazendo um balanço de massa no sistema, através da equação 3.3.2:

$$q = \frac{(C_i - C_f) * V}{m} \quad (3.3.2)$$

Na equação 3.3.2 C_i (mg.mL^{-1}) é a concentração inicial de proteína, C_f (mg.mL^{-1}) é a concentração final das proteínas não adsorvidas presentes no sobrenadante após o equilíbrio, V (mL) é o volume da solução protéica adicionada a coluna, m (g) é a massa de resina contida em cada coluna, e q (mg.g^{-1}) é a quantidade de proteína que ficou adsorvida na resina.

3.3.3. Cinética de adsorção em tanque agitado

As curvas cinéticas foram obtidas através de ensaios em batelada, utilizando as mesmas condições empregadas na obtenção das isotermas de adsorção, empregando a proteína α -La pura.

No sistema de cromatografia líquida da Figura 3.3.2, foi adaptado um recipiente de 50 mL (tanque) onde adicionou-se um volume de 35 mL da solução protéica da α -La com diferentes concentrações iniciais e mantida sob agitação constante, aproximadamente de 200 rpm. Em seguida, uma massa de 2,0 g de resina foi adicionada ao tanque. A solução protéica era bombeada com uma velocidade de $5,0\text{ mL.min}^{-1}$, passando através de um monitor de ultra violeta (UV) com comprimento de onda igual a 280 nm, para o monitoramento da concentração da solução de α -La, que retornava ao tanque. Na extremidade do tubo conectado ao sistema de bombeamento, por onde saía a solução protéica foi utilizado um

filtro de aço sinterizado para impedir a passagem da resina, permanecendo assim, sempre dentro do tanque.

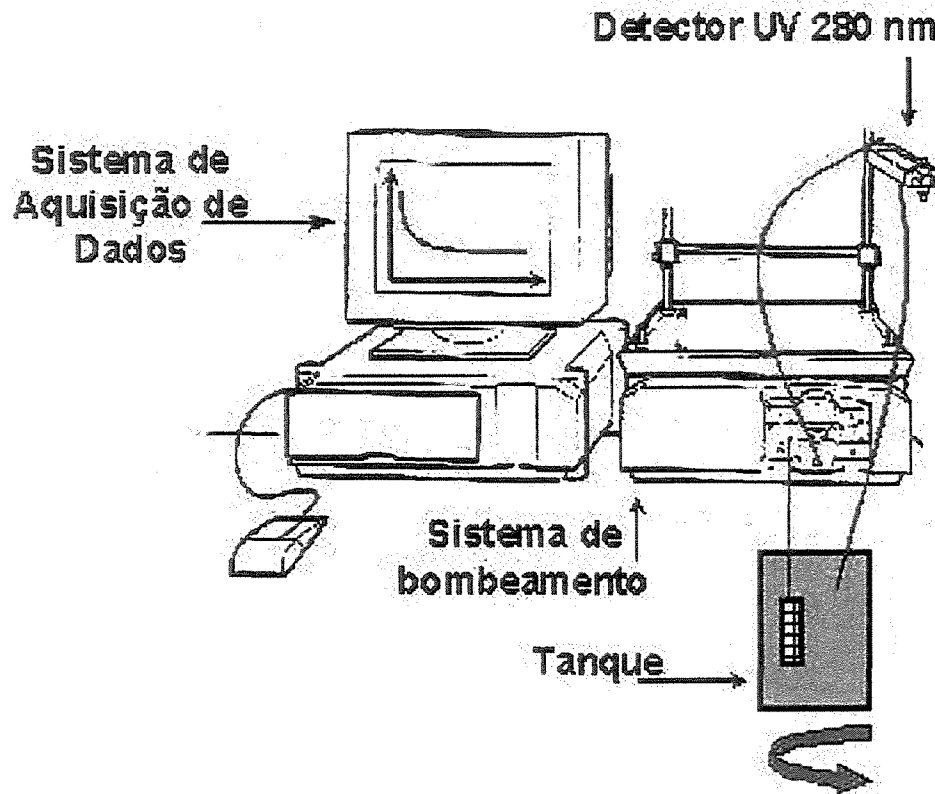


Figura 3.3.2: Sistema montado para a obtenção da cinética de adsorção simulando um tanque agitado.

A solução analítica do modelo empírico da equação 2.10.3 foi ajustados aos dados experimentais obtidos nas curvas cinéticas. Neste modelo, o único parâmetro desconhecido é a constante k_1 , relacionado com a taxa de associação de proteínas na resina, uma vez que os demais parâmetros q_m e k_d são obtidos através do modelo de Langmuir.

3.4 – ENSAIOS EM COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

Os ensaios experimentais em colunas cromatográficas foram realizados empregando-se a metodologia de leito fixo e leito expandido, a fim de se obter os

cromatogramas das curvas de ruptura e dos perfis de eluição. Empregou-se somente soluções do CSL, com concentração de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, este valor de concentração foi escolhido para se aproximar do valor da concentração protéica do soro "in natura". Todas as resinas estudadas anteriormente, foram empregadas nos ensaios com leito fixo. Apenas a resina de troca iônica Streamline DEAE e a resina hidrofóbica Streamline Phenyl foram aplicadas nos experimentos com leito expandido, por se tratarem de resinas com maior densidade, e portanto mais adequadas para operação em leito expandido.

As proteínas adsorvidas foram eluídas, com os devidos tampões de eluição definidos no item 3.3.1, sendo monitoradas com um detector UV com comprimento de onda de 280 nm e coletadas em frações de 2,0 mL. As frações referentes aos picos formados na etapa de eluição, apresentados na forma de cromatograma, foram submetidos à análise qualitativa e quantitativa.

Os ensaios de adsorção com as colunas cromatográficas foram realizados empregando um equipamento do tipo FPLC, da marca BIO-RAD (BIOLOGIC CHROMATOGRAPHY SYSTEM) totalmente automatizado, acoplado a um coletor de frações (Figura 3.4.1). As colunas cromatográficas empregadas foram as C 10/20 com 1,0 cm de diâmetro e a XK 16/20 com 1,6 cm de diâmetro, ambas da Pharmacia Biotech®.

Estudos preliminares utilizando Streamline DEAE e Streamline Phenyl, foram realizados para a verificar o grau de expansão do leito, relação entre a altura inicial do leito (H_0) na condição de leito sedimentado e a altura final (H) conseguida quando se aplica através da coluna uma determinada velocidade superficial da solução tampão. Para a coluna de 1,0 cm de diâmetro foi empacotada uma massa de 2,0 g, e que apresentou uma altura de leito sedimentado igual a 2,6 cm. Com a coluna de 1,6 cm de altura empregou-se uma massa de 6,5 g de resina, que apresentou altura inicial de 4,0 cm. A velocidade superficial empregada neste ensaio variou de 0,1 a 300 cm.h^{-1} .

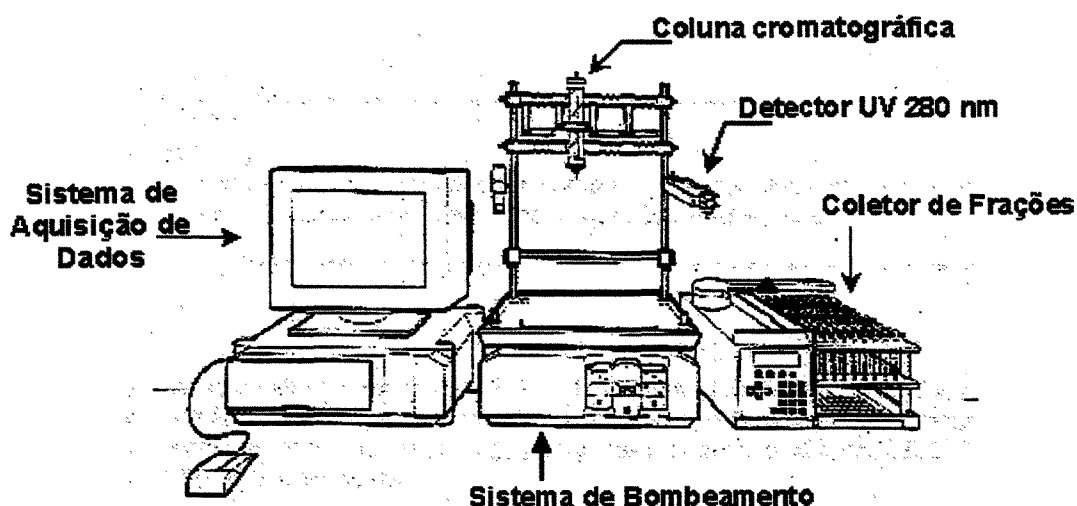


Figura 3.4.1: Sistema de cromatografia líquida de média pressão - BIO-RAD

3.5. MÉTODOS DE ANÁLISE

A concentração das proteínas presentes nas soluções do CSL e da α -La foram determinadas por medida de absorvância através de um espectrofotômetro (Philco Hitach). Para a α -Lactalbumina a medida de absorvância foi realizada no comprimento de onda de 280 nm uma vez que as soluções não apresentavam turbidez. Para o CSL a concentração de proteína foi monitorada através da diferença das medidas de absorvância a 280 nm e 320 nm. Este último comprimento de onda foi utilizado para corrigir o valor referente a turbidez da solução. Com esses dados, construiu as curvas de calibração da absorvância em função da concentração, tanto para o CSL quanto para a α -lactalbumina.

As frações de protéicas eluídas das resinas após a 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. As amostras foram preparadas em

tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol e aquecidas por 8 minutos a 100°C (condição desnaturante). A separação das proteínas foi conduzida utilizando cuba vertical da Bio-Rad, com voltagem constante de 200 V por um tempo de 45 min. O procedimento de coloração foi realizado com nitrato de prata segundo protocolo descrito por Morrysey (1981).

As frações que indicaram purificação da α -La no gel de eletroforese SDS-PAGE, foram submetidas à análise quantitativa em um sistema HPLC da marca Shimadzu, equipado com duas bombas (modelo LC-10AS), um detector UV-Visível (modelo SP-10AV) e um integrador (modelo C-R6A). Acoplou-se a este sistema uma coluna cromatográfica analítica de troca aniônica MONO Q HR 5/5 Pharmacia Biotech.

A coluna analítica foi primeiramente equilibrada, de acordo com o manual de instrução fornecido pelo fabricante, com o tampão Tris / HCl 20 mM e pH 8,0. Em seguida, um volume de 20 μ L da solução proteica padrão foi injetado na coluna. A concentração das soluções protéicas utilizadas foram na faixa de 0,3 a 1,5 mg.mL⁻¹ para a α -La e de 0,3 a 1,0 mg.mL⁻¹ para a β -Lg, ambas condicionadas no mesmo tampão de equilíbrio da coluna analítica. Após 5 minutos da injeção da solução protéica, iniciou-se a eluição das proteínas adicionando-se ao tampão de equilíbrio 0,35 M de NaCl na forma de gradiente crescente por um tempo de 25 minutos.

Para cada concentração protéica foi obtido um cromatograma onde os picos referentes às proteínas, α -La e da β -Lg foram identificados em termos de tempo de retenção, e a área de cada pico pode ser calculada utilizando o integrador. Com isto uma curva de calibração foi montada, da área dos picos para as várias concentrações em função da concentração protéica, para cada uma das proteínas padrão (α -La e da β -Lg).

O material eluído dos adsorventes após a caracterização eletroforética foi filtrado com membranas de 0,2 μ m da Millipore, sendo que 20 μ L deste material foi injetado na coluna analítica MONO Q HR 5/5, obtendo-se o cromatograma com os picos de cada uma das proteínas existentes no material eluído dos adsorventes estudados. Através do valor das áreas do pico referente a α -La foi possível

analisar a concentração e a pureza da proteína obtida na etapa de eluição. De posse desses valores é possível o cálculo do rendimento (equação 2.5.1) e do fator de purificação (FP).

Uma vez determinada a pureza da α -La no material de eluição e no CSL, o fator de purificação (FP) foi definido como:

$$FP = \frac{\text{Quantidade de } \alpha\text{-La recuperada na eluição (\%)}}{\text{Quantidade de } \alpha\text{-La no CSL (\%)}} \quad (3.5.1)$$

CAPÍTULO 4

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados os principais resultados obtidos nos ensaios visando a purificação da α -Lactalbumina, a partir do concentrado do soro de leite (CSL), empregando resinas de troca aniônica e de interação hidrofóbica.

4.1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Foram obtidas curvas de calibração para a quantificação de α -La pura e proteínas do CSL, utilizando espectrofotometria. Para a α -La pura o comprimento de onda utilizado foi igual a 280 nm, e para o CSL foi utilizado a diferença entre os comprimentos de onda à 280 nm e 320 nm. Além destas, também foram obtidas curvas de calibração para as proteínas α -La e β -Lg, empregando-se um sistema de HPLC com uma coluna analítica MONO Q.

As curvas obtidas para as soluções de α -La e do CSL são mostradas nas Figuras 4.1.1 e 4.1.2. Observa-se nestas figuras que o comportamento dos dados é linear em toda a faixa de concentração estudada.

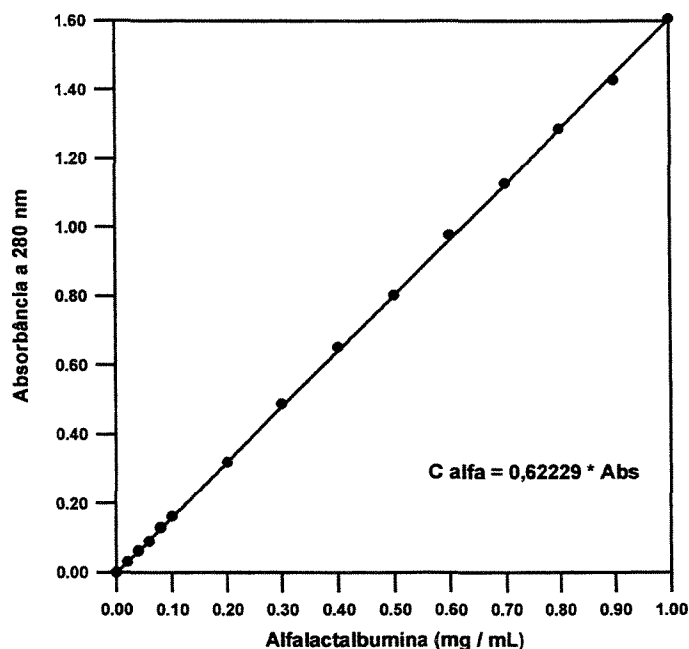


Figura 4.1.1: Curva de calibração da absorbância à 280 nm em função da concentração de α -Lactalbumina em tampão Tris 30 mM e pH 7,5. Calfa é a concentração de α -Lactalbumina e Abs é referente ao valor de absorbância.

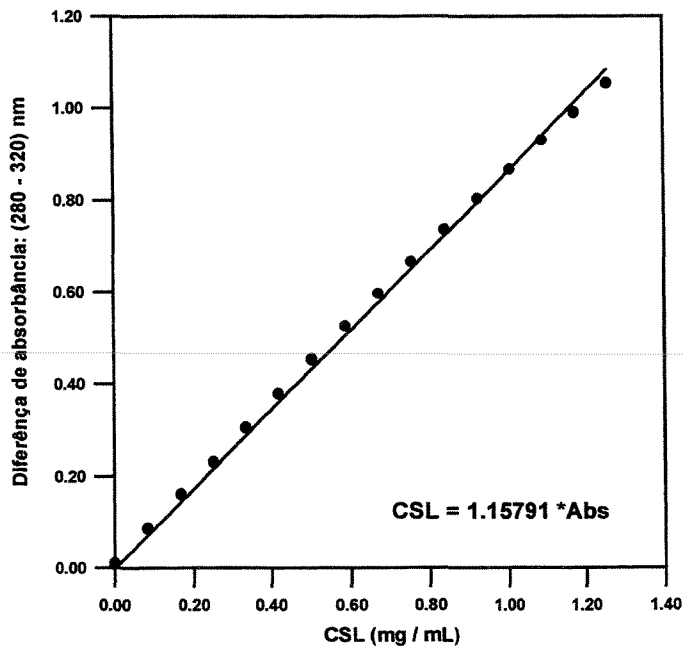


Figura 4.1.2: Curva de calibração da diferença de absorbância (280 - 320) nm em função da concentração de CSL em tampão Tris 30 mM e pH 7,5. CSL é a concentração do CSL e Abs é o valor de absorbância.

