



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ARIANE ALVES OSHIRO

**Análise e desenvolvimento de processos de separação de biomoléculas
utilizando Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC)**

ARARAQUARA, SÃO PAULO

2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Análise e desenvolvimento de processos de separação de biomoléculas
utilizando Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC)**

Documento apresentado ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas-Unesp/Araraquara para a Defesa de
Dissertação do mestrado acadêmico.

Orientanda: Ariane Alves Oshiro

Orientador: Prof. Dr. Jorge Fernando Brandão Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

ARARAQUARA, SÃO PAULO

2021

O149a Oshiro, Ariane Alves.
Análise e desenvolvimento de processos de separação de biomoléculas utilizando Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC) / Ariane Alves Oshiro. – Araraquara: [S.n.], 2021.
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Jorge Fernando Brandão Pereira.
Coorientadora: Valéria de Carvalho Santos Ebinuma.

1. Extração líquido-líquido. 2. Sistemas Aquosos Bifásicos. 3. Cromatografia de Partição Centrífuga. 4. Hidrodinâmica. 5. Separação. 6. Biomoléculas. I. Pereira, Jorge Fernando Brandão, orient. II. Ebinuma, Valéria de Carvalho Santos, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise e desenvolvimento de processos de separação de biomoléculas utilizando Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC)

AUTORA: ARIANE ALVES OSHIRO

ORIENTADOR: JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA

COORIENTADORA: VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Química / Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade de Coimbra

Dra. NATHALIA VIEIRA VERÍSSIMO (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Prof. Dr. RANYERE LUCENA DE SOUZA (Participação Virtual)
Universidade Tiradentes

Araraquara, 16 de dezembro de 2021

RESUMO

A Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC) une o princípio de extração líquido-líquido à eficácia das técnicas cromatográficas, promovendo inúmeras etapas sequenciais de partição do soluto, e podendo, assim, aumentar a eficiência da extração. Devido à existência de uma fase estacionária líquida, esta técnica destaca-se por sua elevada capacidade preparativa e versatilidade na separação de compostos em uma vasta gama de polaridades. Apesar de suas vantagens, ainda existem uma série de obstáculos a serem superados para que a CPC seja amplamente empregada na recuperação de biomoléculas, tais como: *i)* conservação da estabilidade do equilíbrio hidrodinâmico entre as fases líquidas imiscíveis (representado pela retenção de fase estacionária (S_F)); *ii)* aumento da pressão de retorno do sistema decorrente do escoamento das fases na coluna. Isto posto, este trabalho consistiu em compreender as condições hidrodinâmicas de sistemas líquidos bifásicos aplicados em CPC capazes de promover a operação adequada do equipamento e realizar a partição e separação seletiva de biomoléculas. Para tanto, foi realizado, primeiramente, um estudo hidrodinâmico dos efeitos sob a pressão de retorno e na S_F devido à variação de três parâmetros operacionais: velocidade de rotação da coluna; fluxo de fase móvel; modo de operação (ascendente ou descendente). Numa segunda fase, foram realizados estudos de casos para avaliar a capacidade de partição e separação de biomoléculas em CPC, utilizando sistemas aquosos bifásicos (SAB) para partição de L-tirosina, riboflavina, ácido gálico e ácido vanílico, e sistema líquido-líquido tradicional (*i.e.*, aquoso-orgânico) para partição dos carotenoides β -caroteno e astaxantina. Os resultados obtidos permitiram compreender o comportamento dos fenômenos hidrodinâmicos em função das variáveis operacionais. Nesse sentido, foram identificados dois efeitos hidrodinâmicos principais, a saber, uma forte influência da velocidade de rotação da coluna e viscosidade das fases do sistema no aumento da pressão de retorno, e um efeito negativo na S_F devido ao aumento do fluxo de fase móvel. A compreensão da hidrodinâmica do CPC permitiu definir limites aos parâmetros operacionais adequados à operabilidade do equipamento para o SAB composto por K_2HPO_4 e etanol. Embora do ponto de vista processual o SAB composto por K_2HPO_4 e etanol seja promissor para a separação de compostos hidrofílicos, a separação das biomoléculas modelo foi inviabilizada, provavelmente devido à degradação destas no pH altamente alcalino ($pH \approx 10$) das fases do sistema. Por outro lado, a aplicação do sistema bifásico aquoso-orgânico (Hexano + Acetona + Etanol + H_2O) possibilitou a separação dos carotenoides β -caroteno e astaxantina, apresentando um potencial para a extração seletiva destes pigmentos a partir de matrizes complexas (p.ex. meios de cultivo).

Palavras-chave: Extração líquido-líquido, Sistemas Aquosos Bifásicos, Cromatografia de Partição Centrífuga, Hidrodinâmica, Separação; Biomoléculas.

ABSTRACT

Centrifugal partition chromatography (CPC) combines the principle of liquid-liquid extraction with the efficacy of chromatographic techniques, allowing numerous sequential solute partition steps, and thus increasing the extraction efficiency. Due to the existence of a liquid stationary phase, CPC stands out for its high preparative capacity and versatility in the separation of compounds in the entire polarity scale. Despite its advantages, some drawbacks must be overcome for CPC to be widely used in the recovery of biomolecules, namely: *i)* the maintenance of the hydrodynamic equilibrium between immiscible liquid phases (represented by the retention of the stationary phase (S_F); *ii)* the increase of backpressure of CPC due to phase flow in the column. Therefore, this work comprised in understanding the hydrodynamic conditions of two-phase liquid systems applied in CPC capable of promoting the proper operation of the equipment and perform the partition and selective separation of biomolecules. For this purpose, firstly, a hydrodynamic study to evaluate the backpressure and S_F due to the variation of three operational parameters, *i.e.*, column rotation speed, mobile phase flow, and mode of operation (ascendant or descendant) was carried out. In a second stage, specific case studies were carried out to determine the partition/separation of biomolecules in CPC, namely, using aqueous biphasic systems (ABS) for the partition of L-tyrosine, riboflavin, gallic acid, and vanillic acid, and traditional liquid-liquid system (*i.e.*, aqueous-organic) for the partition of β -carotene and astaxanthin carotenoids. The results allowed us to understand the behavior of hydrodynamic phenomena as a function of operational variables. In this regard, two major hydrodynamic effects were identified, namely, a strong influence of column rotation speed and the viscosities of the phases on increasing the backpressure of the CPC system, and a negative effect on S_F due to increasing of mobile phase flow. The understanding of CPC hydrodynamics allowed to define adequate operational parameters limits for CPC using the ABS composed of K_2HPO_4 and ethanol. Although from a processual perspective this ABS is promising for the separation of hydrophilic compounds, their separation was not successful, probably due to degradation at the high alkaline pH conditions of these ABS (pH $\approx$ 10). On the other hand, the application of an aqueous-organic biphasic system (Hexane + Acetone + Ethanol + H_2O) enabled the separation of β -carotene and astaxanthin carotenoids, confirming the potential of CPC for selective extraction of these pigments from complex matrix (*e.g.*, culture medium).

Keywords: Liquid-Liquid Extraction, Aqueous Biphasic System, Centrifugal Partition Chromatography, Hydrodynamics, Separation, Biomolecules.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de colunas a) hidrodinâmica e b) hidrostática de cromatógrafo contracorrente e seus respectivos campos gravitacionais.	9
Figura 2 – Coluna hidrostática do cromatógrafo de partição centrífuga modelo Quattro CPC™ (AECS - QuikPrep Ltd.).	21
Figura 3 – Viscosidades (μ) de soluções aquosas de PPG-400, [Ch]Cl e K ₃ PO ₄ , a 25°C, em função do aumento da concentração mássica do componente.	31
Figura 4 – Pressão de retorno no CPC em função do fluxo de fase para soluções de a) PPG-400, b) [Ch]Cl, c) K ₃ PO ₄ e d) Etanol, sob diferentes concentrações e viscosidades.	32
Figura 5 - Pressão de retorno no CPC em função da velocidade de rotação da coluna (ω) de soluções aquosas 20% (m/m) de PPG-400, [Ch]Cl, K ₃ PO ₄ e etanol, em modo descendente e fluxo de fase de 15 mL/min.	34
Figura 6 – Pressão de retorno no CPC em função da velocidade de rotação da coluna (ω) para K ₂ HPO ₄ /Etanol/H ₂ O em $F = 2$ mL/min, nos modos ascendente (a) e descendente (b).	35
Figura 7 – Pressão de retorno em função do fluxo de fase móvel (F) para K ₂ HPO ₄ /Etanol/H ₂ O em $\omega = 400$ rpm, nos modos ascendente (a) e descendente (b).	37
Figura 8 – Retenção de fase estacionária (S_F) em função da variação do fluxo de fase móvel (F) para K ₂ HPO ₄ /Etanol/H ₂ O, nos modos ascendente e descendente, em $\omega = 400$ rpm.	39
Figura 9 – Retenção de fase estacionária (S_F) em função da velocidade de rotação da coluna (ω) para K ₂ HPO ₄ /Etanol/H ₂ O, nos modos ascendente e descendente, para $F = 1, 2, 3$ e 6 mL/min.	41
Figura 10 – Partição de ácido gálico em K ₂ HPO ₄ /Etanol/H ₂ O no CPC, em modo descendente, e $\omega = 600$ rpm, com F (mL/min) e concentração da amostra no sistema bifásico (g/L) respectivamente iguais a: 2 e 0,1525 (Ensaio 1); 2 e 0,3050 (Ensaio 2); 1 e 0,3050 (Ensaio 3); 4 e 0,3050 (Ensaio 4).	45
Figura 11 – Eluição de ácido gálico (em modo descendente) em ensaio de separação em CPC de compostos fenólicos utilizando K ₂ HPO ₄ /Etanol/H ₂ O.	47

Figura 12 - Eluição de ácido vanílico (em modo ascendente) em ensaio de separação em CPC de compostos fenólicos utilizando K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O	48
Figura 13 – Ensaio em CPC de partição de riboflavina em K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O - a) frações coletadas ao longo da corrida e b) volumes de fase estacionária e móvel obtidos da extrusão da coluna ao final do ensaio.	52
Figura 14 – Frações coletadas em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O	55
Figura 15 – Perfil de varredura da fração F3, coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O	56
Figura 16 – Perfil de varredura da fração F3, coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros operacionais (fluxo de fase móvel, velocidade de rotação da coluna, modo de operação e concentração do soluto) empregados nos ensaios de partição de ácido gálico em CPC, utilizando o sistema aquosos bifásico K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O	26
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas (determinadas a 25°C) das fases topo e de fundo dos SAB K_3PO_4 / [Ch]Cl/ H_2O , K_2HPO_4 / [Ch]Cl/ H_2O , PPG-400/ [Ch]Cl/ H_2O e K_2HPO_4 / Etanol/ H_2O	29
Tabela 3 – Coeficientes de partição (K_D), em escala laboratorial, de solutos-modelo no SAB composto por 19,5 % (m/m) K_2HPO_4 + 19,5 % (m/m) Etanol + 19,5 % (m/m) de H_2O , e seus respectivos comprimentos de onda de absorção máxima.	43
Tabela 4 – Parâmetros operacionais e de retenção dos ensaios de partição de ácido gálico em K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O no CPC a $\omega = 600$ rpm.	44
Tabela 6 – Concentração de L-tirosina (g/L) de frações obtidas no ensaio de partição em CPC realizado em duplicata (Ensaio 1 e Ensaio 2), utilizando K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ – Viscosidade

CCC – Cromatografia Contracorrente

C_M – Concentração do soluto na fase móvel

CPC – Cromatografia de Partição Centrífuga

C_S – Concentração do soluto na fase estacionária

F – Taxa de fluxo de fase móvel

FE – Fase estacionária

FM – Fase móvel

IR – Índice de refração

K_D – Coeficiente de partição do soluto

m – Massa

N – Número de pratos teóricos

R_S – Fator de resolução

SAB – Sistemas Aquosos Bifásicos

S_F – Retenção de fase estacionária

t_S – Tempo de equilíbrio de fases

V – Volume de fase

V_C – Volume da coluna do CPC

V_D – Volume morto da coluna do CPC

V_M – Volume de fase móvel na coluna do CPC

V_R – Volume de retenção do soluto

V_S – Volume de fase estacionária na coluna do CPC

γ – Tensão interfacial

$\Delta\rho$ – Diferença de densidade entre as fases de topo e fundo

λ – Comprimento de onda

ρ – Densidade

σ – Condutividade

ω – Velocidade de rotação da coluna

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.	OBJETIVOS.....	17
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1.	Materiais	18
4.2.	Preparação e caracterização físico-química dos SAB	18
4.3.	Determinação do tempo de equilíbrio de fases (t_s)	19
4.4.	Ensaio no Cromatógrafo de Partição Centrífuga (CPC).....	20
4.5.	Equilíbrio de FE e FM na coluna do CPC.....	21
4.6.	Estudo de hidrodinâmica da pressão de retorno	22
4.7.	Estudo de hidrodinâmica da retenção de fase estacionária (S_F).....	23
4.8.	Determinação do coeficiente de partição (K_D) de solutos-modelo	24
4.9.	Estudo de partição de solutos-modelo em CPC utilizando SAB	25
4.10.	Estudo de partição de soluto em CPC utilizando um sistema bifásico aquoso-orgânico	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1.	Caracterização e seleção do SAB para aplicação em CPC	28
5.2.	Efeito do escoamento de soluções de componentes formadores dos SAB na pressão de retorno do CPC.....	30
5.3.	Estudo da hidrodinâmica no CPC utilizando o SAB K_2HPO_4 /Etanol	35
5.3.1.	Pressão de retorno	35
5.3.2.	Retenção de fase estacionária (S_F)	38
5.4.	Partição de biomoléculas em sistema aquoso-orgânico	53
6.	CONCLUSÕES.....	58
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

O mercado da biotecnologia destaca-se atualmente como um dos setores econômicos mais poderosos e inovadores do mundo contemporâneo. Com a revolução tecnológica do século XX e, principalmente, com a profunda evolução da biologia molecular na virada do século XXI, a biotecnologia se transformou em uma das principais tecnologias-chave no desenvolvimento de uma série de produtos e processos industriais (BERGERON e CHAN, 2004; COONS, 2021).