As curvas de calibração para a α -La e β -Lg utilizando a coluna analítica MONO Q foram obtidas a partir da áreas dos picos dos cromatogramas de eluição das proteínas em diversas concentrações (Figuras 4.1.3 e 4.1.4, respectivamente). Para as duas proteínas, as curvas obtidas apresentaram um comportamento linear, onde o modelo linear ajustou-se bem aos dados experimentais, com coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9988 e 0,9996 para as curvas referente a α -La e β -Lg respectivamente, como observa-se na Figuras 4.1.5.

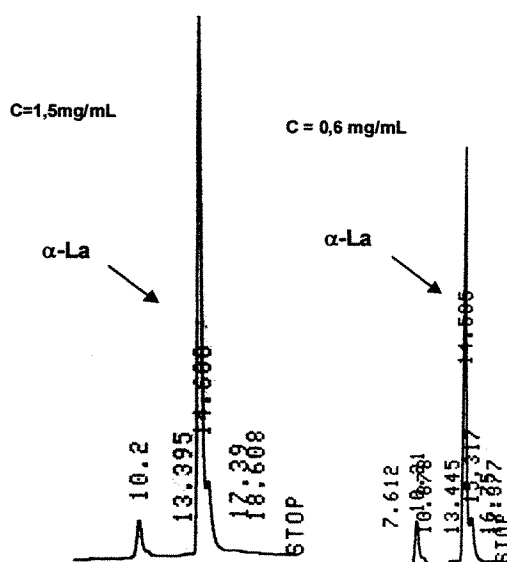


Figura 4.1.3: Cromatograma obtido com a coluna MONO Q; injeção de 20 μ L de solução de α -La pura, e eluição com um gradiente de solução de 350 mM de NaCl em um período de tempo igual a 25 min.

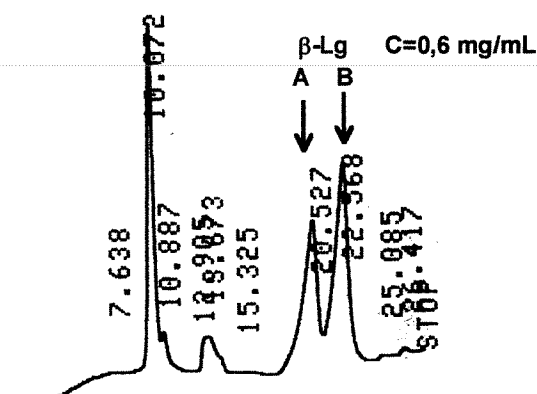


Figura 4.1.4: Cromatograma obtido com a coluna MONO Q; injeção de 20 μ L da solução de β -Lg pura, e eluição com um gradiente de solução 350 mM de NaCl em um período de tempo igual a 25 min.

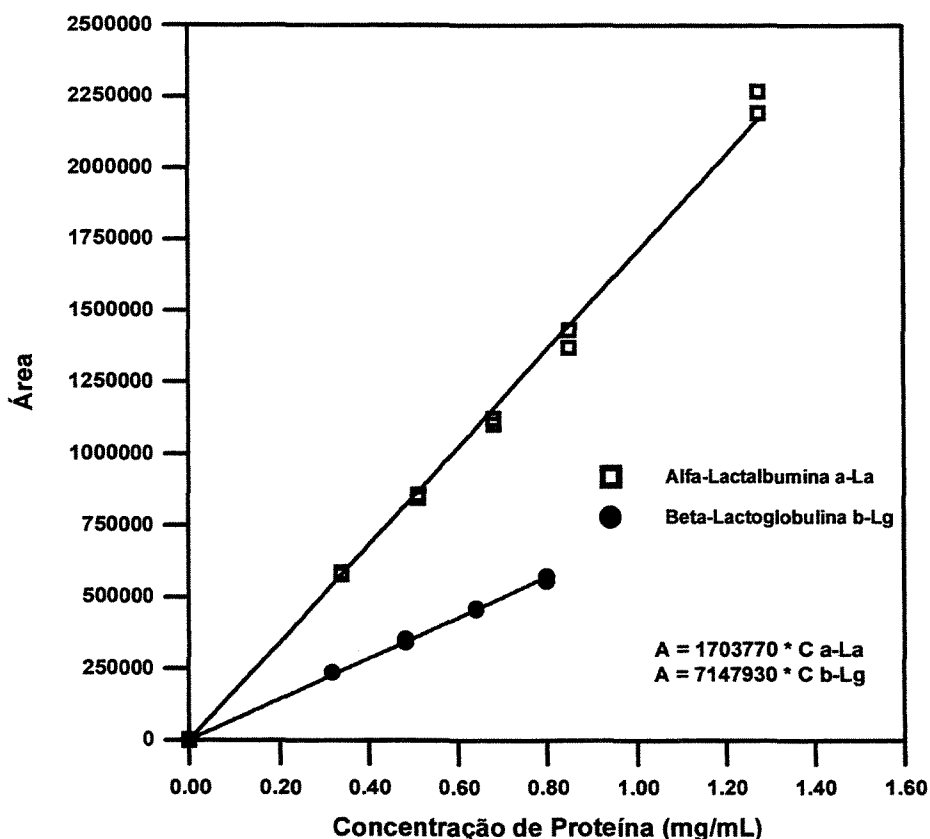


Figura 4.1.5: Curvas de calibração da área do pico em função da concentração de α -La e de β -Lg, utilizando a coluna cromatográfica MONO Q HR 5/5. Onde Área é a área do pico de eluição obtido no cromatograma, C a-La é a concentração de α -La e C b-Lg é a concentração de β -Lg.

Pode-se observar nas Figuras 4.1.3 e 4.1.4 que a α -La é eluída da coluna após 13,5 minutos, enquanto as duas variantes da β -Lg (A e B) somente são eluída num tempo superior a 20 minutos. Apesar de se tratar de proteínas comerciais, de alta pureza, estes materiais ainda apresentam traços de contaminantes, por exemplo Imunoglobulinas, que aparecem no tempo de 10 minutos nos cromatogramas da α -La e da β -Lg.

A Figura 4.1.6, representa um cromatograma obtido com a coluna MONO Q, quando injetou-se 20 μ L de uma solução contendo 0,1 mg.mL⁻¹ de Imunoglobulina G humana (IgG). Observa-se que o tempo de eluição da IgG nesta coluna é próximo de 10 minutos, praticamente o mesmo tempo do primeiro pico que aparece nos cromatogramas da α -La e da β -Lg.

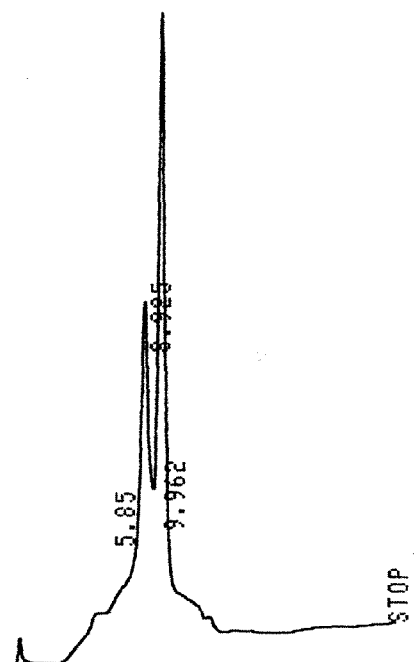


Figura 4.1.6: Cromatograma de eluição obtido com a coluna Mono Q, para a injeção de IgG humana na concentração igual a $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$.

4.2. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO

Para as resinas aniônicas fez-se, inicialmente, um estudo para avaliar qual o melhor pH para a adsorção da α -La e das proteínas do CSL. A concentração inicial de α -La pura utilizada foi de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e utilizou-se as duas resinas de troca aniônica Accell Plus e Streamline DEAE. Os dados obtidos estão na Figura 4.2.1.

Para o CSL determinou-se a capacidade de adsorção em função do pH, utilizando somente a resina Accell Plus, a concentração inicial da solução do CSL foi de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Os dados obtidos são mostrados na Figura 4.2.2.

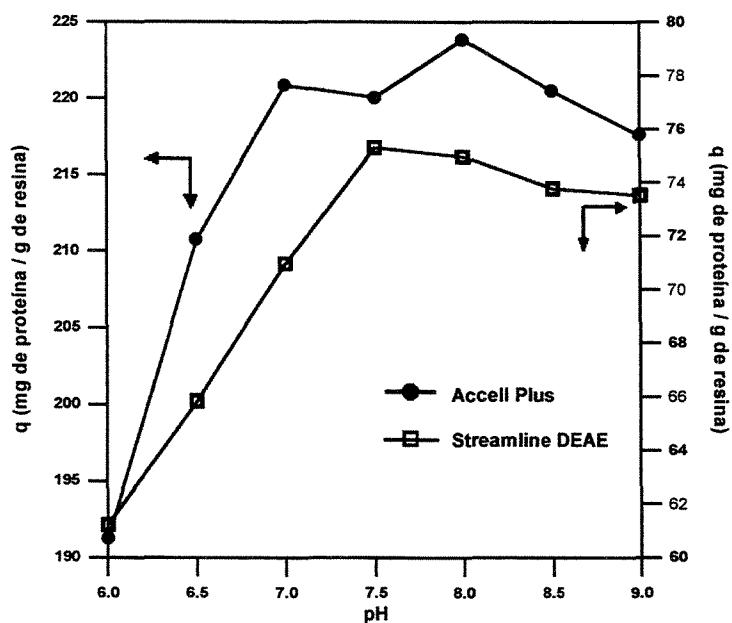


Figura 4.2.1: Capacidade de adsorção da α -La pura nas resina de troca iônica Accell Plus e Streamline DEAE, em função do pH do tampão de condicionamento, empregando o sistema de tanque agitado. Tampões de adsorção: Bis-Tris 30 mM pH 6,0, 6,5 e 7,0 e Tris 30 mM pH 7,5 a 9,0.

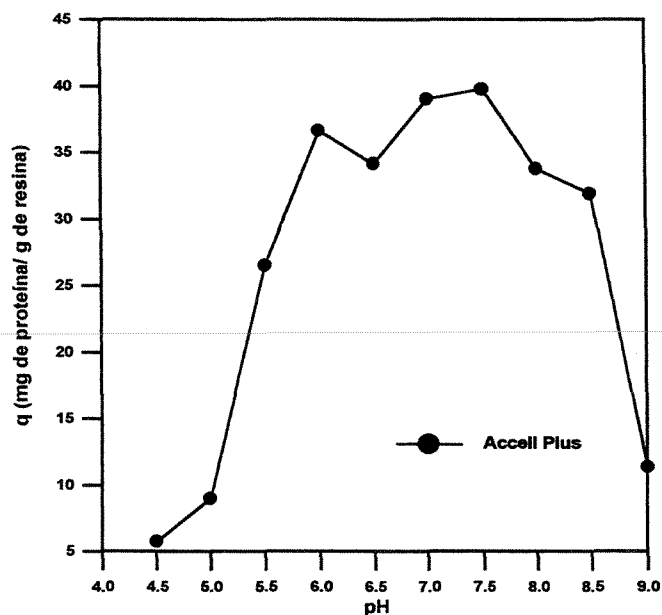


Figura 4.2.2: Capacidade de adsorção das proteínas do CSL na resina Accell Plus em função do pH do Tampão de condicionamento, empregando o sistema de tanque agitado. Tampões de adsorção: Piperazina 30 mM pH 4,5, 5,0 e 5,5; Bis-Tris 30 mM pH 6,0, 6,5, e 7,0 e Tris 50 mM pH 7,5 a 9,0.

Observa-se na Figura 4.2.1, que a capacidade de adsorção das resinas aumenta com a elevação do pH sendo que os maiores valores são observados na faixa de pH entre 7,5 e 8,5. Isto pode ser justificado visto que a elevação do pH acima do pI (o pI da α -La é de 4,8) há uma maximização da capacidade de adsorção dos adsorventes de troca aniônica, uma vez que a proteína apresenta maior quantidade de cargas para a troca em sua estrutura.

Para as proteínas do CSL a maior capacidade do adsorvente ocorre no intervalo de pH entre 6,0 a 8,0. Isto também pode ser explicado, visto que o pI das proteínas, em maior quantidade no CSL, é inferior a 6,5 (Tabela 2.2.1). Assim, as proteínas no CSL apresentam maior quantidade de cargas para a adsorção neste intervalo de pH. Esses ensaios foram realizados em tanque agitado, como descrito no item 3.3.1, e indicaram que o tempo de agitação de 3 horas foi suficiente para se atingir o equilíbrio na adsorção.

As proteínas do CSL presentes no sobrenadante, bem como as frações eluídas das amostras do ensaio para avaliação do pH de adsorção empregando a resina Accell Plus, foram submetidas a análise por eletroforese SDS-PAGE (Figuras 4.2.3 e 4.2.4).

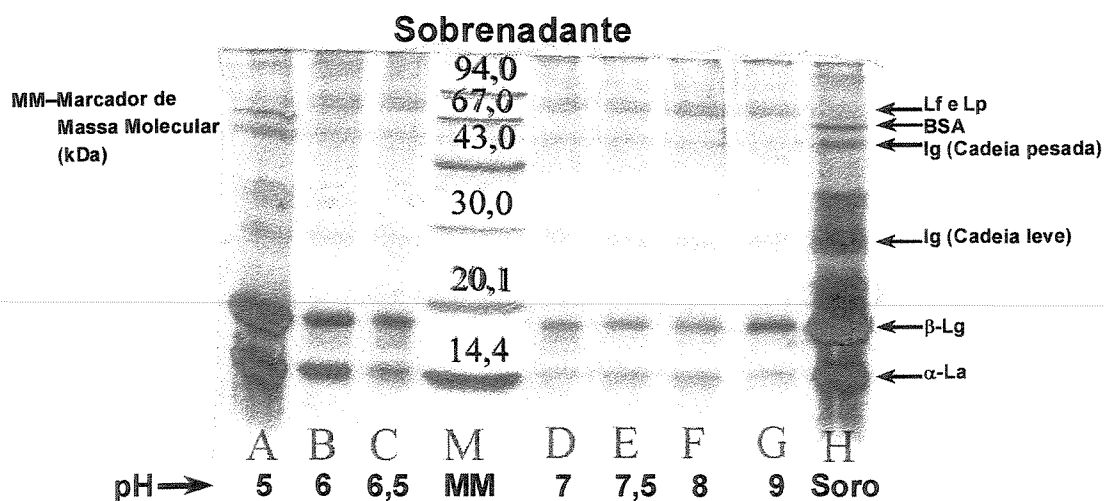


Figura 4.2.3: Eletroforetograma das frações do CSL não adsorvidas na resina Accell Plus. A- pH 5,0, B- pH 6,0, C- pH 6,5, D- pH 7,0, E- pH 7,5, F- pH 8,0, G- pH 9,0, H – Soro do Leite e M- Marcadores Moleculares (kDa); 94,0 (Phosphorylase b), 67,0 (Bovine Serum Albumin), 43,0 (Ovalbumin), 30,0 (Carbonic Anhydrase), 20,1 (Soybean Trypsin inhibition), 14,4 (α -Lactalbumin).

Pela intensidade das bandas observadas no eletroforetograma da Figura 4.2.3, nota-se que as proteínas em maior quantidade nas amostras possuem massa molecular entre 14 e 20 kDa, certamente a α -La e a β -Lg. Observando-se as raias do eletroforetograma, percebe-se que a intensidade das bandas diminui para valores de pH entre 7 e 9, justificando a maior capacidade de adsorção das proteínas do CSL neste intervalo.