O progresso de tecnologias modernas baseadas nos conceitos da biotecnologia, permitiu a este setor a conquista de importantes realizações em diferentes campos de aplicação, como a geração de fontes de energia mais limpas, melhoramento do abastecimento mundial de alimentos, tratamento de doenças raras, redução de danos ambientais e criação de processos industriais mais seguros, limpos e eficientes (DUNDAR *et al.*, 2019).

Na mesma linha, o desenvolvimento de processos industriais, também designados de bioprocessos, apresentaram-se como uma alternativa promissora para a obtenção de diversos compostos a partir de fontes naturais, como animais, plantas e microrganismos. No entanto, a extração direta de compostos naturais a partir de suas fontes originárias possui uma série de limitações, como disponibilidade dos recursos naturais, dependência climática e sazonalidade, além de questões ecológicas, políticas e sociais. Este contexto fortaleceu a potencialidade da utilização de processos biotecnológicos como forma de solucionar estes problemas e possibilitar a obtenção de uma ampla gama de bioprodutos de aplicação comercial, como enzimas, proteínas, vitaminas, lipídeos, polissacarídeos e pigmentos naturais (MOLINA *et al.*, 2019).

O aumento da demanda do mercado por bioprodutos com alta qualidade e em grandes quantidades, somado ao crescimento das tendências de sustentabilidade e avanço das tecnologias industriais, criaram um ambiente altamente propício para a expansão da indústria biotecnológica (DANIELSON *et al.*, 2020). Segundo dados publicados pela Grand View Research Inc., o mercado global de biotecnologia, avaliado em 627,63 bilhões de dólares em 2020, deve alcançar entre os anos de 2021 e 2028 um valor de 2,44 trilhões de dólares, com uma estimativa de taxa de crescimento anual composta (CAGR, do inglês “*compound annual growth*” rate) em torno de 15,83%.

Apesar do expectável crescimento de mercado, as indústrias biotecnológicas ainda apresentam como grande desafio para a produção e comercialização dos bioprodutos, a redução da complexidade e do custo do processamento *downstream*, o qual compreende as etapas de extração, concentração, separação e purificação de biomoléculas-alvo. Após as primeiras etapas

de produção da biomolécula realizadas no processamento *upstream*, *i.e.*, obtenção da linhagem celular, preparo do inóculo e cultivo do microrganismo, a aplicação de uma série de operações unitárias torna-se necessária para obtenção do bioproduto na sua forma final purificada (JUNGBAUER, 2013). No entanto, a complexidade dos meios originais em que se encontram as biomoléculas-alvo, principalmente quando produzidas por cultivo microbiano, aliada aos elevados níveis de pureza normalmente requeridos para sua aplicação comercial, resultam em grande desafio no desenho das estratégias tecnológicas a serem adotadas no processamento *downstream*. Adicionalmente, importa destacar que devido à complexidade dessas operações, os custos envolvidos no processamento *downstream* podem corresponder em até 80% do custo total da produção, sobretudo de biomoléculas com aplicações terapêuticas, como os biofármacos (os quais exigem elevados níveis de purificação) (DESAI *et al.*, 2000; GRONEMEYER *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

As etapas do processamento *upstream* são influenciadas, principalmente, por limites biológicos, como linhagem celular e características do meio de crescimento, o que possibilita a obtenção de elevadas densidades celulares e concentração do produto, sem que isso afete demasiadamente o custo final do processo produtivo. Por outro lado, o processamento *downstream* apresenta limites físicos relacionados à capacidade dos equipamentos, de maneira que o processamento de maiores quantidades de matéria implica também no aumento do consumo de material, tempo e custo da operação (DESAI *et al.*, 2000; GRONEMEYER *et al.*, 2014).

Uma das principais unidades do processamento *downstream*, especialmente no caso das proteínas, é a cromatografia. As operações cromatográficas promovem a separação de misturas complexas de compostos com base em suas propriedades físico-químicas, como tamanho, ponto isoelétrico, densidade e polaridade. Dentre as diversas técnicas cromatográficas existentes, pode-se destacar a Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC) (FREITAG, 2014). A CPC é uma forma de cromatografia líquida que se configura como variante hidrostática das técnicas de Cromatografia Contracorrente (CCC), que são tecnologias de separação líquido-líquido que se diferenciam dos métodos cromatográficos convencionais devido à ausência de suporte sólido (fase estacionária) (BERTHOD, 2002; MARCHAL *et al.*, 2003; ITO, 2005).

A presença de um eixo de rotação no equipamento permite à técnica de CPC a utilização de uma fase estacionária líquida, cuja retenção na coluna é possibilitada pela geração de um campo gravitacional constante. A coluna de separação nesta técnica é formada pelas fases imiscíveis de um sistema líquido bifásico, as quais são utilizadas como fase móvel (FM) e fase estacionária (FE). Os sistemas de extração líquido-líquido, na sua origem, promovem a partição

seletiva de compostos de acordo com suas diferentes afinidades por cada uma das fases. Por serem formados a partir da utilização de uma variedade de solventes, orgânicos e aquosos, estes sistemas podem ser aplicados na extração e separação de moléculas em um amplo espectro de polaridade (WINTERHALTER, 2007; BEZOLD *et al.*, 2015). A versatilidade dos sistemas líquidos bifásicos, além de baixo custo, simplicidade de escalamento e capacidade de operação em processos contínuos, impulsionaram o desenvolvimento de diversas tecnologias, visando o aumento da eficiência de extração e aplicação em processos de separação em larga escala. Neste sentido, a CPC se apresenta como uma técnica capaz de aliar as particularidades dos sistemas líquidos bifásicos ao elevado poder de separação dos métodos cromatográficos (IQBAL *et al.*, 2016; RONCO *et al.*, 2020; VETTER *et al.*, 2020).

Em razão da natureza líquida da coluna, a CPC apresenta uma série de vantagens em relação às tradicionais técnicas cromatográficas, por exemplo: i) eliminação da perda de amostra por adsorção física ao suporte e manutenção da integridade estrutural da amostra; ii) ampla faixa de seletividade devido à variedade de sistemas líquidos bifásicos existentes, iii) e elevada capacidade preparativa, uma vez que o caráter líquido da FE permite que ela seja completamente acessada pela FM (BERTHOD, 2002; ITO, 2005; YIN *et al.*, 2010). Além disto, qualquer uma das fases do sistema bifásico, fase de topo ou de fundo, podem ser utilizadas como FM ou FE. Esta possibilidade permite que o CPC seja operado em dois modos de trabalho distintos, nomeadamente, ascendente - no qual a FE é a fase de fundo do sistema bifásico, e descendente - em que a FE é a fase de topo. Ainda, é possível que estes modos de operação sejam invertidos a qualquer momento do processo, permitindo que diferentes modos de eluição sejam empregados (BERTHOD, 2002; MARCHAL *et al.*, 2003; BOJCZUK *et al.*, 2017).

Comumente, aplica-se na CPC o modo de eluição isocrático, no qual os solutos são eluídos em um único modo de operação (ascendente ou descendente), ou seja, a FM é constante e equivalente à fase de topo ou de fundo, de acordo com o modo selecionado. A utilização deste modo permite que sejam alcançadas maior estabilidade da FE na coluna e resolução cromatográfica, em comparação aos modos de eluição posteriormente desenvolvidos na técnica, como o gradiente de pH e eluição-extrusão (YIN *et al.*, 2010; BOJCZUK *et al.*, 2017). No entanto, a aplicação do convencional modo de eluição isocrático apresenta uma importante restrição relacionada à partição do soluto. Diferente do que ocorre nas separações líquido-líquido tradicionais, a elevada eficiência de separação na CPC ocorre em valores do coeficiente de partição do soluto (K_D), preferencialmente igual a 1, com uma faixa de 0,25 a 16. Isto ocorre porque valores muito altos de K_D resultam em elevada diluição dos solutos e longo tempo de separação, enquanto valores muito reduzidos (menores que 0,25) afetam negativamente a

resolução da separação (ADELMANN e SCHEMBECKER, 2011; LIU *et al.*, 2015; SCHWIENHEER *et al.*, 2015; BOJCZUK *et al.*, 2017).

Em razão das restrições relacionadas ao K_D , as características do soluto são geralmente o primeiro e principal elemento analisado na busca pelo sistema líquido bifásico adequado para aplicação em CPC. Devido à grande gama de solventes disponíveis para compor os sistemas bifásicos, a escolha pelo sistema mais adequado acaba por demandar um grande esforço e tempo, sendo considerada uma das mais importantes e desafiadoras etapas no delineamento do processo de separação (RENAULT, 2002; HOPMANN *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2015). Contudo, a escolha do sistema bifásico baseada somente na capacidade de partição do soluto, não considera o comportamento hidrodinâmico das fases do sistema, essencial na eficiência do processo de separação e na execução operacional do CPC. O padrão de fluxo das fases líquidas e imiscíveis formado durante a passagem da FM através da FE é fundamental para a performance de separação, e pode ser compreendido pela análise de alguns importantes fenômenos hidrodinâmicos, dentre os quais destacam-se a retenção de fase estacionária (S_F) e pressão de retorno (ADELMANN *et al.*, 2013; SCHWIENHEER *et al.*, 2017; FROMME *et al.*, 2020).

A S_F é dada como o volume percentual de FE retida na coluna após o equilíbrio com a FM. A passagem da FM através da FE ao longo do processo de separação pode provocar a desestabilização do equilíbrio hidrodinâmico das fases, causando alteração na retenção dos solutos e, conseqüentemente, na resolução da separação. Assim, a manutenção de uma elevada estabilidade da FE torna-se fundamental na eficiência da coluna e predição do tempo de saída do pico cromatográfico (*i.e.*, tempo de retenção) dos solutos contidos na amostra (DU *et al.*, 1999; SUTHERLAND, 2002).

Outro elemento fundamental na hidrodinâmica do CPC é a pressão de retorno (ou *backpressure*). A coluna do equipamento é formada por uma série de câmaras volumétricas idênticas e interligadas por dutos de diâmetro reduzido. A presença apenas da FM nestes dutos faz com que ocorra um acúmulo de pressão hidrostática na passagem da FM de uma câmara para outra ao longo da separação. Esta limitação de pressão, característica do CPC, afeta de forma significativa a performance de separação, caracterizando-se como uma importante restrição à escolha dos sistemas líquidos bifásicos e parâmetros operacionais a serem aplicados (BERTHOD, 2002; POOLE, 2003).

Os dois fenômenos hidrodinâmicos mais característicos do CPC, descritos acima, são influenciados por uma série de fatores que podem ser divididos em três grupos: i) referente às propriedades físicas do sistema líquido bifásico – viscosidade (μ), tensão interfacial (γ) e

diferença de densidade entre as fases ($\Delta\rho$); ii) aos parâmetros operacionais - velocidade de rotação da coluna (ω), velocidade de fluxo da fase móvel (F), e modo de operação (ascendente ou descendente); iii) às características da coluna - volume, forma geométrica, tamanho e material de fabricação. Estes fatores se interrelacionam de forma complexa e afetam de maneira distinta a hidrodinâmica no CPC, de forma que a compreensão destes efeitos se faz fundamental ao planejamento do processo de separação (SCHWIENHEER e SCHEMBECKER, 2015).

Neste sentido, este projeto pretendeu avaliar as condições operacionais relevantes à performance do CPC e compreender como estas influenciam a hidrodinâmica das fases, a fim de aprofundar o conhecimento da técnica, visando a implementação de uma alternativa promissora às técnicas de separação e purificação tradicionalmente utilizadas no processamento *downstream*. Para tanto, investigou-se, primeiramente, o comportamento dos fenômenos hidrodinâmicos em função dos parâmetros operacionais (modo de operação, F e ω), buscando condições que promovessem elevada S_F , paralelamente a uma pressão de retorno reduzida e adequada ao funcionamento do equipamento. Este estudo compreendeu a análise da hidrodinâmica de diferentes sistemas aquosos bifásicos (SABs) compostos por cloreto de colina ([Ch]Cl), fosfato tripotássico (K_3PO_4), fosfato dipotássico (K_2HPO_4), polipropileno glicol com massa molecular média de 400 g/L (PPG-400), etanol e água, nomeadamente, K_3PO_4 /[Ch]Cl/ H_2O , K_2HPO_4 /[Ch]Cl/ H_2O , PPG-400/[Ch]Cl/ H_2O e K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O . Os SABs apresentam fases compostas majoritariamente por água, propiciando assim um ambiente adequado para a extração de diferentes biomoléculas. No entanto, estes sistemas apresentam características propensas à baixa S_F e elevadas pressões de retorno, em oposição aos sistemas líquido-líquido aquosos-orgânicos, os quais são mais comumente utilizados nas técnicas de CPC.

Em seguida, de forma a aplicar o conhecimento de hidrodinâmica obtido nos processos de partição de biomoléculas no CPC, foram realizados dois estudos de caso: I) ensaios de partição de L-tirosina, riboflavina, ácido gálico e ácido vanílico, utilizando o SAB com melhor hidrodinâmica (*i.e.*, K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O); II) e partição/separação dos carotenoides β -caroteno e astaxantina, utilizando o sistema aquoso-orgânico Hexano/Acetona/Etanol/ H_2O . Desse modo, pretendeu-se compreender e empregar a técnica para separar e purificar diferentes biomoléculas, de forma economicamente viável, em um processo semi-preparativo com elevada resolução e eficiência de separação, e que possa ser escalado à níveis de produção industrial e aplicado na extração seletiva de biomoléculas a partir de meios complexos, como os meios de cultura provenientes de cultivo de microrganismo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I. PROCESSAMENTO *DOWNSTREAM*

O processo completo de produção de uma biomolécula é composto por uma série de etapas que podem ser divididas em processamento *upstream* e *downstream*. O processamento *upstream* consiste na obtenção da linhagem celular, preparo do inóculo e cultivo do microrganismo, enquanto o processamento *downstream* compreende as etapas subsequentes à separação das células do meio de cultivo, incluindo processos de extração, concentração, purificação e formulação, até a obtenção do bioproduto em sua forma final (JUNGBAUER, 2013).

Os progressos no processamento *upstream*, advindos da tecnologia do DNA recombinante e de melhorias nas estratégias de controle de processos, possibilitaram uma elevada melhoria na eficiência dos processos de produção. Por serem etapas afetadas, principalmente, pelos limites biológicos do microrganismo utilizado, como linhagem celular e características do meio de crescimento, o desenvolvimento das etapas *upstream* possibilitaram a obtenção de maiores densidades celulares e concentração de biomoléculas, sem aumento significativo no custo final do produto (GRONEMEYER *et al.*, 2014). Diferentemente do que ocorre nessas primeiras etapas de produção do bioproduto, as etapas subsequentes que compõem o *downstream*, possuem limites físicos relacionados à capacidade dos equipamentos empregados. Em razão disto, o processamento de maiores quantidades de matéria, leva a um aumento no consumo de materiais, tempo e custo de operação. Dessa forma, a purificação das elevadas concentrações de biomoléculas configura-se atualmente como um dos principais desafios enfrentados pelas indústrias biotecnológicas (DESAI *et al.*, 2000; GRONEMEYER *et al.*, 2014; PRADO-RUBIO *et al.*, 2020).

Quando a biomolécula alvo é proveniente de cultivo de microrganismo, este desafio intensifica-se com o grau de complexidade do meio em que a biomolécula está inserida, visto que o meio de cultura, proveniente do cultivo celular, possui uma vasta diversidade de moléculas secundárias que consistem em impurezas para a biomolécula-alvo. Ainda, de acordo com sua aplicação final e exigências das agências regulatórias, diferentes graus de pureza são requeridos para as biomoléculas, impactando diretamente nos custos e estratégias tecnológicas adotadas no processamento *downstream* (DESAI, 2000; DESAI *et al.*, 2000; GRONEMEYER *et al.*, 2014).

Neste sentido, o processamento *downstream* emprega uma série de operações unitárias, selecionadas de acordo com a natureza do material de partida e com o grau máximo aceitável de impurezas e contaminantes, ou seja, com a pureza final do produto. A primeira etapa do processamento consiste na coleta das células do microrganismo produtor a partir do meio fermentado, através do uso de métodos de separação sólido-líquido, como centrifugação e filtração. As biomoléculas podem ser produzidas pelas células e serem naturalmente excretadas para o meio extracelular ou permanecerem no interior da célula, moléculas extracelulares e intracelulares, respectivamente. Caso a biomolécula alvo seja intracelular, deve-se incluir ainda um processo de ruptura celular, empregando métodos mecânicos extração enzimática e/ou tratamento com agentes químicos (FREITAG e HORVÁTH, 1995; WALSH, 2007). Em seguida, ocorre a eliminação de substâncias com propriedades físico-químicas que diferem consideravelmente do produto de interesse. Podem ser utilizados nesta etapa métodos de baixa resolução, como a extração líquido-líquido, precipitação, filtração por membranas, ou métodos mais específicos, como a separação por bioafinidade. A solução contendo o produto de interesse já consideravelmente mais concentrado e/ou purificado, segue então para uma terceira etapa, onde métodos altamente seletivos são utilizados para separar o produto de substâncias com propriedades e funções químicas semelhantes (FREITAG e HORVÁTH, 1995; WALSH, 2007).

Diferentes métodos cromatográficos são empregados nas etapas de purificação da biomolécula de interesse, os quais são escolhidos com base nas características das biomoléculas, como tamanho, forma, carga elétrica, presença de grupos hidrofóbicos na superfície e habilidade em se ligar a determinados ligantes. Dentre os métodos cromatográficos empregados, destacam-se: cromatografia de gel filtração, ou exclusão molecular, baseada na diferença de tamanho/forma dos compostos; cromatografia de afinidade, baseada na interação bioespecífica entre o soluto e um determinado ligante; cromatografia de troca iônica, baseada na carga elétrica superficial da molécula em um dado pH; cromatografia de interação hidrofóbica, baseada na diferença de hidrofobicidade das moléculas; cromatografia contracorrente, baseada na partição do soluto em sistema líquido-líquido. Após os processos cromatográficos de alta resolução, são realizadas, como último estágio do *downstream*, etapas de polimento, empregando-se processos como cristalização, liofilização e adição de excipientes, até que se obtenha o produto puro em sua formulação final (FREITAG e HORVÁTH, 1995; WALSH, 2007).

II. CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO CENTRÍFUGA (CPC)

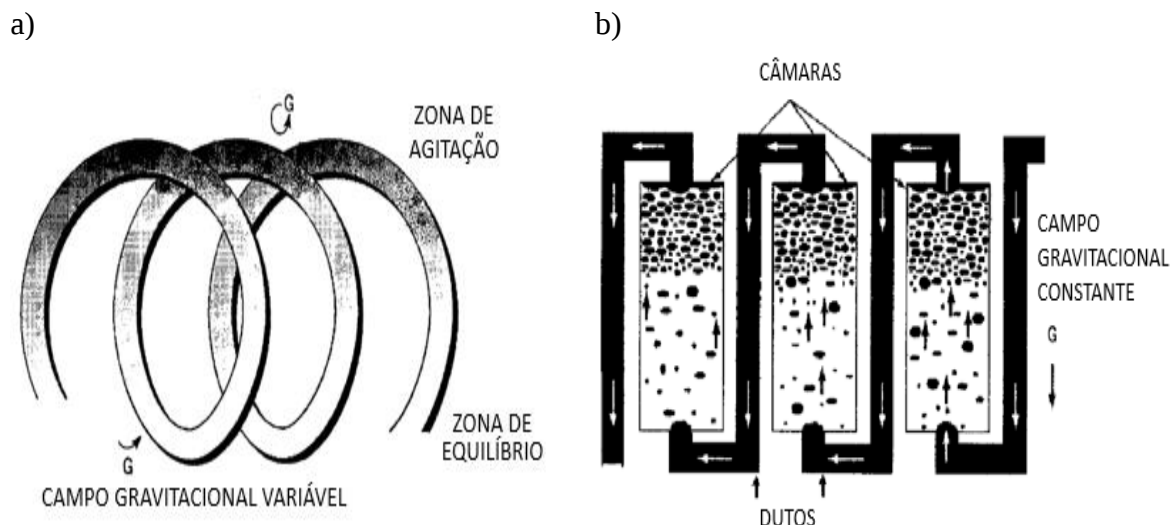
A CPC é uma forma de cromatografia líquida que se diferencia das convencionais técnicas cromatográficas devido à utilização de uma FE líquida, capaz de atuar sem a necessidade de um suporte sólido. Nesta técnica de separação líquido-líquido, a coluna cromatográfica é formada pelo equilíbrio hidrodinâmico entre as duas fases líquidas de um sistema bifásico, que são utilizadas como FM e FE (BERTHOD, 2002; ITO, 2005).

A CPC foi introduzida em 1982 pela companhia japonesa Sanki Eng. Ltda., sob comando de Kanichi Nunogaki, como resultado de uma colaboração entre a companhia e Yochiro Ito, inventor da CCC. A CCC, da qual deriva-se a CPC, foi instituída por volta de 1970, e é definida como uma técnica cromatográfica na qual ocorre a separação de uma amostra por meio da partição líquido-líquido em um sistema líquido bifásico. Embora o próprio nome sugira, o movimento das fases líquidas nesta técnica não ocorre de forma contracorrente. O termo contracorrente foi derivado do método de distribuição contracorrente (ou CCD, do inglês “*CounterCurrent Distribution*”), introduzido por Craig e Post em 1949, que também utilizava duas fases líquidas. No entanto, na CCC, uma das fases se mantém estacionária devido à criação de um campo gravitacional gerado pela rotação da coluna, enquanto a outra fase (*i.e.*, a FM) a atravessa, carregando e distribuindo os solutos de acordo com a afinidade relativa destes por cada uma das fases em equilíbrio (MARSTON e HOSTETTMANN, 1994; BERTHOD, 2002; CONWAY, 2011; BÜTTENBENDER *et al.*, 2018).

A evolução da CCC permitiu a criação de uma série de colunas, classificadas em sistemas hidrostáticos e hidrodinâmicos (Figura 1). Os sistemas hidrostáticos, mais conhecidos como CPC (do inglês “*Centrifugal Partition Chromatography*”), são formados por uma série de câmaras idênticas ligadas em cascata e conectadas por dutos de tamanho estreito, alocados em discos ou cartuchos, e dispostos ao redor de um rotor. Nestes sistemas, a rotação da coluna em torno de um único eixo de revolução, gera um campo gravitacional constante, o qual é responsável pela retenção da FE (BERTHOD, 2002; PAN e LU, 2007; BOJCZUK *et al.*, 2017; BÜTTENBENDER *et al.*, 2018).