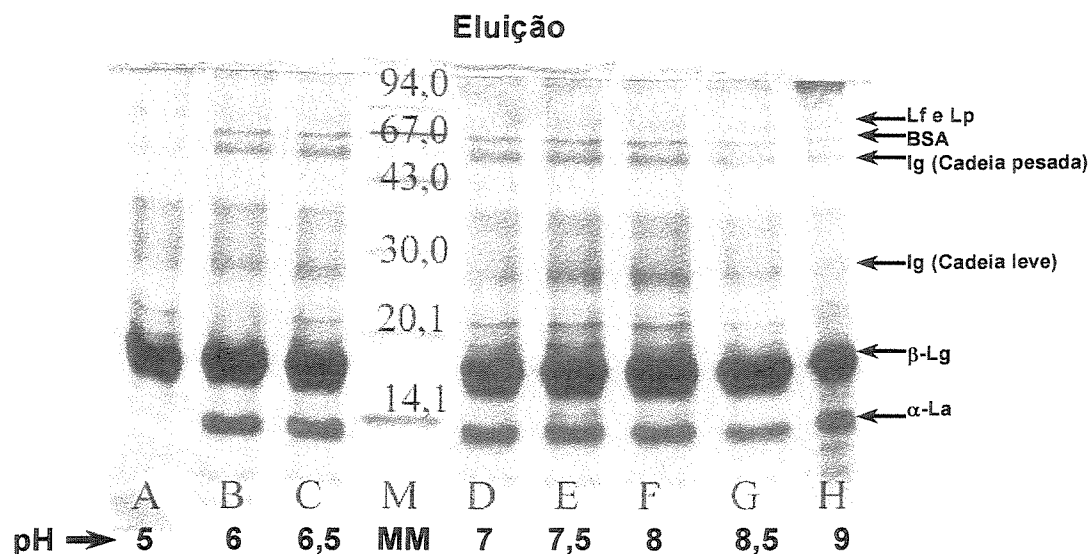


Figura 4.2.4: Eletroforetograma das frações do CSL eluídas da resina Accell Plus. A- pH 5,0, B- pH 6,0, C- pH 6,5, D- pH 7,0, E- pH 7,5, F- pH 8,0, G- pH 8,5, H- pH 9,0 e M- Marcadores Moleculares (kDa); 94,0 (Phosphorylase b), 67,0 (Bovine Serum Albumin), 43,0 (Ovalbumin), 30,0 (Carbonic Anhydrase), 20,1 (Soybean Trypsin inhibition), 14,4 (α -Lactalbumin).

No eletroforetograma apresentado na Figura 4.2.4, observa-se que α -La não é adsorvida na resina Accell Plus no pH igual a 5,0. Isto ocorre porque o pH 5,0 é muito próximo ao ponto isoelétrico da α -La. No pI o balanço de cargas na proteína é nulo, impedindo que haja adsorção na resina. Esse mesmo comportamento na adsorção foi observado para os ensaios utilizando-se a resina Streamline DEAE; assim optou-se por não apresentar os eletroforetogramas.

Com base nestes resultados foi escolhido o tampão Tris 30 mM e pH 7,5 para realização dos experimentos subsequentes, uma vez que para valores de pH

em torno deste valor, houve maior adsorção de proteínas, tanto para a α -La comercial quanto para as proteínas do CSL, utilizando-se as resinas de troca iônica Streamline DEAE e Accell Plus QMA.

Ensaio semelhantes foram realizados para a avaliação do pH de adsorção com as resinas de interação hidrofóbicas: Streamline Phenyl e Phenyl Sepharose CL-4B. Nas soluções tampão empregadas, adicionou-se inicialmente 20 mM do agente quelante EDTA, com o pH na faixa de 5,5 a 9,0, para o condicionamento das proteínas do CSL e equilíbrio das resinas. Os resultados são mostrados na Figura 4.2.5.

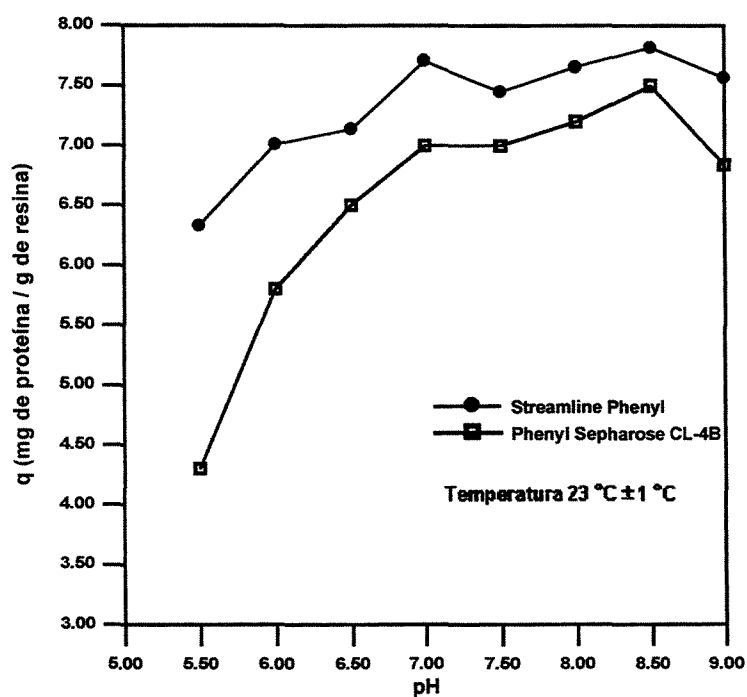


Figura 4.2.5: Capacidade de adsorção das proteínas do CSL em função do pH de adsorção nas resinas Streamline Phenyl e Phenyl Sepharose CL-4B, com EDTA a 20 mM no tampão de condicionamento (Tampões de adsorção: Piperazina 50 mM pH 5,5; Bis-Tris 50 mM pH 6,0, 6,5 e 7,0 e Tris 50 mM pH 7,5 a 9,0).

Observa-se na Figura 4.2.5 que para valores de pH acima de 6,5 a capacidade de adsorção de proteínas é maior para as resinas de interação hidrofóbica. Estes resultados foram similares aos obtidos para as resinas de troca iônica, assim optou-se por trabalhar com o tampão Tris 50 mM e pH igual a 7,5, nos ensaios com as resinas de interação hidrofóbica.

A influência da concentração do agente quelante (EDTA) no tampão de condicionamento do CSL foi analisada, uma vez que o EDTA seqüestra os íons Ca^{+2} , aumentando a hidrofobicidade da α -La, e consequentemente a capacidade de adsorção na resina. A adsorção do CSL em solução tampão foi realizada em Tris 50 mM e pH 7,5, para as concentrações de EDTA: 20, 35, 50, 65 e 100 mM. O gráfico que mostra a capacidade das duas resinas hidrofóbicas estudadas, em função das diferentes concentrações de agente quelante está representado na Figura 4.2.6.

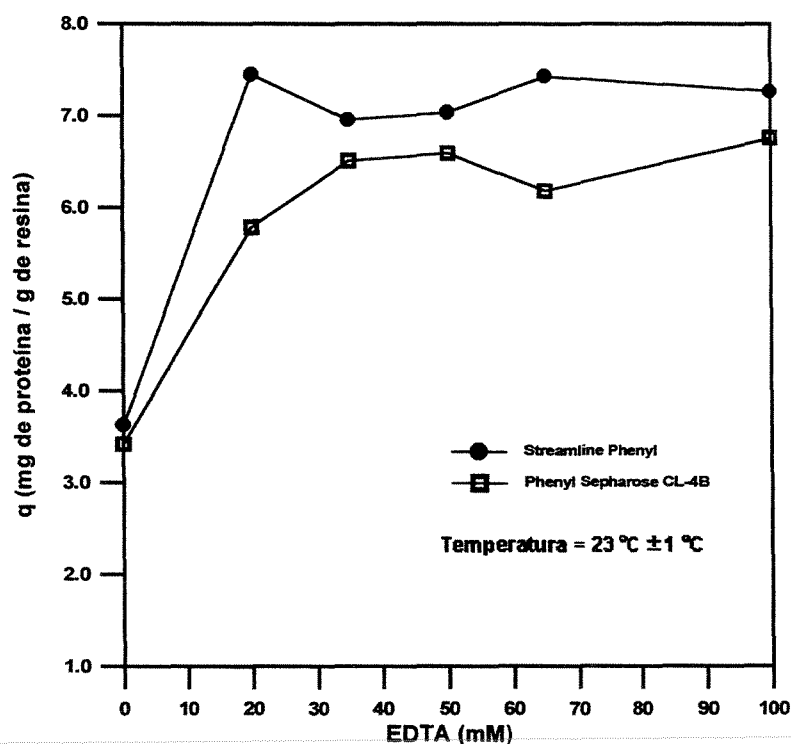


Figura 4.2.6: Capacidade de adsorção da proteínas do CSL em função da concentração de EDTA, no pH igual 7,5.

Observa-se na Figura 4.2.6 que nas soluções protéicas onde o EDTA não foi adicionado, a capacidade de adsorção foi menor, indicando que a presença do agente quelante favorece o processo de adsorção. Nas soluções com presença de EDTA praticamente não houve variação da capacidade de adsorção das proteínas do CSL. Este comportamento foi observado para as duas resinas hidrofóbicas utilizadas.

A eluição das proteínas adsorvidas foi realizada através da adição de íons Ca^{+2} no tampão de condicionamento em substituição ao EDTA. As proteínas eluídas das resinas nos ensaios com variação da concentração do agente quelante foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE.

No eletroforetograma mostrado na Figura 4.2.7, observa-se que para todas as concentrações de EDTA houve recuperação de apenas duas proteínas presentes inicialmente no CSL; possivelmente a α -La e a β -Lg. Apesar da indicação da purificação da α -La, observa-se ainda a presença da proteína β -Lg, como mostram as raias de B a F, bem como uma presença muito pequena de α -La no sobrenadante, raia A. A partir destes estudos optou-se por trabalhar com o tampão Tris 50 mM com EDTA a 35 mM no pH igual a 7,5 nos ensaios com as resinas hidrofóbicas.

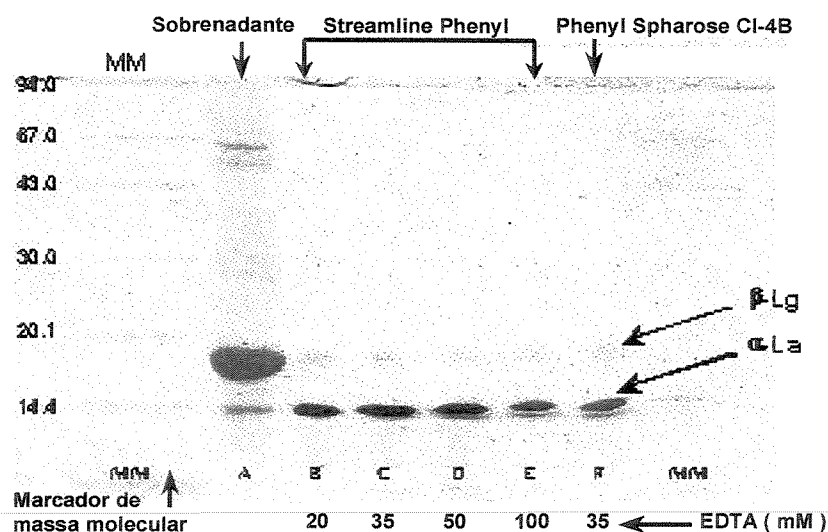


Figura 4.2.7: Eletroforetograma das proteínas dos ensaios com resinas de interação hidrofóbica. MM- marcador de massa molecular, de A a E são ensaios em Streamline Phenyl, onde: A- Sobrenadante da concentração protéica no tampão 35 mM de EDTA e pH 7,5; B, C, D, E são respectivamente concentração de EDTA a 20; 35; 50 e 100 mM; F e o ensaio com Phenyl Sepharose CL-4B com EDTA a 35 mM e pH 7,5.

Para as resinas de interação hidrofóbica foi realizado também um estudo com o objetivo de verificar-se a influência da adição de sal na hidrofobicidade do meio (efeito salting-out), no tampão de condicionamento. O sal selecionado para este estudo foi o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, escolhido com base na série de Hofmeister, por apresentar íons que favorecem a hidrofobicidade do meio. Os resultados obtidos com este estudo estão apresentados na Figura 4.2.8.

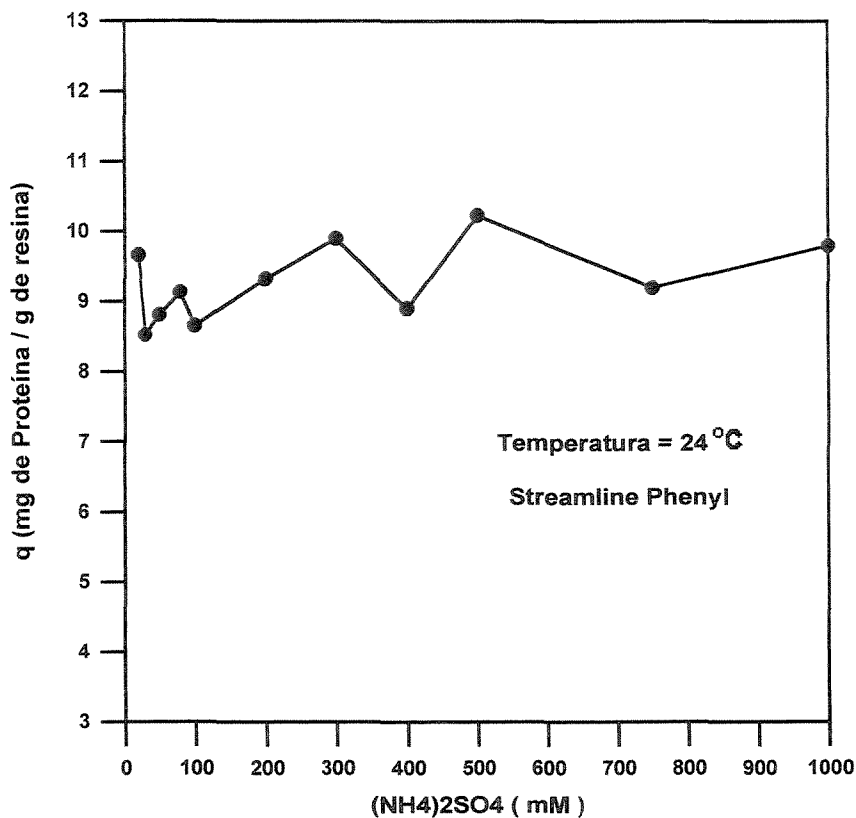


Figura 4.2.8: Capacidade de adsorção das proteínas do CSL em função da variação da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na solução de CSL em tampão 50 mM Tris, adição de 35 mM de EDTA e pH igual a 7,5.

A adição do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no tampão de acondicionamento não propiciou um aumento significativo na capacidade de adsorção das proteínas do CSL, para as concentrações de sal empregadas, quando utilizou-se a resina Streamline Phenyl. Maiores valores de concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não foram empregados, pois isto poderia provocar a precipitação das proteínas do CSL.