Os sistemas hidrodinâmicos, por sua vez, são mais conhecidos pelas suas variantes *High-Speed Countercurrent Chromatography* (HSCCC) e *High-Performance Countercurrent Chromatography* (HPCCC). Estes sistemas possuem uma coluna de forma tubular e helicoidal que realiza um movimento planetário síncrono “tipo J”, onde um campo centrífugo, variável em intensidade e direção, é gerado pela rotação do suporte da coluna em torno de seu próprio eixo de revolução e em torno do eixo de revolução da centrífuga (BERTHOD, 2002; PAN e LU, 2007; BOJCZUK *et al.*, 2017; BÜTTENBENDER *et al.*, 2018).

Figura 1 – Representação de colunas a) hidrodinâmica e b) hidrostática de cromatógrafo contracorrente e seus respectivos campos gravitacionais.



Fonte: adaptada de BERTHOD e ARMSTRONG (1988).

A escolha entre a utilização de um sistema hidrostático ou hidrodinâmico ocorre geralmente de acordo com a característica da separação/purificação a ser realizada. Por exemplo, sistemas líquidos bifásicos que apresentam maior dificuldade de serem retidos em colunas hidrodinâmicas, como os tradicionais SABs, apresentam, em teoria, melhor desempenho quando utilizadas as colunas hidrostáticas. No entanto, embora a coluna hidrostática promova maior estabilidade das fases líquidas, também propicia uma menor eficiência de mistura das fases, resultando em alargamento do pico cromatográfico e menor performance de separação. Assim, a escolha entre cada tipo de coluna baseia-se geralmente na necessidade de se utilizar determinados tipos de sistemas líquidos bifásicos, ou priorizar uma elevada eficiência no processo de separação (POOLE, 2003; BERTHOD, 2007).

Devido à natureza líquida da técnica, qualquer uma das fases de um sistema líquido bifásico pode ser selecionada como FM e FE, de maneira que é possível operar o CPC em dois modos de operação, ascendente e descendente. No modo ascendente, a FM é a fase menos densa do sistema bifásico (fase de topo), enquanto a FE é a fase mais densa (fase de fundo). Nesta configuração, a FM menos densa é introduzida pela extremidade inferior de cada câmara da coluna, atravessando a FE em um movimento ascendente e contrário ao campo gravitacional. O modo descendente, por sua vez, funciona de forma oposta, *i.e.*, a FM é equivalente à fase de fundo do sistema bifásico, enquanto a FE é equivalente à fase de topo (BERTHOD, 2002; MARCHAL *et al.*, 2003).

O caráter líquido da coluna permite ainda que a CPC, assim como outras formas de CCC, apresente uma série de vantagens em relação às outras técnicas cromatográficas. Dentre elas, pode-se destacar: *i)* eliminação de problemas críticos ligados à amostra, como desnaturação, contaminação e perda por adsorção irreversível ao suporte; *ii)* seletividade única, uma vez que permite a utilização de uma imensa gama de sistemas bifásicos formados por solventes de diferentes polaridades, portanto, capazes de purificar uma grande variedade de moléculas-alvo, sobretudo aquelas de difícil aplicação e separação nas demais cromatografias; *iii)* capacidade preparativa, pois, diferentemente do que ocorre na cromatografia líquida de alta eficiência, onde a área disponível para que o soluto seja separado limita-se somente à superfície da matriz sólida, na CPC, o soluto é capaz de acessar todo o volume da FE, permitindo a separação e purificação de uma grande quantidade de material (BERTHOD, 2002; YIN *et al.*, 2010).

Apesar de importantes vantagens, o caráter líquido e configuração da coluna resultam em grandes desafios à implementação do CPC, uma vez que a “coluna” só existe de fato quando as duas fases imiscíveis do sistema bifásico se encontram em equilíbrio hidrodinâmico. Assim, é essencial ao processo que este equilíbrio seja mantido e que a FE seja capaz de se manter estável ao longo da passagem da FM. Além disto, os dutos que interconectam as câmaras da coluna do CPC estão preenchidos apenas com FM, sem que haja neste espaço qualquer contato da FM com a FE. Este fato configura em maior limitação na transferência dos solutos entre as fases e, conseqüentemente, maior alargamento de banda cromatográfica no processo de separação (BERTHOD, 2002; BOJCZUK *et al.*, 2017).

III. PRINCÍPIO DE SEPARAÇÃO NA CPC

A distribuição de solutos em CPC é baseada unicamente no princípio de partição líquido-líquido, no qual os solutos são distribuídos entre FM e FE de acordo com suas afinidades por cada uma das fases em equilíbrio. A forma como se dará a distribuição/partição de um soluto entre as fases do sistema bifásico é estabelecida pelo coeficiente de distribuição/partição do soluto (K_D), normalmente expresso como a razão entre a concentração do soluto na FE (C_S) por sua concentração na FM (C_M) (Eq. 1) (BERTHOD, 2002; ITO, 2005).

$$K_D = \frac{C_S}{C_M} \quad \text{Eq. 1}$$

No modo clássico de eluição isocrática utilizado no CPC, no qual o processo de separação é realizado em um único modo de operação, ascendente ou descendente, os K_D dos solutos devem estar contidos em uma determinada faixa de operacionalidade (BOJCZUK *et al.*, 2017). Esta faixa, chamada de “sweet spot”, de acordo com diferentes literaturas, ocorre geralmente entre $0,25 < K_D < 16$ (ADELMANN e SCHEMBECKER, 2011; LIU *et al.*, 2015), ou de forma mais restrita, de $0,25 < K_D < 4$ (MARLOT *et al.*, 2020). Segundo Bojczuk *et al.* (2017), dentro desta faixa, uma diferença de apenas 0,2 no K_D entre dois solutos, é capaz de promover uma resolução de separação eficaz, permitindo a purificação de amostras complexas, as quais necessitam ser purificadas em processos laboriosos com recurso a outras técnicas cromatográficas.

Mais especificamente, busca-se para o sistema bifásico selecionado, o valor de K_D mais próximo possível de 1, onde o soluto particiona-se igualmente entre FM e FE. Em $K_D = 1$, não há distinção da partição do soluto entre as fases do sistema, *i.e.*, é como se o soluto fosse eluído em uma única fase. Assim, independentemente do volume de FE retido na coluna, a eluição do soluto ocorrerá em um volume de retenção (V_R) exatamente igual ao volume da coluna (V_C), resultando em uma separação com alta resolução e tempo de eluição satisfatório. De forma contrária, K_D muito baixo, ou seja, baixa afinidade do soluto pela FE, resulta em separação de baixa resolução, com eluição do soluto próxima ao *solvent front*, enquanto K_D muito elevado, leva a um tempo de eluição demasiadamente longo, e conseqüentemente, maior consumo de solventes, e alargamento do pico cromatográfico (FOUCAULT, 2001; BERTHOD, 2002; SUTHERLAND, 2002; WARD *et al.*, 2015).

Desta forma, a compreensão de como se particionam os solutos de uma amostra (e as impurezas) em um dado sistema bifásico, é essencial para estimar a performance de separação em CPC. Conhecido o valor de K_D da molécula-alvo, e através da determinação dos volumes de FE e FM na coluna, é possível determinar o V_R , e assim a posição do pico cromatográfico, pelas seguintes equações (BERTHOD, 2002; ITO, 2005; WARD *et al.*, 2015):

$$V_R = V_M + K_D * (V_C - V_M) \quad \text{Eq. 2}$$

$$V_R = V_C * [1 + (K_D - 1) * S_F] \quad \text{Eq. 3}$$

Onde V_C é dado pela soma dos volumes de FE (V_S) e de FM (V_M), dado que a coluna é constituída somente das duas fases líquidas em equilíbrio e ausente de qualquer matriz sólida. Estas variáveis são utilizadas, juntamente com a eficiência da coluna ou número de pratos

teóricos (N), para calcular o grau de separação entre dois solutos, através da determinação do fator de resolução (R_S) (YIN *et al.*, 2010):

$$R_S = S_F \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{K_{D2} - K_{D1}}{1 - S_F \left[1 - \frac{K_{D2} + K_{D1}}{2} \right]} \quad \text{Eq. 4}$$

Pela Eq. 4 verifica-se que a R_S é dependente dos K_D dos solutos (K_{D1} e K_{D2}), de N e de S_F , onde, o R_S varia diretamente com S_F e com a $\sqrt{N}$. Ou seja, R_S mostra-se mais sensível à variação de S_F que de N , de forma que o R_S é significativamente maior, quanto maior for a quantidade de FE retida na coluna. Além disto, nota-se que o valor de N sozinho não é suficientemente seguro para avaliar a eficiência de resolução de uma coluna contracorrente, já que esta varia com o volume de FE retido (BERTHOD e BILLARDELLO, 2000; YIN *et al.*, 2010).

IV. SISTEMAS BIFÁSICOS LÍQUIDO-LÍQUIDO

A escolha do sistema bifásico líquido-líquido para ser utilizado no CPC é uma das mais importantes etapas no delineamento do processo de separação, equivalente à escolha do tipo de coluna (FE) e eluente (FM) na cromatografia líquida de alta eficiência. No caso da CPC, entretanto, a escolha de FM e FE é feita de forma interdependente, dado que a coluna cromatográfica é formada por ambas as fases em equilíbrio (RENAULT, 2002).

O número praticamente infinito de solventes disponíveis que permitem a formação de sistemas bifásicos líquido-líquido, confere à técnica uma marcante versatilidade, possibilitando a separação e purificação de uma grande variedade de compostos, como peptídeos, lipídeos, íons metálicos, metabólitos secundários e células. No entanto, esta alta disponibilidade de solventes também faz com que a busca pelo melhor sistema bifásico se torne um importante desafio à implementação e execução da técnica de CPC. Geralmente, a escolha do melhor sistema bifásico demanda considerável experiência e aptidão do profissional, sendo considerada a etapa responsável por até 90% de todo o trabalho e tempo requerido no desenho do processo de separação propriamente dito (RENAULT, 2002; ITO, 2005; LIU *et al.*, 2015).

O primeiro e principal elemento analisado nesta etapa é o K_D da molécula-alvo. A procura por sistemas bifásicos em que o soluto possua K_D adequado, inicia-se normalmente pela busca na literatura por sistemas bifásicos já previamente aplicados em moléculas semelhantes à molécula-alvo. Caso essa abordagem não seja suficiente, pode ser realizada uma

triagem inicial de potenciais sistemas bifásicos em diferentes composições de seus componentes formadores, de forma a variar a polaridade do sistema e assim ajustar a partição do soluto (HOPMANN *et al.*, 2012; FROMME *et al.*, 2020). Essa abordagem tem em consideração as características relacionadas à natureza química da amostra, como solubilidade, estabilidade nos componentes do sistema, presença de compostos ionizáveis, métodos de detecção, concentração e volume de injeção. Contudo, a escolha do sistema bifásico baseada somente na partição do soluto não considera o comportamento hidrodinâmico das fases, essencial na eficiência do processo de separação por CPC (RENAULT, 2002; LIU *et al.*, 2015; BOJCZUK *et al.*, 2017).

O regime de fluxo das fases no CPC deve ser capaz de promover: i) boa dispersão das fases, de forma a promover elevada transferência de massa; ii) rápida coalescência das fases para evitar o “sangramento” da coluna (chamado de *bleeding*), ou seja, perda de FE devido ao arraste por FM; iii) estabilidade de FE na coluna, isto é, elevada S_F ; iv) e pressão de retorno dentro do limite de operabilidade do equipamento (FROMME *et al.*, 2020). Todos esses fenômenos hidrodinâmicos na CPC são influenciados por uma série de fatores que podem ser divididos em três grupos: referente às propriedades físicas do sistema líquido bifásico - μ , γ $\Delta\rho$; aos parâmetros operacionais - ω , F e modo de operação (ascendente ou descendente); e às características da coluna - volume, forma geométrica, tamanho e material de fabricação (SCHWIENHEER e SCHEMBECKER, 2015).

V. RETENÇÃO DE FASE ESTACIONÁRIA (S_F)

Um dos parâmetros mais importantes avaliados na CPC é o S_F , que mede o volume percentual de FE que fica retido na coluna em relação à capacidade volumétrica total. Do valor de S_F são determinados outros importantes parâmetros para a CPC, como eficiência da coluna, resolução do pico cromatográfico e retenção dos solutos (DU *et al.*, 1999).