4.3. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Nas isotermas de adsorção, obtidas com os adsorventes de troca aniônica e de interação hidrofóbica, o modelo de Langmuir (equação 2.9.1) ajustou-se bem aos dados experimentais, onde os parâmetros q_m e K_d foram calculados através de regressão não linear pelo método dos mínimos quadrados. Estes parâmetros caracterizam o sistema em termos da capacidade máxima de adsorção de um dado adsorvente em contato com uma solução protéica. Nas Figuras 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.4 são mostradas as isotermas de adsorção para a α -La pura utilizando as resinas de troca aniônica e de interação hidrofóbica, respectivamente, empregando-se os tampões nas condições definidas no item 4.2, para a temperatura de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

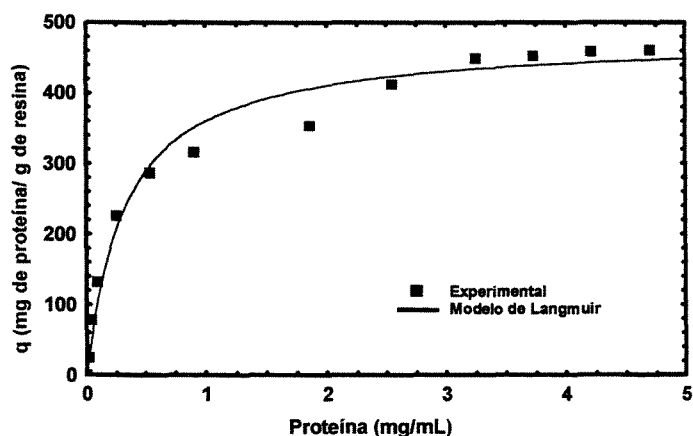


Figura 4.3.1: Isoterma de adsorção da α -Lactalbumina pura em Accell Plus QMA, tampão Tris 30 mM pH 7,5.

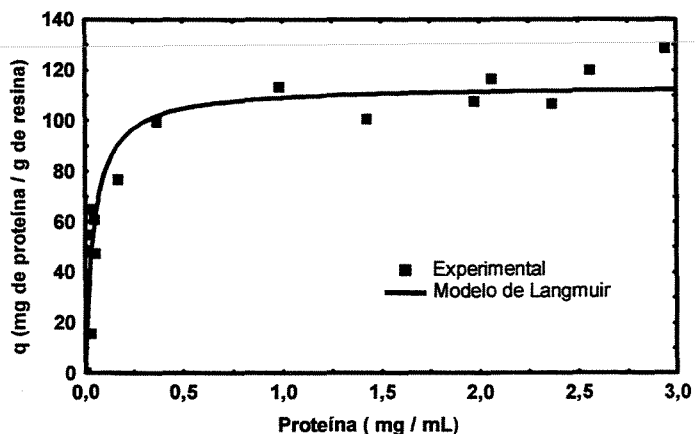


Figura 4.3.2: Isoterma de adsorção da α -La pura em Streamline DEAE, tampão Tris 30 mM pH 7,5.

Em toda a faixa de concentração empregando resinas aniônica a quantidade de α -La adsorvida foi alta, indicando elevada interação entre o adsorvente e a proteína em estudo. A resina Accell Plus QMA apresentou uma maior capacidade em relação a Streamline DEAE, visto que os valores de q_m foram iguais a $477,86 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $113,88 \text{ mg.mL}^{-1}$.

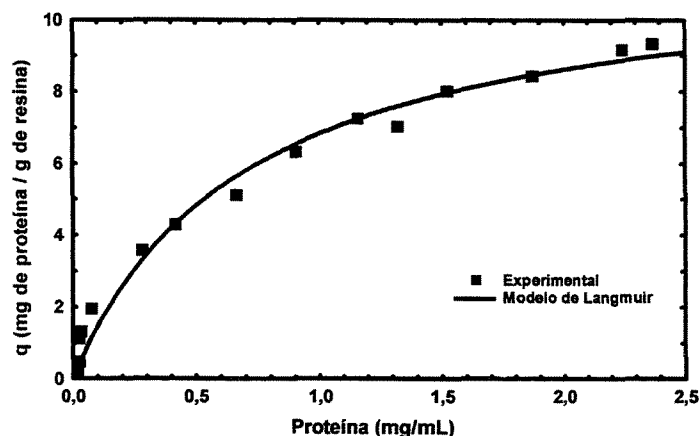


Figura 4.3.3: Isoterma de adsorção para o sistema α -La pura em Streamline Phenyl, tampão Tris 50 mM com 35mM de EDTA e pH 7,5.

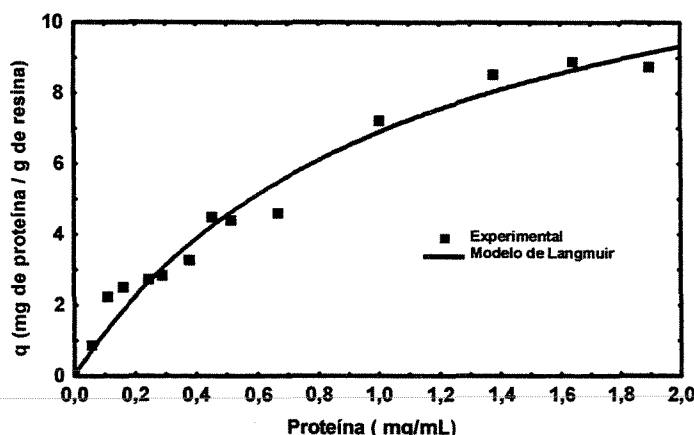


Figura 4.3.4: Isoterma de adsorção para o sistema α -La e Phenyl Sepharose CL-4B, no tampão Tris 50mM com EDTA a 35mM e pH igual 7,5.

Nas Figuras 4.3.3 e 4.3.4, as resinas de interação hidrofóbica apresentaram baixa capacidade de adsorção, onde os valores de q_m foram $15,43 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $11,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ para as resinas Streamline Phenyl e Phenyl Sepharose CL-4B.

Na obtenção das isotermas apresentadas, um tempo igual a 3,0 horas foi suficiente para o sistema atingir o equilíbrio. Na Tabela 4.3.1 estão os valores dos parâmetros q_m e k_d da equação de Langmuir, que foram calculados para cada uma

das isoterma.

Tabela 4.3.1: Valores dos parâmetros q_m e k_d na adsorção de α -lactalbumina, nas resinas estudadas.

Adsorventes	q_m (mg .g de resina ⁻¹)	k_d (mg.mL ⁻¹)	R^2
Accell Plus QMA	477,86	0,329	0,981
Streamline DEAE	113,88	0,084	0,920
Streamline Phenyl	15,43	0,710	0,996
Phenyl Sepharose CL-4B	11,02	1,080	0,992

R^2 = Coeficiente de correlação

Observa-se na Tabela 4.3.1, que a capacidade de adsorção é diferente para cada um dos adsorventes estudados. A capacidade das resinas aniônicas é elevada, quando comparada com as de interação hidrofóbicas. De certa forma este comportamento é esperado, pois de acordo com a literatura os adsorventes hidrofóbicos apresentam baixa capacidade de adsorção.

O valor de k_d obtido para a resina Phenyl Sepharose CL-4B foi de 1,080 mg.mL⁻¹, indicando que a reação de dessorção das proteínas é mais rápida que a etapa de adsorção, sendo $k_d = k_2/k_1$. Para as demais resinas os valores de k_d foram menores que 1, sendo assim a reação de adsorção mais rápida que a de dessorção.

4.4. CURVAS CINÉTICAS

Os ensaios de adsorção para a obtenção das curvas cinéticas foram realizados somente para os adsorventes de interação hidrofóbica, uma vez que o emprego destes adsorventes permitem obter a α -La com maior fator de purificação, partindo-se do CSL, quando utilizando o sistema de tanque agitado, com o adicional de não necessitar de pré-tratamento das amostras, como mostrado na Figura 4.2.7. As curvas cinéticas obtidas para diferentes valores iniciais de concentração de proteína são representadas nas Figuras 4.4.1–A e 4.4.1–B .

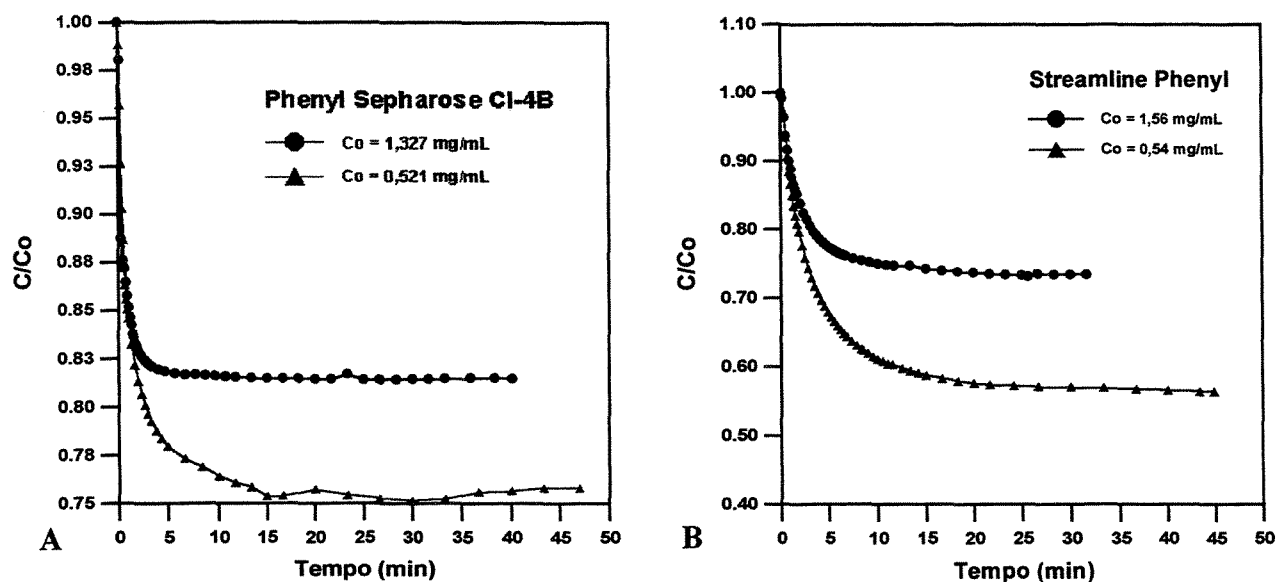


Figura 4.4.1: Curvas cinéticas de adsorção da proteína α -La em adsorventes de interação hidrofóbica, tampão Tris 50 mM com 35 mM de EDTA no pH 7,5, à temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, utilizando o sistema de tanque agitado.

Nas curvas cinéticas apresentadas nas Figuras 4.4.1-A e 4.4.1-B, a concentração de proteína diminui cerca de 25% da concentração inicial, para as duas resinas empregadas, isto devido a baixa capacidade de adsorção para as resinas hidrofóbicas. Observa-se também nas curvas cinéticas que a concentração de proteína em solução no tanque agitado diminuem rapidamente nos primeiros instantes do processo de adsorção, e que após 20 minutos a variação da concentração é muito pequena quando é atingida a condição de equilíbrio. O mesmo comportamento de adsorção também foi observado em estudos de cinéticas adsorção para as proteínas BSA (ARAÚJO, 1996), insulina (Cruz, 1997), utilizando a resina de troca iônica Accell Plus e para estudos da cinética de adsorção da enzima lipase em resinas de interação hidrofóbica (TABOADA, 1999) e em resinas de afinidade (KAMIMURA, 2000).

Com o conhecimento das isotermas e dos dados relativos à cinética de adsorção da α -La nas resinas hidrofóbicas, foi possível a determinação dos parâmetros cinéticos intrínsecos k_1 e k_2 do modelo cinético apresentado na equação 2.10.3. Ajustou-se este modelo aos dados das curvas cinéticas de adsorção, obtendo-se o valor do parâmetro

k_1 . O valor de k_2 foi calculado através da expressão $kd = k_2/k_1$. Nas Figuras 4.4.2 a 4.4.5 são mostrados os resultados dos ajustes do modelo empírico aos dados experimentais.

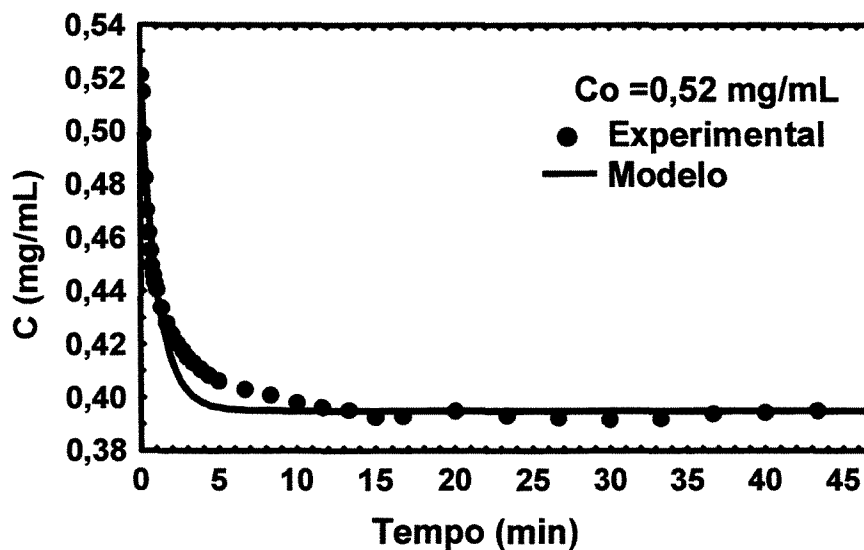


Figura 4.4.2: Curva cinética de adsorção da proteína α -La, com concentração igual a $0,52 \text{ mg.mL}^{-1}$, na resina Phenyl Sepharose CL-4B: Comparação de valores experimentais e calculados através do modelo empírico.

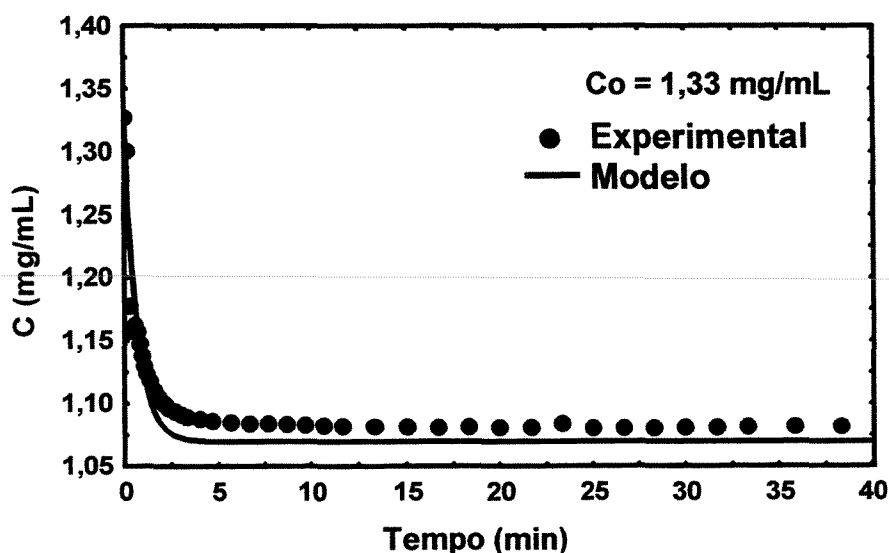


Figura 4.4.3: Curva cinética de adsorção da proteína α -La, com concentração igual $1,33 \text{ mg.mL}^{-1}$, na resina Phenyl Sepharose CL-4B: Comparação de valores experimentais e calculados através do modelo empírico.

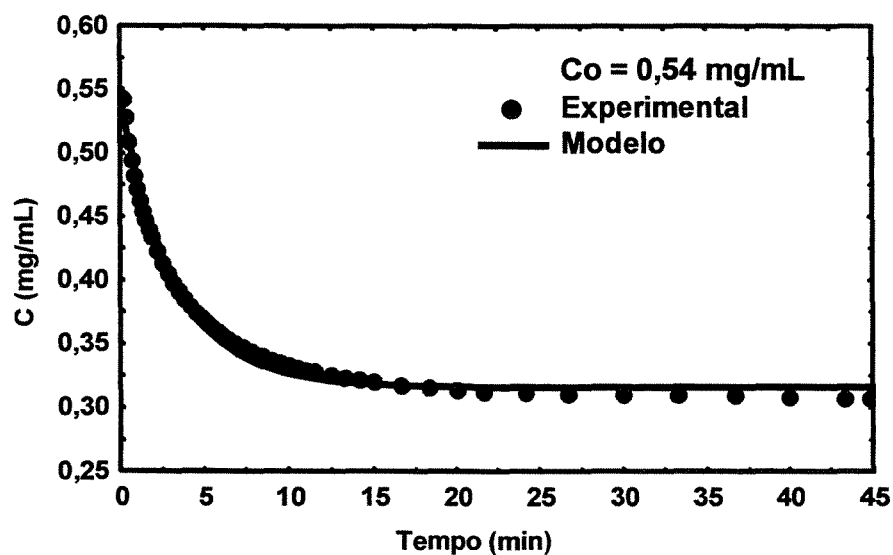


Figura 4.4.4: Curva cinética de adsorção da proteína α -La, com concentração igual a $0,54 \text{ mg.mL}^{-1}$, na resina Streamline Phenyl: Comparação de valores experimentais e calculados através do modelo empírico.