A eficiência de separação na CPC é fortemente influenciada pelo padrão de fluxo das fases líquidas imiscíveis que se forma durante a passagem da FM através da FE imobilizada na coluna. Este comportamento hidrodinâmico das fases pode ser compreendido através da análise de alguns efeitos, como S_F , pressão de retorno, transferência de massa, “*backmixing*” (causada pela circulação de FE nas câmaras e arraste de FM de volta para a entrada da câmara) e volume morto (ADELMANN *et al.*, 2013; SCHWIENHEER *et al.*, 2017). A observação destes três últimos efeitos, entretanto, possui algumas restrições e exige considerável esforço experimental, com a utilização de sistemas ópticos, simulação da Fluidodinâmica

Computacional (CFD, do inglês *Computational Fluids Dynamics*) e análise de velocimetria por imagem de partículas (PIV, do inglês *Particle Image Velocimetry*).

A pressão de retorno e S_F , por sua vez, podem ser quantificadas com segurança e utilizadas como uma forma simples de compreender a viabilidade do sistema bifásico, bem como na definição dos parâmetros operacionais do processo de separação (SCHWIENHEER *et al.*, 2017). O conjunto de propriedades físicas (μ , γ e $\Delta\rho$) é responsável por um importante parâmetro na aplicabilidade do sistema bifásico em CPC, *i.e.*, o tempo de equilíbrio de fases (t_s). Este parâmetro determina o tempo necessário para que a mistura bifásica seja separada em duas fases completamente nítidas, e pode ser utilizado como uma simples medida para prever a estabilidade do sistema no CPC (AL-MARZOUQI *et al.*, 2005; ITO, 2005; BEZOLD *et al.*, 2015). Sistemas com propriedades físicas adequadas para aplicação em CPC devem possuir um t_s relativamente baixo, de maneira que, quanto menor o valor de t_s , maior é a estabilidade de FE na coluna e, conseqüentemente, maior o valor de S_F . Sistemas bifásicos com elevada μ e baixos valores de γ e $\Delta\rho$ possuem t_s relativamente longos, maiores que 30 s (AL-MARZOUQI *et al.*, 2005). Segundo Ito (2005), inventor da CCC, sistemas com t_s menores que 20 s, para F dentro de uma faixa apropriada, devem resultar em S_F maiores que 50%.

Além das propriedades do sistema bifásico, os parâmetros operacionais do equipamento utilizados no processo de separação exercem forte influência nos valores de S_F . Diferente do que ocorre nas colunas hidrodinâmicas em contracorrente, onde a S_F é estabelecida como sendo linearmente relacionada à $\sqrt{F}$, quando aplicadas em CPC, S_F é relacionada com F de uma forma ainda não tão bem estabelecida. Sabe-se, porém, que o aumento de F causa um decréscimo em S_F , mas que, em contrapartida, resulta em diminuição do tempo de separação do processo cromatográfico (YIN, 2010; ADELMANN e SCHEMBECKER, 2011; ADELMANN *et al.*, 2013). Por sua vez, a ω exerce menor influência em S_F . Entretanto, o aumento de ω resulta em menor tamanho das gotículas de FM formadas, promovendo maior dispersão e resultando, conseqüentemente, no aumento da resolução e eficiência da separação. Além disso, o aumento da intensidade do campo centrífugo causado pelo aumento de ω , tende a “segurar” mais fortemente a FE, de forma que possibilita a operação do equipamento em maiores F (YIN, 2010; ADELMANN *et al.*, 2013).

Os parâmetros operacionais descritos acima, bem como o modo de operação (ascendente ou descendente), afetam a S_F de forma diferente para diferentes geometrias e tamanhos de coluna. No entanto, a transferência de metodologia de separação entre duas colunas distintas é possível, buscando-se manter constante a resolução entre os solutos-alvo, como exposto no trabalho de Roehrer e Minceva (2019). Por fim, importa destacar que não só

estes parâmetros exercem influência em S_F , mas também a amostra a ser processada. A injeção de uma grande quantidade de amostra, dependendo de sua composição e da interação com as fases do sistema bifásico, pode causar a perda de FE, de maneira que o volume e concentração da amostra devem ser considerados quanto ao tamanho da coluna utilizada, performance da coluna e solubilidade da amostra no sistema bifásico (YIN, 2010).

VI. PRESSÃO DE RETORNO

A pressão de retorno, derivada do termo inglês “*pressure drop*”, também conhecida como “*backpressure*”, configura-se como um dos maiores obstáculos para uma performance de separação satisfatória na aplicação de sistemas bifásicos líquidos em CPC. Diferente dos equipamentos hidrodinâmicos, na CPC a coluna é constituída de um único eixo de rotação e utiliza em sua configuração as juntas rotativas, também denominados selos rotativos (ADELMANN *et al.*, 2013; FUMAT *et al.*, 2016). As juntas rotativas são componentes mecânicos que produzem dois dos principais problemas no funcionamento do CPC: a geração de calor resultante do contato das juntas com as partes estáticas do equipamento e a restrição do limite máximo de pressão. Assim, quando acima de um determinado valor de pressão, o fluido dentro das juntas rotativas pode infiltrar-se entre as partes móveis e estáticas, causando vazamentos que podem dissolver e danificar os lubrificantes dos rolamentos (FUMAT *et al.*, 2016).

As colunas hidrostáticas são formadas por uma série de câmaras de volume e geometria idênticos, onde a FM e FE estabelecem o contato, promovendo a partição dos solutos de acordo com as afinidades relativas destes por cada uma das fases em equilíbrio. É formado na coluna um padrão de repetição devido a presença de dutos de diâmetro mais reduzido que interligam essas câmaras. A presença apenas da FM nos dutos faz com que ocorra um acúmulo de pressão hidrostática na passagem de FM de uma câmara para outra ao longo da separação. Esta pressão gerada no CPC é limitada pelo uso dos selos rotativos, os quais impõe um limite máximo de operação do equipamento a uma pressão em torno de 60 atm (cerca de 880 psi) (BERTHOD, 2002; POOLE, 2003).

Esta limitação de pressão, característica do CPC, afeta de forma significativa a performance de separação, e restringe consideravelmente a escolha dos sistemas bifásicos e parâmetros operacionais a serem utilizados. As variáveis que determinam a pressão de retorno no CPC são as mesmas que afetam a resolução e eficiência de separação, *i.e.*, parâmetros operacionais do equipamento, propriedades físico-químicas do sistema bifásico, características da coluna e S_F (VAN BUEL *et al.*, 1997). Berthod e Armstrong (1988) definiram a pressão de

retorno absoluta como sendo a soma de duas contribuições, nomeadamente, uma contribuição hidrostática formada pela $\Delta\rho$ e pela força centrífuga e uma contribuição hidrodinâmica resultante da μ e da fricção da FM com as paredes das câmaras e dutos da coluna (ADELMANN *et al.*, 2013).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto foi compreender a hidrodinâmica de sistemas líquidos bifásicos em processos de separação de biomoléculas utilizando Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC). Para tal, o projeto foi dividido em três partes, cada qual com os respectivos objetivos específicos:

PARTE I - Estudo da hidrodinâmica de sistemas aquosos bifásicos (SAB)

- i. Caracterizar as propriedades físico-químicas de SAB compostos por sais, polímeros e etanol;
- ii. Analisar o efeito das propriedades físico-químicas na hidrodinâmica dos SAB em CPC;
- iii. Estudar e avaliar o efeito de parâmetros operacionais do CPC (F , ω e modo de operação) na hidrodinâmica dos SAB;

PARTE II - Análise de partição de biomoléculas utilizando SAB em CPC

- i. Estudar a partição de solutos-modelo, em escala laboratorial, no SAB que apresenta melhor comportamento da hidrodinâmica no CPC;
- ii. Analisar a partição dos solutos-modelo que apresentarem maior compatibilidade com as condições de aplicação em CPC;

PARTE III - Análise de partição de biomoléculas utilizando sistema aquoso-orgânico em CPC

- i. Estudar a partição de biomoléculas, em escala laboratorial, em sistema aquoso-orgânico;
- ii. Analisar a performance do CPC na separação de biomoléculas utilizando sistema aquoso-orgânico;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Os sistemas bifásicos líquido-líquido foram preparados utilizando cloreto de colina ($C_5H_{14}ClNO$, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), polipropileno glicol com massa molecular média de 400 g/L (PPG-400, $C_3H_6O_2$, Sigma-Aldrich®), fosfato dipotássico (K_2HPO_4 , $\geq 98\%$, Merck KGaA®), fosfato tripotássico (K_3PO_4 , $\geq 95\%$, Êxodo Científica®), álcool etílico absoluto P.A. (C_2H_6O , $\geq 99,8\%$, Êxodo Científica®), hexano P.A. (C_6H_{14} , $\geq 98,5\%$, Synth®) e acetona P.A. (C_3H_6O , $\geq 99,5\%$, Êxodo Científica®). Em todos os preparos utilizou-se água ultrapura duplamente destilada, passada através de um sistema de osmose reversa e posteriormente tratada por filtração através de um sistema de troca iônica Millipore Milli-Q (18 MΩcm). Os solutos utilizados nos ensaios de partição foram o ácido gálico ($C_7H_6O_5$, 97,5–102,5%, Sigma-Aldrich®), ácido vanílico ($C_8H_8O_4$, 97,0%, Sigma-Aldrich®), ácido p-cumárico ($C_9H_8O_3$, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), ácido trans-ferúlico ($C_{10}H_{10}O_4$, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich®), L-tirosina ($C_9H_{11}NO_3$, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), riboflavina ($C_{17}H_{20}N_4O_6$, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), β -caroteno ($C_{40}H_{56}$, Carbosynth Ltd.), astaxantina ($C_{40}H_{52}O_4$, $\geq 97,0\%$, Sigma-Aldrich®), colorante verde malaquita P.A. ($C_{23}H_{25}ClN_2$, Synth®), colorante verde brilhante SF Yellowish ($C_{37}H_{34}N_2O_9S_3Na_2$, $\geq 80,0\%$, NEON) e colorante vermelho de fenol P.A. ($C_{19}H_{14}O_5S$, VETEC). A proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *green fluorescent protein*) e o colorante vermelho de *Talaromyces amestolkiae* utilizados foram produzidos, respectivamente, de acordo com protocolo descrito por Lopes *et al.* (2019) e De Oliveira *et al.* (2022). Todos os demais reagentes foram de grau analítico e utilizados conforme recebidos.

PARTE I – Estudo da hidrodinâmica de sistemas aquosos bifásicos (SAB)

4.2. Preparação e caracterização físico-química dos SAB

Os estudos de hidrodinâmica e partição de biomoléculas foram realizados utilizando os SAB com as seguintes composições mássicas (%m/m): i) 25,0 K_3PO_4 + 30,0 [Ch]Cl + 45,0 H_2O (SHAHRIARI *et al.*, 2013); ii) 27,5 K_2HPO_4 + 27,5 [Ch]Cl + 45,0 H_2O (OSLOOB e ROOSTA, 2019); iii) 45,0 PPG-400 + 25,0 [Ch]Cl + 30,0 H_2O (PASSOS *et al.*, 2016); iv) 19,5 K_2HPO_4 + 19,5 Etanol + 61,0 H_2O (TOLEDO *et al.*, 2019). Os sistemas foram preparados através da adição (por pesagem ou medição) e mistura de seus componentes, de acordo com seus respectivos dados de equilíbrio previamente definidos nas literaturas citadas.

Dada a relevância das propriedades físico-químicas para o estudo de hidrodinâmica, as fases de topo e fundo dos SAB foram analisadas quanto ao seu volume (V), massa (m), pH, condutividade (σ), teor de água, índice de refração (IR), densidade (ρ), viscosidade (μ) e tensão interfacial (γ). Para essas determinações, sistemas de 10 g e 20 g (excepcionalmente para o sistema K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O) foram preparados em tubos de vidro graduados, através da pesagem de seus componentes em balança analítica (MARTE, modelo UW220), com incerteza de 0,0001 g, e de acordo com suas respectivas composições mássicas. Os sistemas foram agitados em agitador tipo vórtex multifuncional (KASVI, modelo K40 - 1020) até completa dissolução dos componentes, e equilibrados em banho ultratermostático a 25 °C, por 12 a 24 horas, de forma a atingir uma completa separação de fases. Após este período, as fases de topo e de fundo foram cuidadosamente separadas utilizando pipeta Pasteur de vidro, enquanto o volume da interface foi descartado.