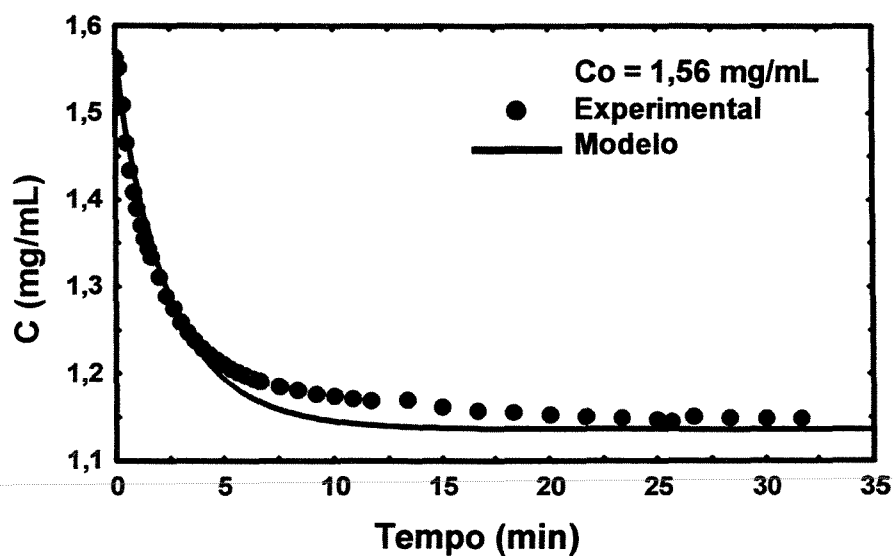


Figura 4.4.5: Curva cinética de adsorção da proteína α -La, com concentração igual a $1,56 \text{ mg.mL}^{-1}$, na resina Streamline Phenyl: Comparação de valores experimentais e calculados através do modelo empírico.

Como pode-se observar, o modelo empírico ajustou-se bem aos dados experimentais, sugerindo que a adsorção na superfície seja a etapa controladora (etapa

lenta) na adsorção da α -La nas resinas de interação hidrofóbica. Taboada (1999) também obteve bons ajustes para as curvas cinéticas de adsorção da enzima Lipase em resinas de interação hidrofóbica. Ele considerou que a reação na superfície seja a etapa lenta do processo de adsorção. Na Tabela 4.4.1 são apresentados os resultados de k_1 e k_2 obtidos na adsorção da α -La com as duas resinas de interação hidrofóbica estudadas.

Tabela 4.4.1: Valores calculados para as constantes cinéticas de associação (k_1) e de dissociação (k_2), obtidos no ensaio de adsorção da α -La pura em resinas hidrofóbicas no sistema de tanque agitado.

Phenyl Sepharose CL-4B		
C_o (mg.mL ⁻¹)	k_1 (mL.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)
0,52	0,483	0,521
1,33	0,601	0,649
Streamline Phenyl		
C_o (mg.mL ⁻¹)	k_1 (mL.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	K_2 (min ⁻¹)
0,54	0,189	0,134
1,56	0,174	0,124

Para resina Phenyl Sepharose CL-4B observa-se um aumento do valor dos parâmetros (k_1 e k_2) com o aumento da concentração. Provavelmente se da pelo fato de que no início do processo todos os sítios de adsorção na superfície da resinas estão disponíveis, fazendo com que a adsorção em baixas concentrações iniciais seja mais rápida. Ao contrário, quando se aumenta a concentração de proteína, faz com que, a proporção do número de sítios de ligação disponíveis na resina seja menor, diminuindo assim a interação proteína-adsorvente. O aumento das constantes de adsorção do sistema pode ser provocado quando na saturação das resinas, começa haver adsorção entre as proteínas na superfície das resinas com as proteínas em solução, interação do tipo proteína-proteína e impedimento estérico.

Para a cinética de adsorção da α -La em Streamline Phenyl, observa-se na

Tabela 4.4.1 que os valores dos parâmetros k_1 e k_2 , para as duas concentrações iniciais da α -La são muito próximos, porém menores que aqueles observados para a resina Sepharose Phenyl CL-4B. Isto deve-se ao maior número de sítios disponíveis para a adsorção das proteínas. Esta pequena diferença nos valores dos parâmetros obtidos para a Streamline Phenyl sugere que a cinética de adsorção é sempre a mesma, para a faixa de concentração de proteínas estudadas.

O modelo cinético, equação 2.10.3, não ajustou-se bem para valores de concentração maiores que 2,0 mg.mL⁻¹, nas duas resinas de interação hidrofóbica estudadas. Cruz (1997), também não conseguiu bons ajustes, empregando este modelo cinético, para elevados valores de concentração da proteína BSA na resina Accell Plus QMA.

O estudo de outros modelos de adsorção devem ser verificados, como por exemplo aquele que leva em consideração a transferência de massa externa e a difusão no interior dos poros, como mecanismos controladores da transferência De massa. Observar-se estes mecanismos governam o processo individualmente, ou em conjunto com a reação na superfície.

4.5. ENSAIOS EM COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

4.5.1. Estudo da expansão leito

Foram realizados ensaios para análise do grau de expansão do leito. Utilizou-se as resinas Streamline DEAE e Streamline Phenyl. Duas colunas foram usadas, sendo os diâmetros internos de 1,0 cm e 1,6 cm, ambas com possível altura de leito igual a 20 cm, fornecidas da PHARMACIA-BIOTECH. O tampão utilizado foi o Tris-HCl 30 mM, pH 7,5. As vazões volumétricas utilizadas foram na faixa de 0,1 a 6,0 mL.min⁻¹.

Com a coluna de 1,6 cm de diâmetro, a altura inicial do leito de resinas foi igual a 4,0 cm, correspondendo a uma massa de 6,5 g dos adsorvente. Esses valores foram escolhido com base nas informações apresentadas nos catálogos dos fabricantes dos

adsorventes (PHARMACIA-BIOTECH, 1996). Com a coluna de 1,0 cm de diâmetro a altura inicial do leito foi de 2,0 cm, correspondendo a 2,6 g de adsorventes.

As curvas do grau de expansão são apresentadas como a razão entre a altura do leito e a altura inicial do mesmo (H/H_0) em função da velocidade superficial (cm.h^{-1}) como é mostra a Figura 4.5.1.

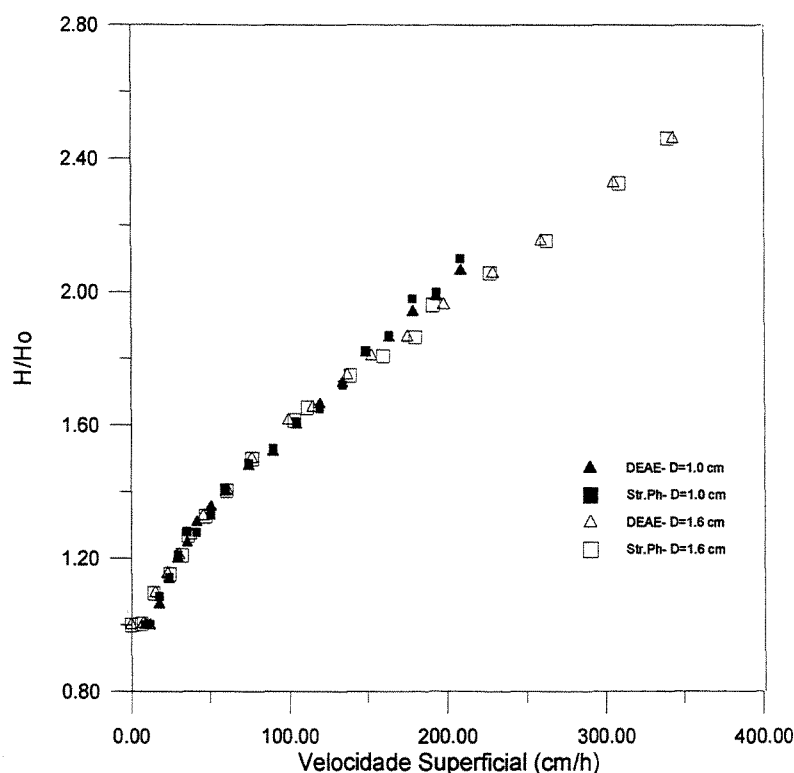


Figura 4.5.1: Curva de expansão do leito com os adsorventes Streamline DEAE e Streamline Phenyl, colunas de 1,0 e 1,6 cm de diâmetros, tampão Tris-HCl 30 mM no pH igual a 7,5.

Através da Figura 4.5.1 notamos que não há uma relação linear entre o grau de expansão e a velocidade superficial, para os dois tipos de colunas utilizadas. A mudança de inclinação ocorre para os baixos valores de velocidades superficiais. Acima do valor 100 cm.h^{-1} o comportamento da expansão com a velocidade superficial torna-se linear, com as partículas altamente fluidizadas. Não se deve operar as colunas utilizadas com altos valores de velocidade superficial, devido ao formato do seu

distribuidores principalmente quando trabalhando com soluções que apresente material particulado. Valores muito elevados na velocidade superficial também influenciam na capacidade de adsorção das proteínas dificultando a adsorção uma vez que os adsorventes apresentam uma elevada mobilidade das partículas, diminuindo a interação proteína-adsorvente (PHARMACIA – BIOTECH, 1993). Neste trabalho optou-se por trabalhar com velocidades abaixo de 100 cm.h^{-1} , garantindo assim uma segurança na operação do sistema quando empregar soluções do CSL.

A coluna de 1,0 cm de diâmetro apresentou maior dificuldade na expansão devido a maior influência do efeito de parede e do tamanho do distribuidor, podendo ocorrer entupimento e aumento da pressão do sistema cromatográfico. Assim, todos os experimentos foram conduzidos utilizando a coluna XK 16/20 com 1,6 cm de diâmetro por apresentar maior facilidade de operação e fluidização estável dos adsorventes empregados.

4.5.2. Dinâmica de adsorção em colunas

Os ensaios em colunas foram realizados inicialmente em leito fixo, para os quatro adsorventes. Os ensaios com o leito expandido foram realizados posteriormente, somente com os adsorventes Streamline DEAE e a Streamline Phenyl. Nestes ensaios foram empregados apenas soluções do CSL, uma vez que há um consumo de grande quantidade de material para a obtenção das curvas de ruptura “breakthrough”. A utilização da α -La pura não foi possível devido ao seu alto valor comercial e a quantidade disponível ficou restrita apenas para as análises qualitativa e quantitativa.

Nas Figuras 4.5.2 e 4.5.3, são apresentadas as curvas de ruptura, para resinas aniônicas e hidrofóbicas, respectivamente, operando em leito fixo. A concentração da solução do CSL foi de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, no tampão específico para cada tipo de resina. A vazão de operação no sistema foi de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, o que corresponde a uma velocidade superficial de $29,9 \text{ cm.h}^{-1}$, para a coluna de 1,6 cm de diâmetro, a qual possui área de seção transversal igual a $2,01 \text{ cm}^2$.

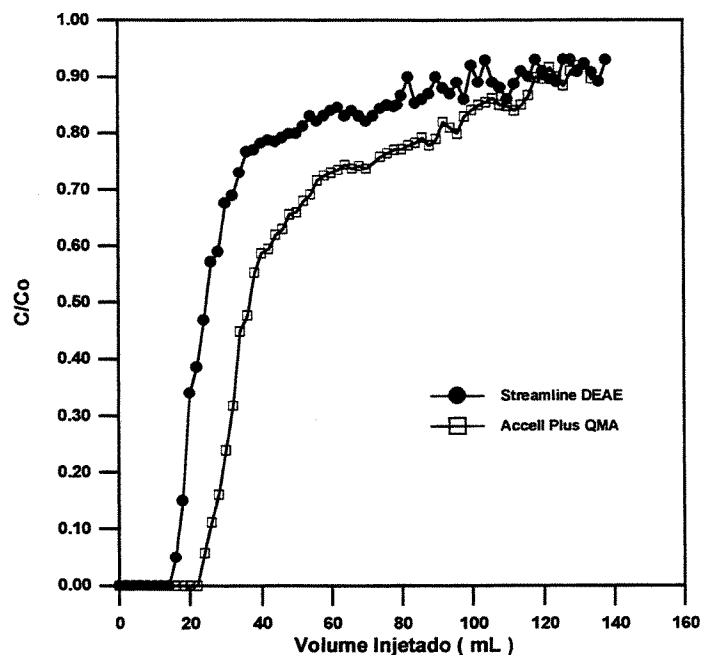


Figura 4.5.2: Curvas de ruptura em leito fixo, obtida para solução de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de CSL no tampão Tris 30 mM e pH igual a 7,5, vazão de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, e resinas Accell Plus e Streamline DEAE.

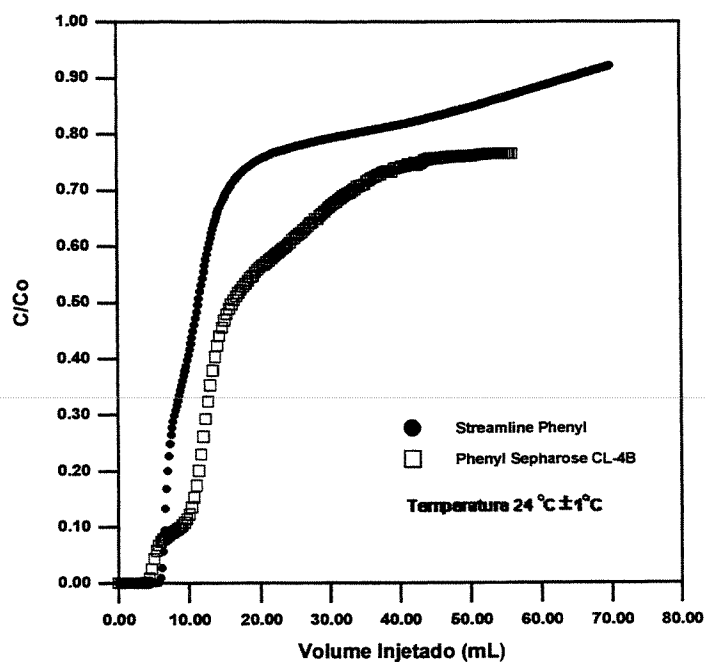


Figura 4.5.3: Curvas de ruptura em leito fixo, obtida para solução de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ de CSL no tampão Tris 50 mM e EDTA 35 mM com pH 7,5, vazão de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ empregando as resinas hidrofóbicas Phenyl Sepharose CL-4B e Streamline Phenyl, na condição de leito fixo.

Nas curvas de ruptura, mostradas nas Figuras 4.5.2 e 4.5.3, a saturação do leito é demorada, exigindo um grande volume da solução do CSL. A princípio os dados experimentais tem um comportamento ascendente muito rápido a partir do ponto de ruptura até um valor de C/C_0 igual a 0,5, para todas as resinas estudadas, a partir daí a uma demora em atingir o ponto de saturação do leito, ocorrendo uma perda muito grande de proteínas nesta etapa de adsorção, principalmente para as resinas de troca iônica.

Devido a grande capacidade de adsorção das resinas aniônicas, a quantidade de solução protéica injetada foi muito superior, quando comparada com a quantidade injetada nas colunas com as resinas hidrofóbicas. Comportamento semelhante se observou quando operando na condição de leito expandido com as resinas Streamline DEAE e Phenyl Streamline, como mostrado na Figura 4.5.4.