Os valores de pH e σ foram determinados utilizando um medidor pH/condutividade (modelo 914 - Metrohm), enquanto as medidas de μ e ρ foram realizadas a 25 °C e pressão atmosférica em viscosímetro-densímetro (Stabinger SVM3000 - EXW Anton Paar). O IR foi determinado por caracterização de refração por oscilação termo-óptica (modelo TORC 5000 - Anton Paar) e o teor de água por titulação Karl Fischer (modelo 852 Titrand - Metrohm). Para o SAB K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O , utilizado em todos os estudos de hidrodinâmica, também foi determinada a γ , empregando-se o método do anel (DRELICH *et al.*, 2002) e utilizando um tensiômetro de força (K100 - KRÜSS).

Para os estudos em CPC, foram preparados sistemas de maiores volumes, de 2 a 4 L, de acordo com a necessidade de cada ensaio. Os componentes foram adicionados em frascos reagentes de vidro e agitados em agitador magnético (modelo C-MAG HS7 - IKA) até completa solubilização dos componentes. Os sistemas foram deixados em equilíbrio *overnight* em funil de separação (temperatura ambiente e pressão atmosférica). Antes da utilização nos ensaios em CPC, as fases foram separadas e desgaseificadas em banho ultrassônico (Ultronic - Eco-sonics) por 10 min.

4.3. Determinação do tempo de equilíbrio de fases (t_s)

O tempo necessário para que as fases do sistema líquido bifásico sejam completamente separadas, após vigorosa agitação, está diretamente relacionado à estabilidade da FE na coluna do CPC. Desta forma, para o SAB K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O , utilizado em todos os estudos de hidrodinâmica, foi avaliado o valor do t_s , de acordo com metodologia descrita por Ito (2005). A determinação do t_s foi realizada através da adição de 2 mL de cada uma das fases do SAB

em tubo de ensaio vedado com película Parafilm M®. O tubo foi manualmente vertido (*up/down*) por 10 vezes e deixado estabilizar. Em seguida, foi cronometrado o tempo necessário para a completa separação das fases e formação de uma interface visível. A análise foi feita em triplicata e, para cada triplicata, o valor de t_s foi cronometrado três vezes, a fim de alcançar maior precisão na medição.

4.4. Ensaios no Cromatógrafo de Partição Centrífuga (CPC)

Os ensaios foram realizados utilizando um equipamento modelo Quattro LabPrep™ CPC (AECS - QuikPrep Ltd., Newquay, Reino Unido). O equipamento possui duas colunas com volumes internos totais (V_C) de 200 mL e 470 mL, com $\omega_{\max} = 800$ rpm. Cada coluna é constituída por um par de rotores opostos, os quais são compostos por três placas de aço inoxidável: interna, externa e central. Entre as placas de aço inoxidável, encontram-se camadas de politetrafluoretileno (PTFE), responsáveis por promover uma vedação de alta pressão. A placa central possui múltiplas câmaras idênticas e interconectadas por dutos, como representado na Figura 2. O volume morto, considerado nos cálculos de hidrodinâmica, foi de 11% do volume da coluna, de acordo com informações fornecidas pelo fabricante.

Para bombeamento das fases, foram utilizadas duas bombas de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa modelo ECP2050 (ECOM, Praga, República Tcheca), com $F_{\max} = 50$ mL/min e pressão máxima de 850 psi. Para a detecção da amostra e coleta das frações, foram utilizados detector UV-Vis TOY 14 DAD e coletor ECF2096, respectivamente, ambos da ECOM (Praga, República Tcheca). Para injeção da amostra foi utilizada uma válvula de injeção manual (modelo Upchurch Injector part number V450).

Figura 2 – Coluna hidrostática do cromatógrafo de partição centrífuga modelo Quattro CPC™ (AECS - QuikPrep Ltd.).



Fonte: o autor.

4.5. Equilíbrio de FE e FM na coluna do CPC

Para todos os ensaios em CPC, optou-se por utilizar V_C de 200 mL, visando menor consumo de solventes e menor tempo de execução dos ensaios. Antes do início de cada ensaio, foi realizado primeiramente o equilíbrio da coluna com FE e FM. O preenchimento de FE foi realizado utilizando-se as duas bombas de fluxo disponíveis, em 80 mL/min (40 mL/min em cada bomba), com $\omega = 100 \pm 3$ rpm, e no modo de operação, ascendente ou descendente, a ser utilizado no ensaio. O fluxo de FE foi realizado com a válvula injetora de amostra na posição *inject*, a qual permite a passagem de FE pelo *loop* e expulsão da fase contida anteriormente.

Para garantir o preenchimento completo da coluna com FE, o fluxo foi realizado até que a linha de base do cromatograma no CPC permanecesse constante, totalizando a injeção de um volume de FE de, aproximadamente, 1,8 a 2,2 vezes do V_C , equivalente à injeção de 360 mL a 440 mL. Após finalizado o preenchimento de FE, foi realizado o preenchimento de FM com ω e F específicos de cada ensaio e com a válvula injetora de amostra na posição *load*, na qual não existe passagem de FM pelo *loop*.

Ao final dos ensaios de hidrodinâmica, em que não houve injeção de qualquer amostra, as fases coletadas foram analisadas quanto à μ e ρ . Estes valores foram comparados com os valores inicialmente obtidos na caracterização do sistema em escala laboratorial. Quando obtidos valores com desvio padrão menor que 5%, as fases foram separadas novamente em funil de separação e reutilizadas em ensaios posteriores.

4.6. Estudo de hidrodinâmica da pressão de retorno

A pressão de retorno do CPC foi avaliada em função dos parâmetros operacionais (F , ω e modo de operação) através de duas séries de ensaios experimentais. Para uma primeira compreensão do funcionamento do CPC, a primeira série de ensaios avaliou o efeito exercido na pressão de retorno devido ao escoamento de soluções aquosas dos diferentes componentes formadores dos SAB. Para o SAB mais apropriado, uma segunda série de ensaios foi realizada de forma a avaliar o efeito dos parâmetros operacionais na pressão de retorno devido ao escoamento de FM por FE, ou seja, considerando nesta série a pressão exercida na coluna contendo as duas fases imiscíveis em equilíbrio.

4.6.1. Pressão de retorno de soluções aquosas dos componentes formadores dos SAB

Nestes ensaios foram utilizadas soluções aquosas de diferentes concentrações dos seguintes componentes: PPG-400 (10, 20, 40 e 60 %(m/m)), [Ch]Cl (10, 20, 30 e 40 %(m/m)), K_3PO_4 (10, 20 e 30 %(m/m)), e etanol (10, 20, 30 e 40 %(m/m)). A influência do fluxo da solução na pressão de retorno foi avaliada variando-se o fluxo de 5 a 40 mL/min, enquanto ω foi fixado em 0 rpm. Para avaliar o efeito ω na pressão de retorno, de 0, 200, 400 a 600 rpm, utilizou-se fluxos de solução iguais a 5, 15 e 30 mL/min. Uma vez que só há diferença entre os modos ascendente e descendente quando duas fases líquidas e imiscíveis estão presentes, neste primeiro estudo o modo de operação descendente foi selecionado para todos os ensaios de forma aleatória.

Nestes ensaios, a coluna do CPC foi primeiramente preenchida com a solução do componente formador de SAB a ser analisado e no modo de operação escolhido. Após completo preenchimento da coluna, o CPC foi ajustado com os valores de fluxo da solução e ω de trabalho. Após iniciado o fluxo da solução aquosa (mesma solução contida na coluna), a pressão indicada pelas bombas foi registrada a cada 2 min ao longo de 100 min de análise.

4.6.2. Pressão de retorno do SAB K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O

Nesta etapa, a influência na pressão de retorno em função da variação de F e ω , e dos modos de operação, *i.e.*, ascendente e descendente, foi avaliada para o SAB constituído por K_2HPO_4 , etanol e H_2O . Para tal, a coluna foi primeiramente preenchida com FE (fase fundo rica em K_2HPO_4 no modo ascendente ou fase topo rica em etanol no modo descendente), seguindo um procedimento idêntico ao descrito na Seção 4.5. Os parâmetros operacionais foram então ajustados para avaliar: i) o efeito de F , através da variação de F de 2, 4, 6, 8 e 10 mL/min,

para um valor fixo de $\omega = 400$ rpm; ii) o efeito de ω , através da variação de ω em 200, 400, 600 e 800 rpm, para $F = 2$ mL/min. Após o início do fluxo de FM ($t = 0$ min), a pressão indicada pelas bombas foi registrada a cada 2 min ao longo de 100 min de análise, de forma similar aos ensaios anteriores.

4.7. Estudo de hidrodinâmica da retenção de fase estacionária (S_F)

A S_F , valor que mede a quantidade de FE retida na coluna após atingido o equilíbrio com FM, foi determinada para o SAB K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O , em função de F , ω e do modo de operação (ascendente ou descendente). A determinação foi realizada pelo método volumétrico, descrito por Ito (2005). Neste método, o volume de FE deslocado da coluna, devido à passagem de FM, é coletado em uma proveta até que o equilíbrio entre as fases seja atingido, o qual pode ser verificado através da saída apenas de FM da coluna e consequentemente, da estabilização do volume de FE na proveta.

O procedimento de preenchimento da coluna com a FE, seguido pelo início do fluxo de FM, foi realizado de maneira idêntica aos ensaios anteriores. Os valores de F e ω foram ajustados de acordo com os limites de pressão obtidos nos estudos de hidrodinâmica da pressão de retorno. O efeito da variação de F em S_F foi analisado para F de 1 a 10 mL/min, em valor intermediário de ω , de 400 rpm. Para avaliar o efeito da variação de ω , variou-se ω para 200, 400, 600 e 800 rpm, para F crescentes de 1, 2, 3 e 6 mL/min. O efeito da variação de F e ω na S_F foi avaliado em todos os ensaios nos modos de operação ascendente e descendente.

Embora o escoamento de FE da coluna praticamente finalize após atingido o equilíbrio hidrodinâmico com FM, existem pequenas quantidades de FE que ainda continuam a ser eliminadas da coluna. Por esta razão, fixou-se um tempo de 150 min para todos os ensaios, independentemente do tempo em que o equilíbrio das fases na coluna foi alcançado. S_F foi determinada de acordo com Schwienheer *et al.* (2015), utilizando a Equação 5:

$$S_F = \frac{V_C + V_D - V_M}{V_C} \quad \text{Eq. 5}$$

onde, V_C e V_D correspondem, respectivamente, ao volume da coluna e volume morto. V_M corresponde ao volume de FM no interior da coluna, o qual é equivalente ao volume de FE coletado na proveta.

PARTE II – Análise de partição de biomoléculas utilizando SAB em CPC

4.8. Determinação do coeficiente de partição (K_D) de solutos-modelo

Para o SAB que apresentou o perfil de hidrodinâmica mais adequado para aplicação em CPC, isto é, composto por (%m/m) 19,5 K_2HPO_4 + 19,5 Etanol + 61,0 H_2O , foi realizada uma triagem de partição de solutos-modelo para avaliar a partição destes solutos no CPC. Nesta triagem, foi realizada uma busca por solutos com K_D preferencialmente o mais próximo de 1, ou na faixa adequada de aplicação no CPC, *i.e.*, de 0,25 a 16. Para tal, foram determinados os valores de K_D , em escala laboratorial (sistemas de massa total 5 g ou 10 g), para os seguintes solutos (com concentrações definidas de acordo com suas solubilidades em água): proteína verde fluorescente (GFP - 10 %(m/m)); albumina de soro bovino (BSA - 0,5 %(m/m)); ácido gálico (0,6 %(m/m)); corante produzido por cultivo submerso de *Talaromyces amestolkiae* (5 %(m/m)); corantes verde malaquita ($C_{23}H_{25}ClN_2$ - 2 %(m/m)), verde brilhante SF ($C_{37}H_{34}N_2O_9S_3Na_2$ - 0,4 %(m/m)) e vermelho de fenol ($C_{19}H_{14}O_5S$ - 0,4 %(m/m)). Para L-tirosina, ácido p-cumárico e ácido trans-ferúlico, a partição foi realizada em sistema contendo 61%(m/m) de solução a 0,1 g/L, e para riboflavina comercial contendo 40% (m/m) de solução 0,1 g/L.

Após pesagem dos componentes, os sistemas foram deixados em equilíbrio por 30 min e centrifugados por 15 min a 5000 xg , de forma a garantir a completa separação das fases. As fases foram cuidadosamente separadas e analisadas quanto à absorbância UV-Vis em leitor de microplaca Infinite M200PRO - RChisto®, para riboflavina, e leitor EnSpire Alpha Plate Reader – PerkinElmer® para os demais solutos. A GFP foi quantificada pela leitura da fluorescência em espectrofluorofotômetro RF-6000 - SHIMADZU® (Excitação = 488 nm; Emissão = 510 nm). Todas as leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de absorbância máxima (λ_{max}), os quais foram determinados por análise de varredura prévia para cada soluto.