A altura inicial do leito, na condição de leito sedimentado era de 4,0 cm, e para a velocidade superficial de $29,9 \text{ cm.h}^{-1}$ a altura do leito expandido foi de 4,9 cm, valor semelhante ao encontrado na relação H/H_0 representado na Figura 4.5.1.

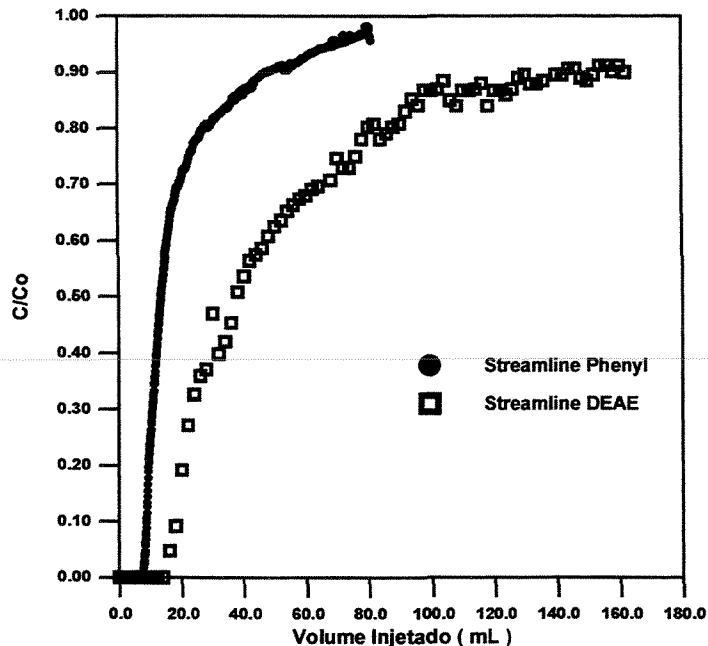


Figura 4.5.4: Curvas de ruptura em leito expandido, obtidas para as resinas Streamline Phenyl (hidrofóbica) e Streamline DEAE (aniônica) na condição de leito expandido.

Após a adsorção o leito foi submetido a etapa lavagem, com o próprio tampão de adsorção, para eliminar partículas e proteínas não adsorvidas. Em seguida iniciou-se a etapa de eluição, das proteínas adsorvidas.

4.5.3. Etapa de eluição

Para as resinas aniônicas Accell Plus e Streamline DEAE, a etapa de eluição foi realizada combinando o tampão de adsorção com o de eluição na forma de degrau, mais conhecido como “step”. Nesta forma de eluição ocorre variação periódica da porcentagem do tampão de eluição, para uma vazão total de 1,0 mL.min⁻¹. A porcentagem inicial do tampão de eluição era de 5,0% da vazão total na etapa de eluição e este valor foi aumentado ao longo do tempo. Consequentemente, há uma diminuição da porcentagem do tampão de adsorção que iniciava na etapa de eluição com 95% da vazão total de eluição. O tampão de eluição foi constituído de Tris-HCL 30 mM com 1,0 M de NaCl no pH igual a 7,5. A etapa de eluição, com as resinas hidrofóbicas, foi realizada fazendo uma aplicação direta do tampão de eluição (100%), composto de Tris 50 mM com 1,5 mM Ca⁺², no pH igual a 7,5.

Nas Figuras 4.5.5 a 4.5.10 são mostrados os cromatogramas de eluição para todas as resinas estudadas. Todos os picos obtidos nos cromatogramas de eluição apresentados, foram analisados empregando-se eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), para avaliar de forma qualitativa se houve a separação das proteínas presentes no CSL.

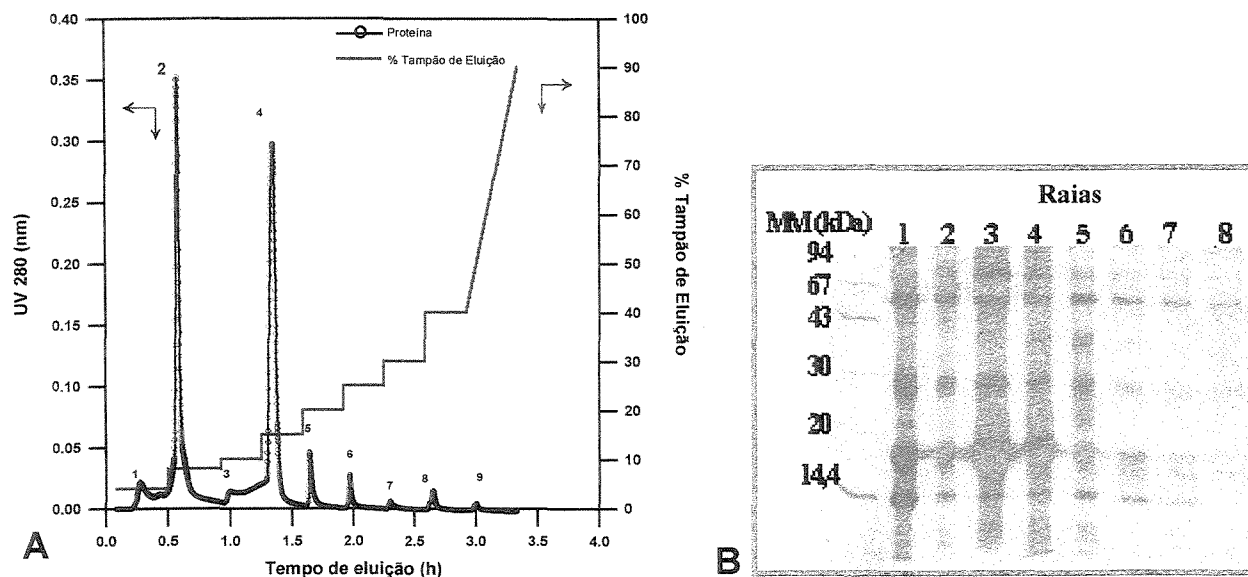


Figura 4.5.5: A-Cromatograma de eluição das proteínas do CSL obtido em leito fixo de Accell Plus QMA e B-Eletroforetograma dos picos de eluição, onde as raias de 1 a 8 são referentes aos picos do cromatograma de eluição.

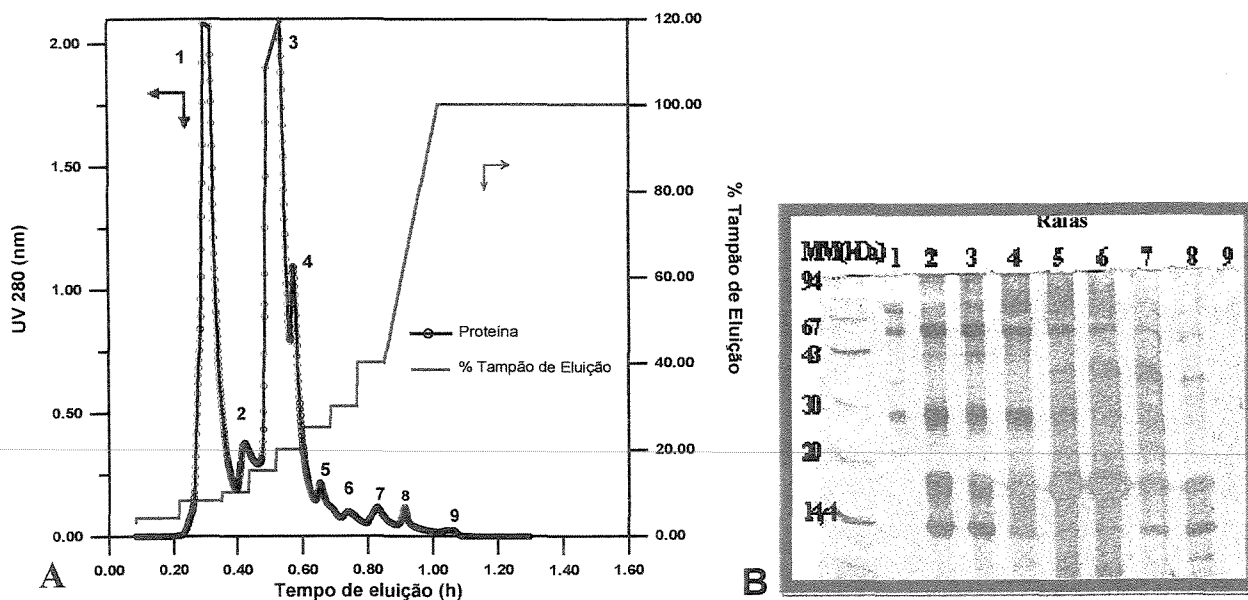


Figura 4.5.6: A - Cromatograma de eluição das proteínas do CSL obtido em leito fixo de Streamline DEAE, B - Eletroforetograma dos picos de eluição, onde as raias de 1 a 9 são referentes aos picos do cromatograma de eluição.

Nos cromatogramas de eluição das duas resinas de troca aniônica, apesar da

existência de vários picos, não houve separação das proteínas do CSL, tal como pode-se observar nos eletroforetogramas das Figuras 4.5.5 e 4.5.6. A α -La sai junto com as demais proteínas presentes no CSL.

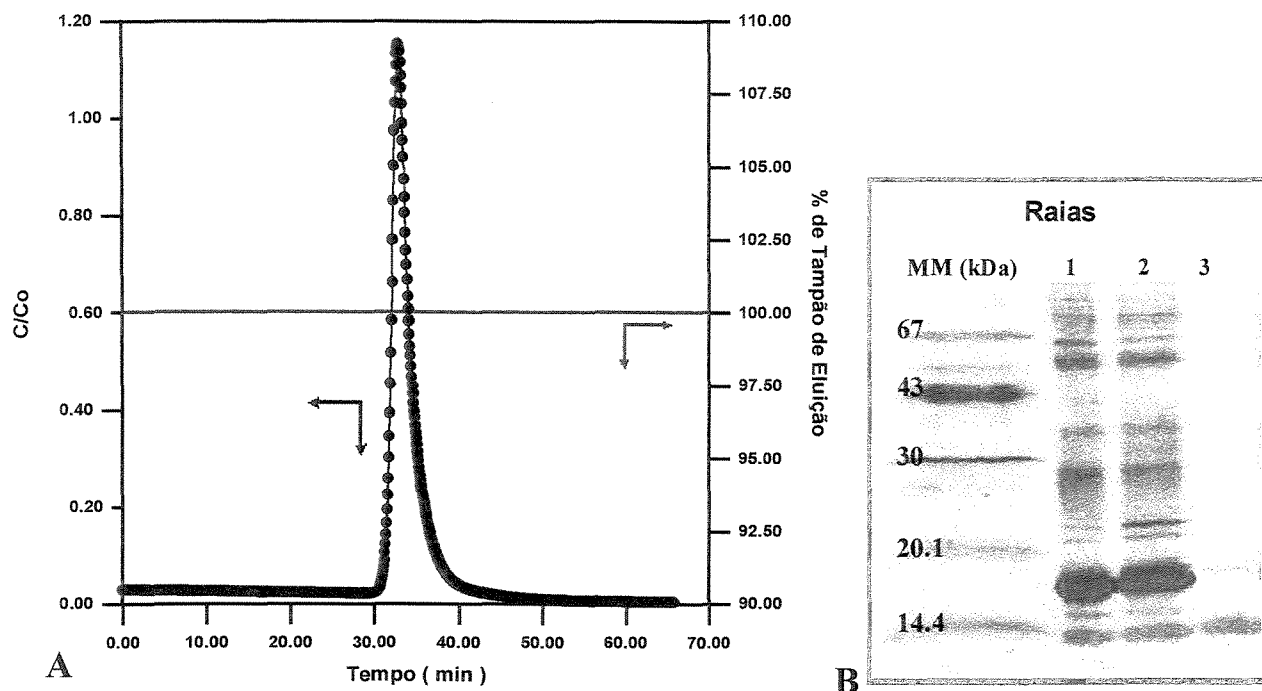


Figura 4.5.7: **A** -Cromatograma de eluição das proteínas do CSL obtido em leito fixo de Streamline Phenyl e **B** -Eletroforetograma do Cromatograma de eluição (raia 3) e das amostras do materiais de adsorção (raia 1) e de lavagem (raia 2).

No cromatograma da Figura 4.5.7, aparece somente um pico das proteínas eluídas. Observando o eletroforetograma da Figura 4.5.7, a raia 1 corresponde as proteínas do CSL durante a etapa de adsorção na resina hidrofóbica Streamline Phenyl, a raia 2 é referente ao material de lavagem; proteínas que não foram adsorvidas e retiradas do leito com o tampão de adsorção. Observa-se no material de adsorção e lavagem, que há uma perda considerável de α -La, proteína referente ao marcador de massa molecular (MM) igual a 14,4 kDa, que não foi adsorvida na resina ou foram fracamente adsorvidas saindo durante a etapa de lavagem. A raia 3 corresponde as proteínas que foram adsorvidas e posteriormente eluídas; presentes no pico do cromatograma de eluição, nota-se que a proteína de MM igual a 14,4 kDa, referente a

α -La, aparece com uma certa purificação, mas ainda apresentando vestígio da proteína β -Lg, de massa molecular igual a 18,4 kDa.

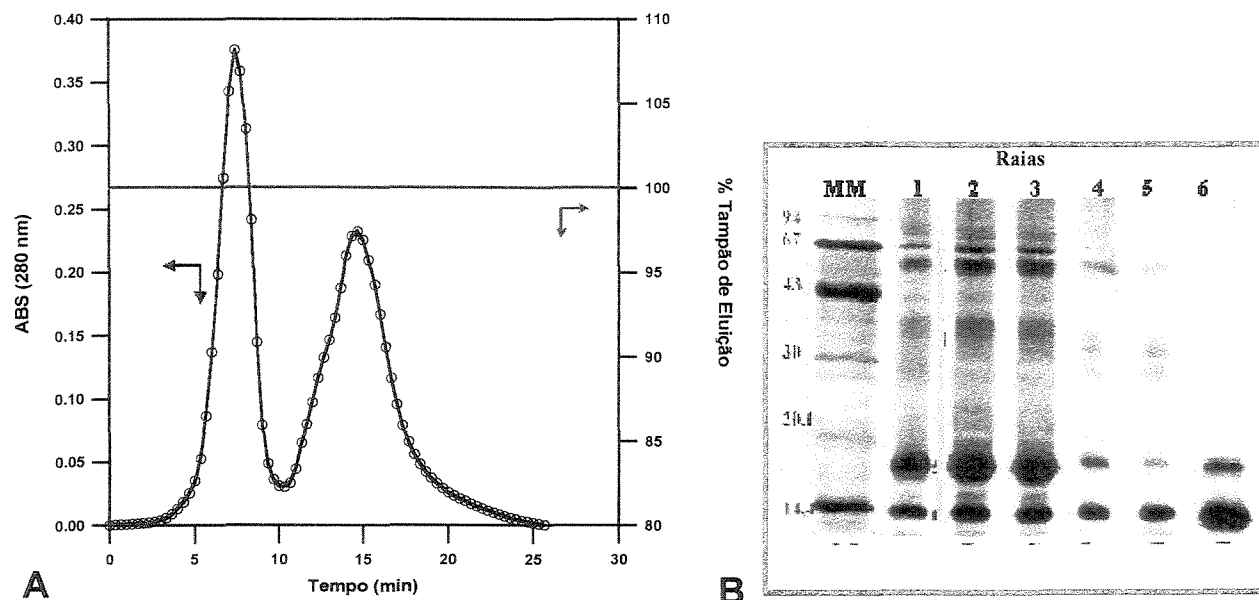


Figura 4.5.8: **A** -Cromatograma de eluição das proteínas do CSL obtido em leito fixo de Phenyl Sepharose CL-4B e **B** -Eletroforetograma dos picos de eluição (raias 4 e 5) e das amostras dos materiais de adsorção (raia 1) e de lavagem (raias 2 e 3) e a raia 6 é a amostra de α -La pura (Sigma®).

Com a resina hidrofóbica Phenyl Sepharose CL-4B, também há perdas significantes de α -La, nas etapas de adsorção (raia1) e lavagem (raia 2 e 3) no eletroforetograma apresentado na Figura 4.5.8. Aqui também as frações eluídas, raia 4 e 5, apresentaram um grau de purificação da α -La, mas ainda há presença de traços da proteína β -Lg e imunoglobulinas onde a banda de massa molecular 62,5 kDa refere-se Ig de cadeia pesada e a 32,0 kDa a Ig de cadeia leve. A raia 6, é referente a proteína α -La padrão adquirida da SIGMA, onde observa-se também a presença da β -Lg, com uma coloração muito intensa.

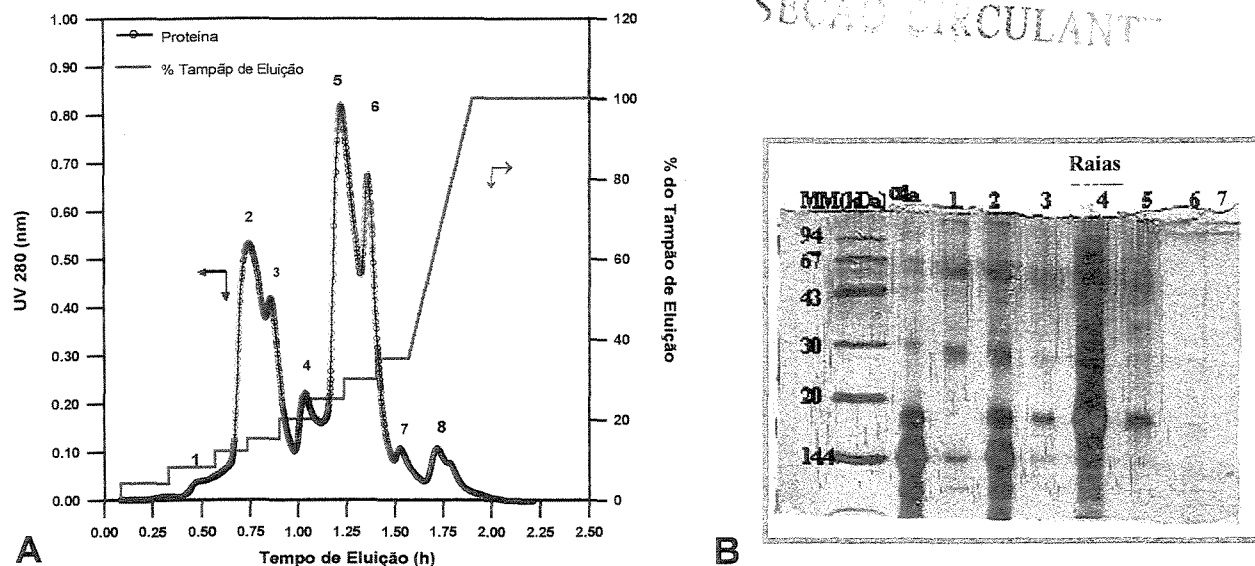


Figura 4.5.9: A - Cromatograma de eluição das proteínas do CSL adsorvidas em leito expandido de Streamline DEAE e B - Eletroforetograma dos picos de eluição, em que as raia de 1 a 7 são referentes aos picos do cromatograma de eluição.

Semelhante ao leito fixo, os resultado do processamento do CSL na resina Streamline DEAE em leito expandido, não apresentou purificação das proteínas do CSL, como se observa o eletroforetograma dos picos de eluição do cromatograma da Figura 4.5.9.

As duas resinas de troca aniônicas estudadas não foram eficientes para a purificação da α -La, nas condições definidas no processo. Uma característica interessante é que as resinas de troca aniônica apresentam uma alta capacidade de adsorção das proteínas do CSL, sendo o seu emprego ideal para uma etapa de concentração.

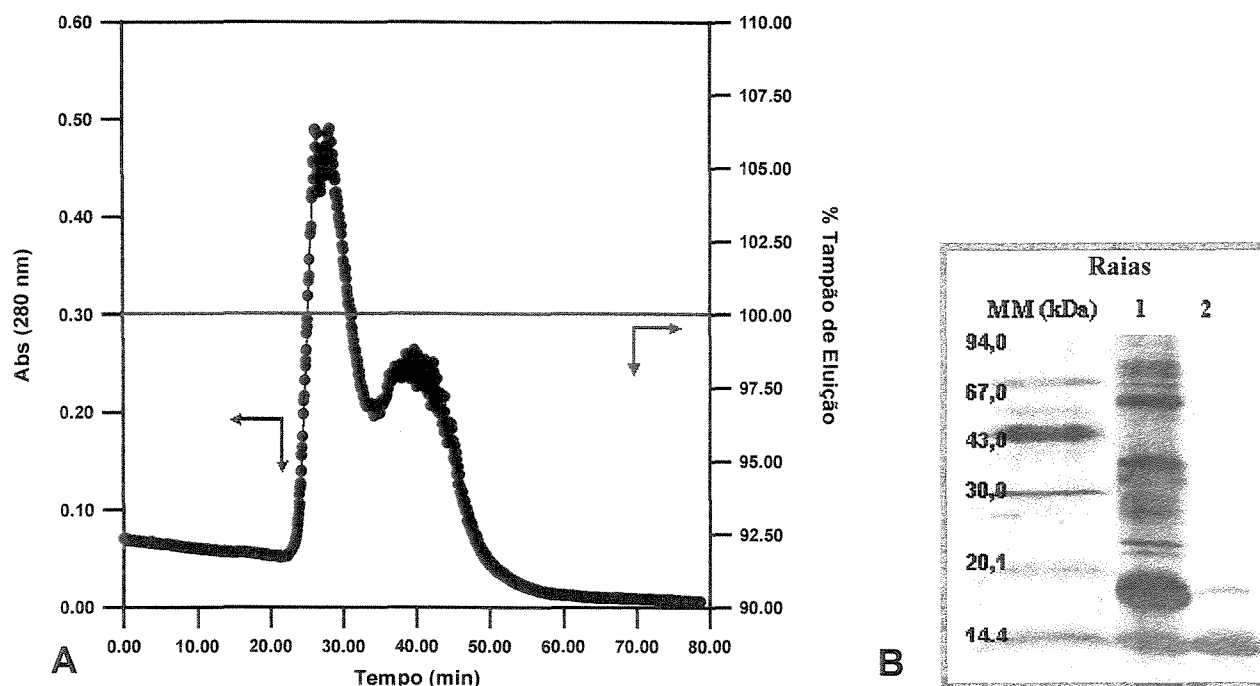


Figura 4.5.10: A - Cromatograma de eluição das proteínas do CSL em leito expandido de Streamline Phenyl e B - Eletroforetograma dos picos de eluição (raia 2) e etapa de lavagem (raia 1).

O eletroforetograma da Figura 4.5.10 é referente ao processo com leito expandido, utilizando a resina Streamline Phenyl. A raia 1 é referente as proteínas eliminadas na etapa de lavagem e a raia 2 é referente as proteínas eluidas. Na raia 2, a α -La aparece de forma isolada das demais proteínas do CSL, mas apresentando ainda traços de β -Lg.

Analisando os eletroforetogramas referente as resinas de interação hidrofóbica, é possível a separação da α -La, empregando-se uma única etapa de cromatografia de interação hidrofóbica, tanto em leito fixo como expandido.

4.6. Análise Quantitativa Para as Resinas Hidrofóbicas

Como as resinas de interação hidrofóbica apresentaram, através da eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE, uma aparente purificação da proteína α -La

presente no CSL, houve a necessidade de analisar-se quantitativamente o desempenho do processo em termos da quantidade de proteína recuperada, pureza e o fator de purificação.

Nos ensaios com a coluna cromatográfica XK 16 / 20, um balanço de massa foi realizado para cada uma das etapas do processo cromatográfico, balanço referente a α -La. Analisou-se as perdas de proteína durante a adsorção, proteínas que não foram adsorvidas, as perdas durante a lavagem, e as proteínas recuperadas na eluição, quando utilizou-se as resinas de interação hidrofóbica Streamline Phenyl e Phenyl Sepharose CL-4B.

Para a resina Streamline Phenyl, também houve o interesse em verificar se a vazão de alimentação tem influência nas perdas de α -La na etapa de adsorção. Três diferentes valores de vazão foram empregados na etapa de adsorção, 1,0, 2,0 e 3,0 mL.min⁻¹, tanto na condição de leito fixo como de expandido. Nas demais etapas, ou seja, lavagem e eluição, a vazão foi mantida em 1,0 mL.min⁻¹. Com a resina Phenyl Sepharose CL-4B apenas um valor de vazão foi empregado, igual a 1,0 mL.min⁻¹, para as três etapas.

Um volume igual a 60,0 mL da solução do CSL, com concentração igual a 5,0 mg.mL⁻¹, foi injetado na coluna XK 16/20, durante a etapa de adsorção. Este volume foi suficiente para uma aproximação da saturação do leito de resinas. Nas etapas de lavagem e eluição empregou-se o mesmo volume, (60 mL), das respectivas soluções tampão. Todo material de cada uma das etapas, foram coletados e analisados separadamente em uma coluna analítica MONO Q HR 5/5, utilizando um sistema de HPLC, em que foi possível obter os cromatogramas das proteínas presentes em cada uma das etapas do processo. Com a Coluna MONO Q obteve-se também o cromatograma da solução do CSL.

Na Figura 4.6.1, são ilustrados alguns dos cromatogramas obtidos com a coluna MONO Q, para os ensaios utilizando a Streamline Phenyl na condição de leito fixo com vazão de 1,0 mL.min⁻¹. Para os demais ensaios com as velocidades 2,0 e 3,0 mL.min⁻¹ ensaios com a Phenyl Sepharose CL-4B e os ensaios com leito expandido, os cromatogramas apresentaram perfis muito semelhantes.

Nos cromatogramas da Figura 4.6.1, o pico referente a α -La aparece na faixa de tempo de 12,7 a 14,5 minutos. A área destes picos obtidos foram analisadas na curva de calibração da Figura 4.1.5, obtendo assim a concentração de α -La em cada etapa cromatográfica e também no CSL Tabela 4.6.1.

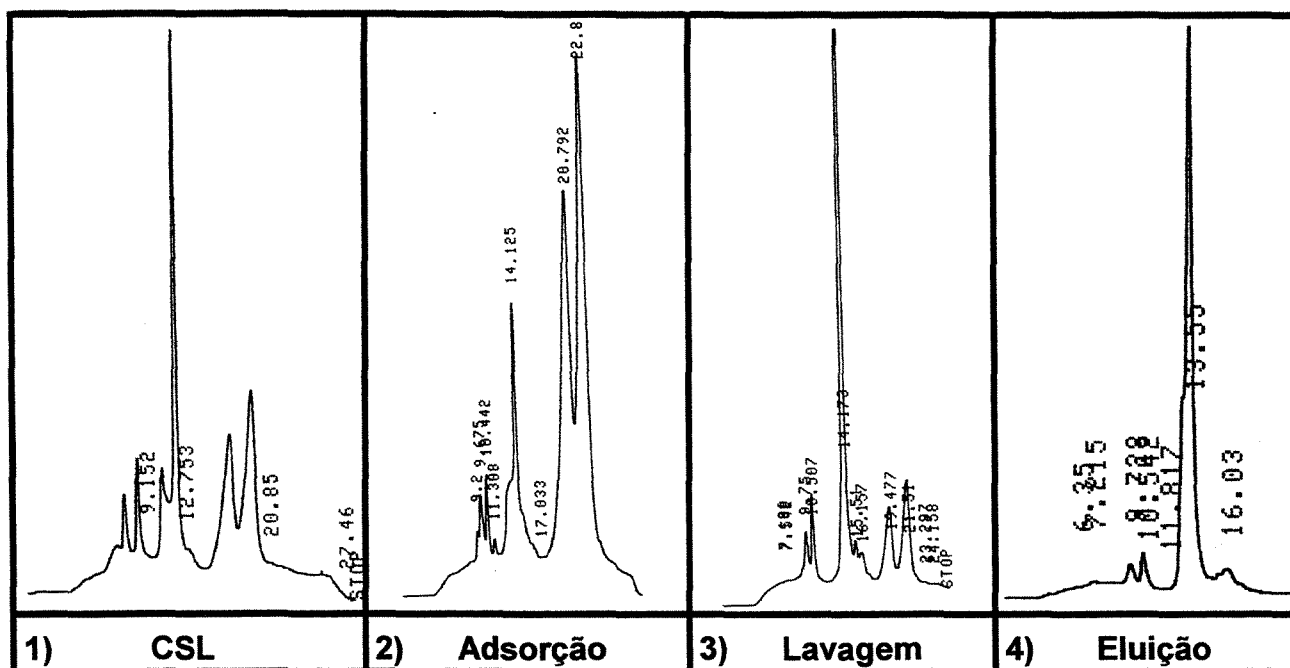


Figura 4.6.1: Cromatogramas da amostra do CSL e das etapas cromatográficas da resina Streamline Phenyl com vazão de adsorção igual a $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, obtidos com a coluna MONO Q no sistema HPLC.

Na Figura 4.6.1 o cromatograma (1) é referente as proteínas presentes inicialmente na solução de $5,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ do CSL. Os cromatogramas (2) e (3) representam as proteínas que não adsorveram nas resinas e foram eliminadas da coluna, representando as perdas do processo. O cromatograma (4) é referente as proteínas eluidas, onde o pico da α -La aparece com um tempo de 13,5 minutos.

Após a quantificação da α -La, fez-se um balanço de massa, onde concentração total de α -La é igual a soma das concentrações de α -La presente em cada uma das etapas. O rendimento do processo foi então calculado pela razão entre a quantidade de

α -La na etapa de eluição e a quantidade total de α -La presente nas três etapas. A pureza da α -La obtida foi calculada diretamente no cromatograma de eluição, fazendo-se uma análise da porcentagem da área do pico pertencente à α -La com as áreas das demais proteínas na etapa de eluição. O fator de purificação (FP), foi calculado pela razão entre a porcentagem da α -La presente na solução eluída e a sua porcentagem no CSL. Na Tabela 4.6.2 são apresentados os valores de rendimento, pureza e o fator de purificação obtidos com as resinas hidrofóbicas na condição de leito fixo e expandido.

Tabela 4.6.1: Análise da concentração da α -La com a coluna MONO Q.

LEITO FIXO				
Adsorventes Hidrofóbicos	Vazão ⁽¹⁾ (mL.min ⁻¹)	Concentração de α -La (mg.mL ⁻¹)		
		Adsorção	Lavagem	Eluição
Streamline Phenyl	1,0	0,214	0,217	0,206
	2,0	0,222	0,224	0,190
	3,0	0,381	0,168	0,144
Phenyl Sepharose CL-4b	1,0	0,228	0,254	0,054
LEITO EXPANDIDO				
Adsorventes Hidrofóbicos	Vazão ⁽¹⁾ (mL.min ⁻¹)	Concentração de α -La (mg.mL ⁻¹)		
		Adsorção	Lavagem	Eluição
Streamline Phenyl	1,0	0,394	0,220	0,105
	2,0	0,328	0,198	0,106
	3,0	0,296	0,197	0,091
Concentração de α -La na solução com 5,0 mg.mL ⁻¹ CSL = 0,652 mg.mL ⁻¹				

(1)- Vazão da etapa de adsorção

Para o cálculo do fator de purificação, deve se levar em consideração que o CSL apresenta um teor protéico de 83,84% (Tabela 3.1.1), com isto, para uma solução com $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ do CSL, a concentração em termos de proteínas totais é de $4,19 \text{ mg.mL}^{-1}$ e a concentração de α -La é igual a $0,652 \text{ mg.mL}^{-1}$. Com isto a α -La representa 15,56% das proteínas totais presentes no CSL.