Para determinação de K_D de L-tirosina, ácido gálico, GFP e riboflavina, foram determinadas as curvas de calibração e utilizada a Eq. 6 (ASENJO e ANDREWS, 2011):

$$K_D = \frac{C_T}{C_F} \quad \text{Eq. 6}$$

onde, C_T = concentração do soluto na fase de topo e C_F = concentração do soluto na fase de fundo. Para os demais solutos, o K_D foi determinado em função dos valores de absorbância, pela Eq. 7, onde A_T = absorbância do soluto na fase de topo, e A_F = absorbância do soluto na fase de fundo.

$$K_D = \frac{A_T}{A_F} \quad \text{Eq. 7}$$

4.9. Estudo de partição de solutos-modelo em CPC utilizando SAB

Após avaliação em escala laboratorial dos valores de K_D , os solutos que se mostraram mais adequados para aplicação em CPC foram selecionados para os ensaios de partição/separação no SAB K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O . Para este estudo, ensaios de partição de L-tirosina, riboflavina e ácido gálico foram realizados individualmente, além de um ensaio de separação de ácido gálico e ácido vanílico. Para todos os ensaios foi realizado primeiramente o equilíbrio da coluna com FE e FM (conforme procedimento descrito na seção 4.5), seguido da injeção da amostra e coleta das frações resultantes do ensaio. Os parâmetros operacionais utilizados no CPC foram selecionados de acordo com os estudos prévios de hidrodinâmica (pressão de retorno e S_F).

O modo de operação foi selecionado com base no K_D do soluto de cada ensaio. Dado que K_D é a relação da concentração do soluto na FE sobre sua concentração na FM, e que no modo ascendente FE = fase de fundo/ FM = fase de topo, e no modo descendente FE = fase de topo/ FM = fase de fundo, selecionou-se o modo de operação que resultasse em K_D dentro da faixa de aplicação do CPC (0,25 – 16,0) e que possibilitasse menor tempo de ensaio e consumo de solventes. As condições específicas utilizadas em cada ensaio estão descritas abaixo.

- O estudo de partição do ácido gálico foi realizado em quatro ensaios diferentes, de modo a analisar o efeito da variação de F e concentração da amostra. O modo de operação utilizado foi o descendente e $\omega = 600$ rpm. As amostras injetadas consistiram em 20 mL da fase fundo do SAB K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O , contendo 61,0 %(m/m) de solução aquosa de ácido gálico a 0,25 g/L ou 0,50 g/L. Para estas concentrações de solução, a concentração total de ácido gálico no SAB foi de, respectivamente, 0,1525 g/L e 0,3050 g/L. As condições operacionais utilizadas neste ensaio estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros operacionais (fluxo de fase móvel, velocidade de rotação da coluna, modo de operação e concentração do soluto) empregados nos ensaios de partição de ácido gálico em CPC, utilizando o sistema aquosos bifásico K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O .

Ensaio	F (mL/min)	ω (rpm)	Modo de operação	Concentração de ácido gálico no SAB (g/L)
1	2	600	Descendente	0,1525
2	2	600	Descendente	0,3050
3	1	600	Descendente	0,3050
4	4	600	Descendente	0,3050

Fonte: o autor.

- Além do ensaio de partição individual do ácido gálico, foi realizado um estudo de separação dos ácidos gálico e vanílico. A separação foi realizada em modo de operação descendente, $\omega = 400$ rpm e $F = 3$ mL/min. A amostra injetada consistiu em 0,5 g/L de ácido gálico e 0,5 g/L de ácido vanílico solubilizados em 20 mL da FM (equivalente à fase de fundo no modo de operação descendente).
- No ensaio de partição de L-tirosina, foi utilizado o modo de operação ascendente, $F = 2$ mL/min e $\omega = 600$ rpm. A amostra injetada consistiu em 20 mL da fase de topo do SAB K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O , contendo 61,0 %(m/m) de solução aquosa de L-tirosina 0,35 g/L (concentração definida de acordo a solubilidade máxima em água).
- No ensaio de partição da riboflavina foi utilizado o modo de operação descendente, $F = 3$ mL/min e $\omega = 600$ rpm. Neste caso, foram realizados dois ensaios variando a amostra injetada. No primeiro ensaio, a amostra consistiu em 5 mL da fase fundo do SAB K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O contendo 40,0 %(m/m) de solução aquosa de riboflavina 0,1 g/L, enquanto no segundo ensaio, 5 mL da solução de riboflavina 0,1 g/L foram diretamente injetados no CPC.

PARTE III – Análise de partição de biomoléculas utilizando sistema aquoso-orgânico em CPC

4.10. Estudo de partição de soluto em CPC utilizando um sistema bifásico aquoso-orgânico

Para avaliar a performance do Quattro LabPrepTM CPC aplicando sistemas aquosos-orgânicos (tradicionalmente utilizados em CPC), foi selecionado o sistema (% v/v) 25,0 Etanol + 25,0 Acetona + 25,0 Hexano + 25,0 H_2O para ser aplicado em ensaios de partição/separação

dos carotenoides comerciais astaxantina e β -caroteno. Este ensaio teve como objetivo obter uma análise qualitativa da separação dos solutos, e confirmar a adequabilidade dos parâmetros operacionais utilizados (inferidos a partir do estudo prévio de hidrodinâmica de SAB) na performance do equipamento.

Primeiramente, um estudo de partição dos solutos em escala laboratorial foi realizado, determinando-se o K_D de cada soluto em sistemas de 5 mL, contendo 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de astaxantina e 0,05 mg/mL de β -caroteno. Os sistemas foram deixados em equilíbrio por 4 horas a 25 °C, e depois centrifugados por 10 min em 2000 rpm, em centrífuga modelo L – 1215 (MENDEL Science And Health Ltda.). Após alcançado o equilíbrio, as fases foram separadas com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e analisadas quanto à absorbância UV-Vis em espectrofotômetro UV-Vis Genesys 10S (Thermo Fisher®), em $\lambda_{\text{máx}}$, de acordo com o perfil de varredura dos solutos (300 nm a 600 nm). O valor de K_D foi determinado utilizando as Eq. 6 e Eq.7.

O ensaio em CPC foi realizado em modo de operação ascendente (FM = fase de topo; FE = fase de fundo), $\omega = 700$ rpm e $F = 2$ ml/min. Após equilíbrio hidrodinâmico de FE e FM na coluna, descrito na seção 4.5, o valor de S_F foi determinado e a amostra injetada. A amostra consistiu em 0,025 mg/mL de astaxantina e 0,025 mg/mL de β -caroteno comerciais, solubilizados em 10 mL de hexano/acetona (1:1, v/v).

Por motivo de falhas técnicas no detector UV-Vis do CPC, não foi possível realizar a visualização dos picos correspondentes pela análise do cromatograma. No entanto, devido às cores características dos carotenoides, de tom mais amarelado para β -caroteno e alaranjado para astaxantina, foi possível identificar e coletar as frações correspondentes mais concentradas de ambos compostos. Após a coleta dessas frações, as respectivas composições foram determinadas por varredura, de 300 nm a 600 nm, no espectrofotômetro UV-Vis Genesys 10S (Thermo Fisher®).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I – Estudo da hidrodinâmica de sistemas aquosos bifásicos (SAB)

5.1. Caracterização e seleção do SAB para aplicação em CPC

Os SAB e sistemas aquosos-orgânicos são técnicas já bem estabelecidas e altamente eficazes na partição de uma grande diversidade de compostos (HATTI-KAUL, 2010). A associação destes sistemas líquido-líquido à técnica de CPC resulta em uma poderosa tecnologia preparativa de separação e purificação de produtos naturais, enantiômeros e outros produtos biotecnológicos (BUTTENBENDER *et al.*, 2018; LORÁNTFY *et al.*, 2020). No entanto, os SAB possuem, em geral, características como baixos valores de tensão interfacial (γ) e diferença de densidade entre as fases ($\Delta\rho$) e elevadas viscosidades (μ), que resultam em problemas na pressão de retorno e em S_F . Estes problemas, por sua vez, influenciam a eficiência de separação e limitam as condições operacionais aplicadas ao equipamento, levando a um aumento do grau de dificuldade ou até mesmo inviabilização da aplicação destes sistemas em CPC (BEZOLD *et al.*, 2015). Em razão disto, previamente à sua aplicação em CPC, é necessário que se conheça as propriedades físico-químicas das fases do sistema, as quais foram caracterizadas na primeira etapa deste trabalho.

Os SAB baseados em cloreto de colina ([Ch]Cl), nomeadamente, [Ch]Cl/sal e [Ch]Cl/polímero, selecionados para este estudo, foram escolhidos com base em resultados prévios do grupo de pesquisa, relativos à purificação das proteínas *Green Fluorescent Protein* (GFP, uma proteína fluorescente amplamente utilizada como biomarcador e biosensor) (DOS SANTOS *et al.*, 2018) e L-asparaginase (ASNase, enzima utilizada, principalmente, no tratamento de leucemia linfoblástica aguda) (MAGRI *et al.*, 2020).

O SAB etanol/sal, por sua vez, foi escolhido por apresentar propriedades distintas dos tradicionais SAB, normalmente compostos de polímeros e sais, como menores μ das fases em equilíbrio e baixo t_s , além de menor custo e impacto ambiental. Além disto, estes sistemas têm sido utilizados com sucesso na separação de uma série de biomoléculas, como cartamina e alfainterferona-2b (TOLEDO *et al.*, 2019; FARIAS *et al.*, 2020).

Assim, visando identificar os SAB com características mais favoráveis a aplicação em CPC, foram determinadas algumas propriedades físico-químicas das fases de topo e fundo dos sistemas K_3PO_4 / [Ch]Cl/ H_2O , K_2HPO_4 / [Ch]Cl/ H_2O , PPG-400/ [Ch]Cl/ H_2O e K_2HPO_4 / Etanol/ H_2O , as quais estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas (determinadas a 25°C) das fases topo e de fundo dos SAB K₃PO₄/ [Ch]Cl/ H₂O, K₂HPO₄/ [Ch]Cl/ H₂O, PPG-400/ [Ch]Cl/ H₂O e K₂HPO₄/ Etanol/ H₂O.

	V (ml)	m(g)	pH	σ (mS/cm)	Teor de água (% v/v)	IR	ρ (g/cm³)	μ (mPa.s)	γ (dyn/cm)
	25% (m/m) K ₃ PO ₄ + 30% (m/m) [Ch]Cl + 45% (m/m) H ₂ O								
Topo ([Ch]Cl)	5,9	6,2367	12,80	670,0	48,85	1,418	1,1280	5,2041	-
Fundo (K ₃ PO ₄)	2,3	3,2969	12,14	1.112,0	52,47	1,415	1,4857	9,5592	
	27,5% (m/m) K ₂ HPO ₄ + 27,5% (m/m) [Ch]Cl + 45% (m/m) H ₂ O								
Topo ([Ch]/Cl)	4,8	5,2104	10,26	657,3	47,33	1,418	1,0890	5,4395	-
Fundo (K ₂ HPO ₄)	3,0	4,2704	10,18	971,5	41,96	1,415	1,5188	11,4525	
	45% (m/m) PPG-400 + 25% (m/m) [Ch]Cl + 30% (m/m) H ₂ O								
Topo (PPG-400)	4,6	4,3160	3,71	32,6 x 10 ⁻³	14,34	1,441	1,0209	70,8180	-
Fundo ([Ch]/Cl)	5,0	5,1430	3,34	741,8	53,35	1,412	1,0588	3,6576	
	19,5% (m/m) K ₂ HPO ₄ + 19,5% (m/m) Etanol + 19,5% (m/m) H ₂ O								
Topo (Etanol)	9,7	9,3856	9,97	49,3	66,11	1,359	0,9608	2,5642	31,78
Fundo (K ₂ HPO ₄)	7,9	10,2905	9,64	1.252,0	67,03	1,387	1,3162	3,9237	

Fonte: o autor.

Nota 1: V = volume; m = massa; σ = condutividade; IR = índice de refração; ρ = densidade; μ = viscosidade; γ = tensão interfacial

Nota 2: Incerteza da medição: V (0,1 mL); m (0,0001 g); σ (0,1 mS/cm); IR (0,001); ρ (0,0001 g/cm³); μ (0,0001 mPa.s); γ (0,01 dyn/cm).