Tabela 4.6.2: Análise de rendimento, pureza e fator de purificação, da purificação da α -La utilizando resinas de interação hidrofóbica em leito fixo e expandido.

LEITO FIXO				
Adsorventes Hidrofóbicos	Vazão ⁽¹⁾ (mL.min ⁻¹)	Rendimento (%)	Pureza ⁽²⁾ (%)	FP ⁽³⁾
Streamline Phenyl	1,0	31,63	81,78	5,26
	2,0	29,06	86,76	5,58
	3,0	22,09	78,93	5,07
Phenyl Sepharose CL-4B	1,0	8,50	80,64	5,18
LEITO EXPANDIDO				
Adsorventes Hidrofóbicos	Vazão ⁽¹⁾ (mL.min ⁻¹)	Rendimento (%)	Pureza ⁽²⁾ (%)	FP ⁽³⁾
Streamline Phenyl	1,0	16,10	80,25	5,16
	2,0	16,26	84,10	5,40
	3,0	13,86	82,60	5,31

(1)- Vazão da etapa de adsorção

(2)- Referente a α -La na etapa de eluição

(3)- Fator de Purificação

O rendimento do processo de recuperação da α -La apresentou-se baixo para as duas resinas de interação hidrofóbica, sendo que a Streamline Phenyl apresentou melhor desempenho que a resina Phenyl Sepharose CL-4B, quanto a recuperação e purificação da α -La. Este valor foi conseguido com a saturação das resinas, C/Co próximo a 1, durante a obtenção das curvas de ruptura (item 4.4), o que levou a uma

perda considerável de α -La nas etapas de adsorção e lavagem. Na prática industrial, o rendimento do processo é calculado na condição C/Co inferior a 0,1, com isto é possível obter um melhor rendimento na recuperação das proteínas (CHASE, 1984a).

Comparando os rendimentos obtidos com a resina Streamline Phenyl observa-se que a recuperação da α -La foi muito superior operando o sistema na condição de leito fixo. O aumento da vazão na etapa de alimentação também influenciou muito nas perdas de α -La, ocasionando uma diminuição no rendimento, de 26% na condição de leito fixo para 14% na condição de leito expandido.

Os valores da pureza e do fator de purificação para a α -La eluída das resinas hidrofóbicas foram satisfatórios, principalmente em se tratando de uma única etapa de purificação. Os contaminantes que aparecem juntos com a α -La, são em pequenas quantidades, tratando-se das proteínas β -Lactoglobulina e imunoglobulinas. A proteína α -La da Sigma, é comercializada com uma pureza de 85%.

Noppe *et al* (1998), conseguiram a purificação da α -La presente no leite com pureza de 98%, trabalhando com a resina Streamline Phenyl em leito expandido, para isto foi utilizado uma etapa de polimento com cromatografia de permeação em gel.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. CONCLUSÕES

A principal conclusão deste trabalho é relativa a possibilidade de purificação da α -Lactalbumina (α -La) do concentrado protéico do soro de leite, com um bom nível de pureza, empregando apenas uma única etapa de purificação, utilizando os adsorventes de interação hidrofóbica.

Nos ensaios com as resinas de troca iônica, a purificação da α -La não foi possível. Entretanto, estes adsorventes mostraram-se poderosos para a concentração das proteínas do CSL.

A seguir são citadas algumas conclusões específicas que permitiram estabelecer a conclusão principal:

- Os sistemas de tanque agitado utilizados, mostraram se versáteis para obtenção das melhores condições de adsorção das proteínas estudadas e para a obtenção das curvas cinéticas e das isothermas adsorção.
- Os valores de pH ótimo para a adsorção das proteínas do CSL e da α -La comercial apresentou-se entre 6,5 e 8,5 para as resinas de troca de ânions e de interação hidrofóbica.
- A adição do agente quelante EDTA, no tampão de condicionamento, foi de

fundamental importância para a recuperação da α -La com as resinas hidrofóbicas.

- O modelo de Langmuir ajustou-se bem as isotermas de adsorção da α -La em todas as resinas estudadas.

- O modelo cinético de adsorção descrito por SKIDMORE et al (1990), ajustou-se satisfatoriamente aos dados experimentais.

Experimentos em leito fixo, com adsorventes de interação hidrofóbica, possibilitaram uma maior recuperação da α -La quando comparados com os ensaios em leito expandido. O aumento da vazão de alimentação das colunas na etapa de adsorção influenciou na recuperação das proteínas para os dois sistemas.

A resina Streamline Phenyl teve com melhor desempenho no processo de recuperação da α -La que a Phenyl Sepharose CL-4B, tanto em termos de recuperação de proteínas quanto nas etapas preparativas, como empacotamento da coluna, limpeza, reutilização dos adsorventes.

- A análise do rendimento do processo de purificação, com as resinas de interação hidrofóbica, apresentou-se baixo na condição de saturação do leito, isto já era esperado, uma vez que nesta condição há perdas elevadas de proteínas na etapa de adsorção e lavagem. Certamente, melhores resultados para o rendimento poderão ser obtidos, quando a concentração de saída na curva de ruptura atinge no máximo 10% da concentração inicial.

- A pureza da α -La obtida foi maior que 80%, com um fator de purificação em torno de 5,0 vezes. Estes valores foram satisfatórios, considerando que nenhuma etapa de polimento foi utilizada no processo, tal como a filtração em gel ou permeação em membranas.

5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao trabalho, seriam interessantes alguns estudos adicionais objetivando recuperar a α -La em maiores quantidades e níveis de purificação empregando as resinas de interação hidrofóbica.

Fazer um estudo da otimização da recuperação e purificação da α -La em tanque agitado, através de planejamento experimental, para obter faixas de operação que permitam maximizar a recuperação da α -La presente no soro de leite.

Otimizar a recuperação e purificação da α -La em colunas com resinas hidrofóbicas, estudando o efeito de diferentes fatores como pH, temperatura, concentração e tipo de sal, através de planejamento experimental.

Desenvolver modelos matemáticos que descrevam o comportamento cinético de adsorção para a α -La em tanque agitado, levando em consideração os fatores de resistência a transferência de massa no filme líquido externo a partícula e a difusão no interior dos poros e a reação na superfície das partículas. Estes fatores deveram ser analisados em conjuntos ou isolados.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-MASHIKI, S.A., NAKAI, S.. "Reduction of β -lactoglobulin content of cheese whey by polyphosphate precipitation". Journal of Food Science. (1987). Vol. 52. 1237-1240 p.
- ARAÚJO, M.O.D.. "Adsorção de albumina de soro bovino em resinas trocadoras de íons". Campinas, SP-Brasil. (1996). Dissertação – Mestrado. UNICAMP.
- ARRUDA, E.J.. "Concentração e purificação de β -amilase de extrato de soja por adsorção em gel de afinidade quitosana-fenilboronato". Campinas, SP-Brasil. (1999). Tese – Doutorado. UNICAMP.
- ASCHARFFERNBURG, R. "Preparation of α -lactalbumin from cow's or goat's milk: a method improving the yield". Journal Dairy Science. (1968). Vol. 51, 291-296 p.
- ASCHARFFERNBURG, R., DREWRY, J.. "Genetics of the β -lactoglobulin of cow's milk". Nature. (1957). Vol. 180. 376-378 p.
- BELTER, P.A., CUSSLER, E.L., HU, W.. "Bioseparations: Downstream processing for biotechnology". John Wiley & Sons. New York, EUA (1988).
- BIO-RAD LABORATORIES.. "Mini-Protean Eletrophoresis Cell: Instruction manual". Bio-Rad Laboratories, California, EUA (1998).

- BRINK, W.. "The life extension protein, that fights disease and extends lifespan". Life Extension Report, January, (1996).
- CARRÈRE, H.. "Extraction des protéines du lactosérum par chromatographie d'échange d'ions en lit fluidisé". Institut National Polytechnique de Toulouse. (1993). Thèse-Doctorat.
- CARRÈRE, H., BASCOUL, A., FLOQUET, P., WILHELM, A.M.. "Whey proteins extraction by fluidized ion exchange chromatography: simplified modeling and economical optimization". The Chemical Engineering Journal. (1996). Vol. 64 (3). 307-317 p.
- CHASE, H.A.. "Prediction of the performance of preparative affinity chromatography". Journal of Chromatography. Amsterdam. Aug.(1984a). Vol. 297. 179-202 p.
- CHASE, H.A.. "Affinity separations utilizing immobilized monoclonal antibodies – a new tool for the biochemical engineer". Chemical Engineering Science. Oxford.(1984b). Vol. 39. (7-8). 1099-1125 p.
- CHEN, J.P.. "Partitioning and Separation of alfa-lactalbumin and beta-lactoglobulin in PEG potassium phosphate aqueous two-phase systems". Journal of Fermentation and Bioengineering. (1992). Vol. 73 (2). 140-147 p.
- COLLINS, C.H. & BRAGA, G.L.. "Introdução a métodos cromatográficos, 4^a ed." Editora da Unicamp, Campinas, SP-Brasil, 1990.
- COIMBRA, J.S.R.. "Desempenho de um extrator tipo Grassier na separação de proteínas de soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos". Campinas, SP-Brasil. (1995). TESE DOUTORADO. UNICAMP.
- CRUZ, J.M.. "Adsorção de insulina em resina trocadora de íons utilizando leitos fixos e expandidos". Campinas, SP-Brasil. (1997). Dissertação - Mestrado. UNICAMP.
- DELANEY, H.A.M.. "Composition, properties and uses of whey protein concentrate". Journal of the Society of Dairy Technology. (1976). 29 (2). 91-101 p.
- DRAEGER, N.M., CHASE, H.A.. "Protein adsorption in liquid fluidized beds- advances in separation processes". Ichem. E. Symposium Series. (1990). n.118. 161-172 p.

- EYNARD, L., IAMETTI, S., RELKIN, P., BONOMI, F.. "Surface hydrophobicity changes and heat-induced modifications of alfa-lactalbumin". Journal of Agricultural and Food Chemistry. (1992). Vol. 40 (10). 1731-1736 p.
- HAHN, R., SCHULZ, P.M., SCHAUPP, C., JUNGBAUER, A.. "Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography". Journal of Chromatography A. (1998). Vol. 795 (2). 277-287 p.
- HARRIS, E.L.V. & ANGAL, S.. " Protein purification methods: A practical approach". IRL PRESS, (1995). 220-230 p.
- HARRIS, E.L.V. & ANGAL, S.. " Protein purification applications: A practical approach". The Practical Approach Series. (1990). 17 p.
- HORSTMANN, B.J., CHASE, H.A.. "Modeling the affinity adsorption of immunoglobulin-G to protein A immobilized to agarose matrices". CHEMICAL Engineering Research & Design. (1989). Vol. 67, n 03. 243-254 p.
- HIRAOKA, Y., SEGAWA, T., KUWAJIMA, K.. " α -Lactalbumin: a calcium metalloprotein". Biochemical and Biophysical Research Communications. (1980). Vol. 95 (3). 1098-1104 p.
- IMAFIDON, G.I., FARKYE, N.Y., SPANIER, A.M.. "Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: A review". Critical Reviews in Food Science and Nutrition. (1997). Vol. 37 (7). 663-689 p.
- JAMES, E.A.. "The application of multicomponent adsorption theory to an ion exchange chromatography system for recovery of whey proteins". (1994). Australia. Tese-Doutorado.
- KALIL, S.J.. "Produção de inulinase por kluyveromyces e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido". Campinas, SP-Brasil. (2000). Tese-Doutorado. UNICAMP.
- KAMINURA, E.S.. "Modelagem e simulação do processo de purificação de lipase por cromatografia de afinidade". Campinas, SP-Brasil. (2000). Tese - Doutorado. UNICAMP.
- KANEKO, T., WU, B.T., NAKAI, S.. "Selective concentration of bovine immunoglobulins and α -lactalbumins from acid whey using FeCl_3 ". Journal of Food Science. (1985). Vol. 50 (6). 1531-1536 p.

- KAUFMANN, M.. "Unstable proteins: how to subject them to chromatographic separations for purification procedures". Journal of Chromatography B. (1997). Vol. 699. 347-369 p.
- LAEMMLI, U.K.. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4". Nature (1970). Vol.227, 680-685 p.
- LANGMUIR, I.. "The constitution and fundamental properties of solids and liquids". Journal of the American Chemical Society. (1916). Vol 38. 2263-2295 p.
- LEHNINGER, A. L.. "Biochemistry". Worth, NY. 1982.
- LEBENTHAL, E.. "Cows milk protein allergy". Pediatric Clinics of North America. (1975). Vol 22 (4) . 827-833 p.
- LINDAHL, L., VOGEL, H.J.. "Metal ion dependent hydrophobic interaction chromatography of α -lactalbumins. Analytical Biochemistry". (1984) Vol.140 (2), 394-402 p.
- McKENZEY, H.A.. "Milk Proteins-Chemistry and Molecular Biology". Academic Press, Vol. 1, 1970.
- MEHRA, R.K., DONNELLY, W.J.. "Fractionation of whey Protein Components through a large pore size hydrophilic, cellulosic membrane". Journal of Dairy Research . (1993). Vol 60 (1). 89-97 p.
- MORRYSSEY, J.H. "Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity". Analytical Biochemistry (1981). Vol. 117, 307-310 p.
-
- MORR, C.V., HA, E.Y.W.. "Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties". Critical Reviews in Food Science and Nutrition. (1993). Vol. 33 (6). 431-476 p.
- NOPPE, W., HAEZEBROUCK, P., HANSSENS, I., DE CUYPER, M.. "Simple two-step procedure for the preparation of highly active pure equine milk lysozyme". Journal of Chromatography A. (1995). Vol.719 (2). 327-331 p.

- NOPPE, W., HAEZEBROUCK, P., HANSSENS, I., DE CUYPER, M.. "A simplified purification procedure of alpha-lactalbumin from milk using Ca^{2+} -dependent adsorption in hydrophobic expanded bed chromatography". BIOSEPARATION. (1998). Vol 8. nº (1-5). 153-158 p.
- PEREIRA, J.A.M.. "Adsorção de Beta-Galactosidase de *Scopulariopsis* sp. em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala". Campinas, SP-Brasil. (1999). Tese - Doutorado. UNICAMP
- PHARMACIA - BIOTECH.. "Hydrophobic Interaction chromatography, principles and methods". Amesham Pharmacia - Biotech. Uppsala, Sweden, (1994).
- PHARMACIA - BIOTECH.. "Expanded bed adsorption, principles and methods". Amesham Pharmacia - Biotech. Uppsala, Sweden, (1996).
- PHARMACIA - BIOTECH.. "Catálogo de compras de equipamento e reagente". Amershan Pharmacia - Biotech. Uppsala, Sweden, (1998).
- PHARMACIA - BIOTECH.. "Catálogo de compras de equipamento e reagente". Amershan Pharmacia - Biotech. Uppsala, Sweden, (1999).
- SKIDMORE, G.L.; HORSTMAN, B.J. e CHASE, H.A.. "Modeling single-component protein adsorption to the cation exchanger s sepharose FF". Journal of Chromatography". (1990). Vol.19. 113-128 p.
- SGARBIERI, V.C.. "Proteína em alimentos protéicos". Livraria Varela. São Paulo, SP-Brasil. (1996). 139-157 p.
- SGARBIERI, V.C.. "Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento". Editora da UNICAMP. Campinas, SP-Brasil. (1987). 254-255 p.
- TABOADA, O.W.M.. "Purificação de lipase de *geotrichum* sp. por resina cromatográfica de interação hidrofóbica. Modelagem, simulação e validação de parâmetros". Campinas, SP-Brasil. (1999). Tese-Doutorado. UNICAMP.
- WATERS ACCELL PLUS QMA AND CM BULK MEDIA GUIDE, September (1987).
- YOSHIDA, S.. "Isolation of beta-lactoglobulin and alfa-lactalbumin by gel filtration using sephacryl S-200 and purification by diethylaminoethyl ion-exchange chromatography". Journal of Dairy Science. (1990). Vol. 73. nº (9). 2292-2298 p.