Nota 3: Não determinado (-)

Em uma primeira análise dos SAB compostos de [Ch]Cl, *i.e.*, [Ch]Cl/K₃PO₄ e [Ch]Cl/K₂HPO₄, é possível observar que estes apresentam nas fases de fundo (ricas em sal) maiores valores de σ , ρ e μ , relativamente às fases de topo (ricas em [Ch]Cl). Comparativamente aos outros sistemas com etanol ou polímero, os SAB [Ch]Cl/sal apresentam valores intermediários de μ (valor máximo de 11,4525 mPa.s) e as maiores razões volumétricas entre as fases de topo e de fundo (V_{topo}/V_{fundo}), de 2,5 em 25% (m/m) K₃PO₄ + 30% (m/m) [Ch]Cl + 45% (m/m) H₂O e de 1,6 para o sistema de 19,5% (m/m) K₂HPO₄ + 19,5% (m/m) Etanol + 19,5% (m/m) H₂O. Segundo ITO (2005), razões volumétricas próximas de 1, ou seja, volumes

semelhantes de fases topo e fundo, são mais vantajosas para aplicação em CPC, uma vez que uma grande diferença entre os volumes pode acarretar o desperdício de uma das fases em processos de separação em larga escala. Relativamente à escolha do melhor sistema, importa destacar que, ocorreu a formação de precipitado no SAB [Ch]Cl/K₂HPO₄ após algumas horas de equilíbrio e, portanto, este não foi considerado para os ensaios posteriores em CPC.

O SAB [Ch]Cl/PPG-400, por sua vez, teve o PPG-400 concentrado na fase de topo, a qual apresentou menores valores de σ e teor de água, em oposição ao elevado valor de μ (70,8180 mPa.s) resultante da maior concentração do polímero. Por outro lado, este SAB apresentou a menor $\Delta\rho$ (0,0379 g/cm³) e menor razão volumétrica entre as fases ($V_{topo}/V_{fundo} \approx 1$).

O SAB composto de K₂HPO₄/Etanol, apresentou fase de fundo rica em K₂HPO₄ e fase de topo composta majoritariamente por etanol, além de $V_{topo}/V_{fundo} = 1,22$. Dentre todos os SAB analisados, este sistema apresentou os menores valores de μ das fases em equilíbrio ($\mu_{topo} = 2,5642$ mPa.s e $\mu_{fundo} = 3,9237$ mPa.s), aproximadamente, três vezes menor que as viscosidade dos SAB compostos de [Ch]Cl/sal e dezoito vezes menor do que o SAB PPG-400/[Ch]Cl. Menores valores de μ são preferidos para aplicação em técnicas de CCC, visto que fases muito viscosas causam problemas relacionados com limites de pressão do equipamento CPC, transferência de massa e estabilização da FE na coluna (BEZOLD *et al.*, 2015; SCHWIENHEER *et al.*, 2015).

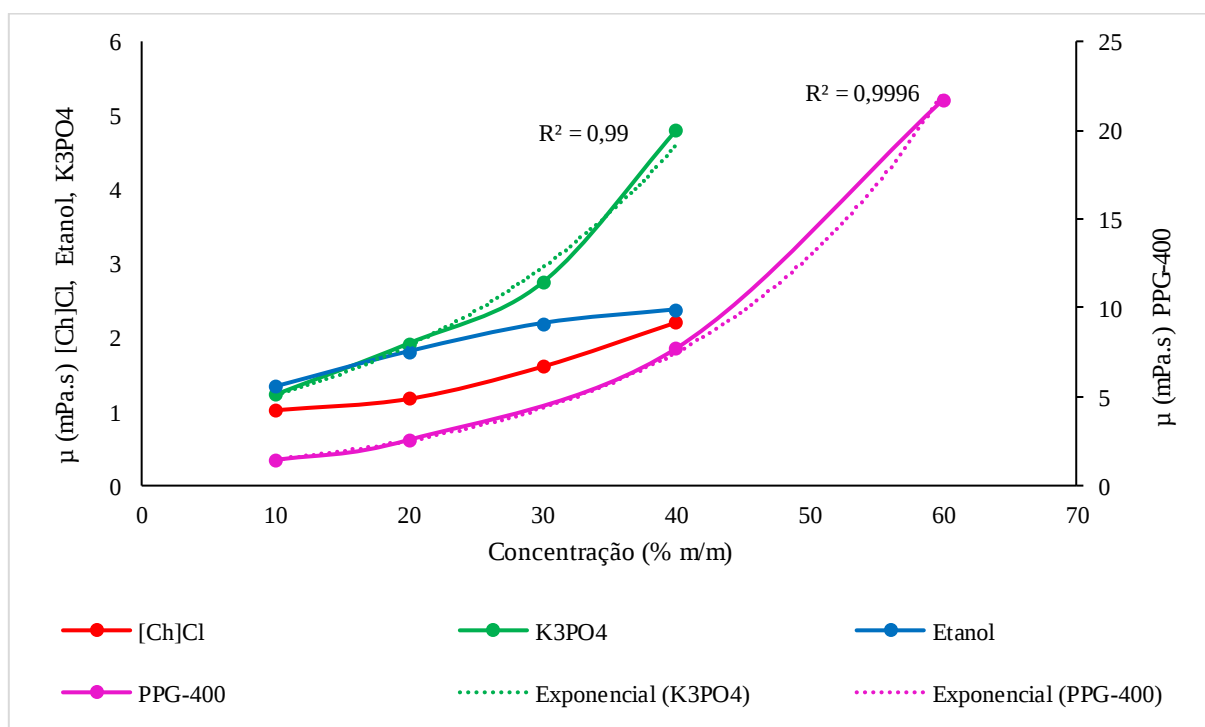
Adicionalmente, em oposição à grande maioria dos SAB, que possuem menor γ e $\Delta\rho$ das fases em equilíbrio (LANGE *et al.*, 2018; PEREIRA e COUTINHO, 2019), o SAB K₂HPO₄/Etanol apresentou valores relativamente elevados para estas duas propriedades, de $\gamma = 31,78$ dyn/cm e $\Delta\rho = 0,3554$ g/cm³. Segundo Bezold *et al.* (2015), elevados valores destas propriedades são desejados para aplicação em CPC, pois baixos valores de γ e $\Delta\rho$, aliados a elevados valores de μ , estão entre os principais fatores responsáveis pela diminuição de S_F nas colunas contracorrentes comercialmente disponíveis. O trabalho de Fedotov e Thiébaud (1998) mostra que valores relativamente altos de $\Delta\rho$, isto é, entre 0,25 e 0,30 g/cm³, favorecem a retenção de FE na coluna.

5.2. Efeito do escoamento de soluções de componentes formadores dos SAB na pressão de retorno do CPC

Dada a importância da pressão de retorno para a viabilidade dos processos de separação em CPC, bem como a influência da μ na pressão de retorno (VAN BUEL *et al.*, 1997), o primeiro estudo de hidrodinâmica foi realizado com o objetivo de analisar o comportamento da

pressão no equipamento Quattro CPC™ (AECS-QuikPrep Ltd.) em função do escoamento de diferentes soluções aquosas compostas pelos principais componentes formadores dos SAB propostos para este projeto. Para tal, soluções aquosas de PPG-400 (10 a 60% m/m), [Ch]Cl (10 a 40% m/m), K₃PO₄ (10 a 30% m/m) e etanol (10 a 40% m/m) foram preparadas e caracterizadas quanto às suas μ , conforme apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Viscosidades (μ) de soluções aquosas de PPG-400, [Ch]Cl e K₃PO₄, a 25°C, em função do aumento da concentração mássica do componente.



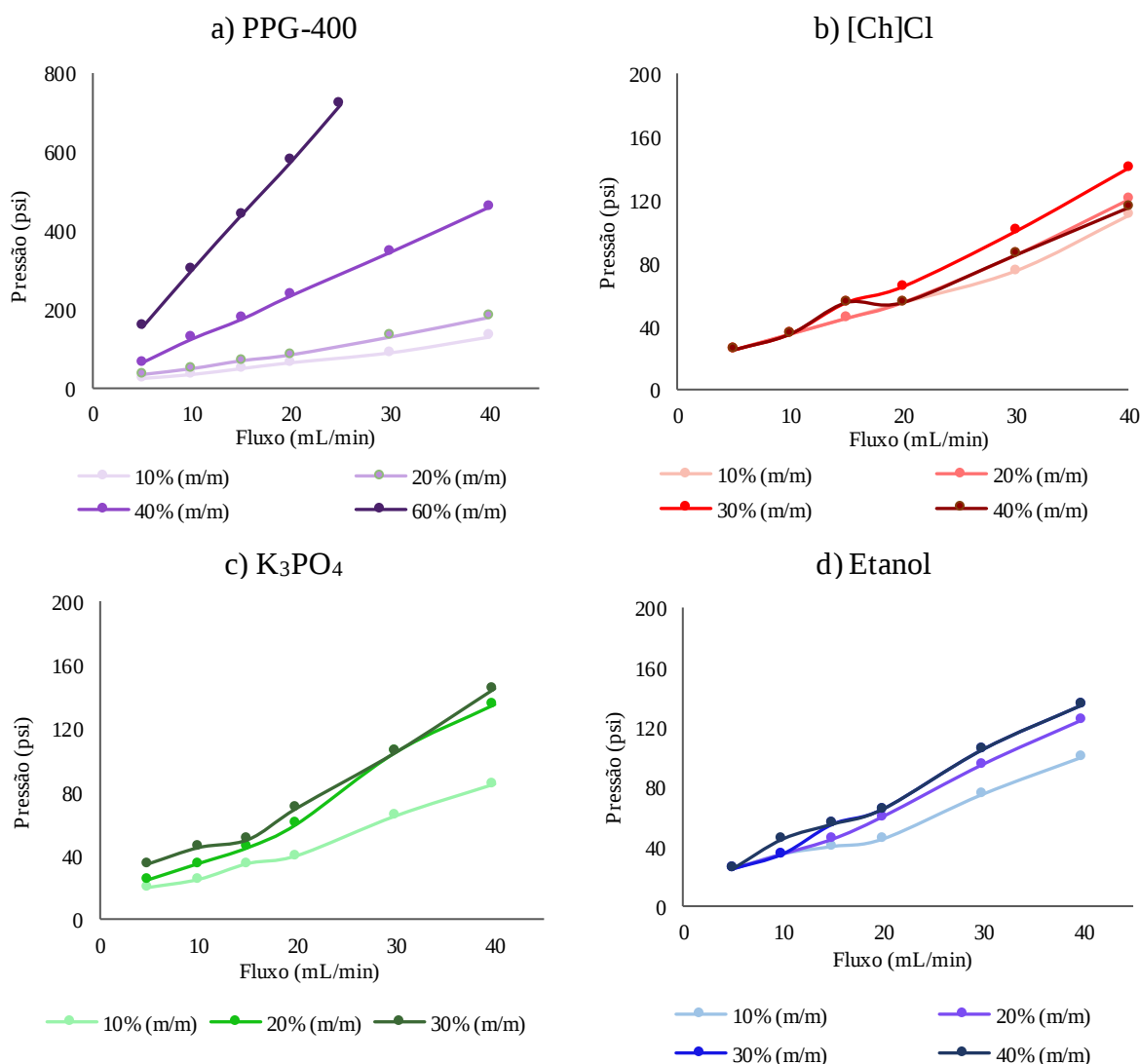
Fonte: o autor.

Pela análise da Figura 3 verifica-se que para todos os componentes de SAB analisados, o aumento da concentração do componente na solução gera um aumento da μ . Entretanto, o aumento da concentração mássica do componente não resulta necessariamente em acréscimo linear da μ . Observa-se que, embora ocorra o aumento da μ , esta variação tem diferentes perfis de acordo com os componentes analisados. Para as soluções de [Ch]Cl, etanol, K₃PO₄ e PPG-400, um incremento da concentração de 10% para 20% provoca um aumento percentual de μ de 15%, 35%, 56% e 79%, respectivamente. Por outro lado, o aumento da concentração de 10% para 40%, resulta em aumento da μ de 116%, 78%, 290% e 437%, respectivamente. Evidencia-se assim, um perfil exponencial do aumento da μ em função da concentração para K₃PO₄ e PPG-400, em relação ao demais componentes. Dentre estes, importa destacar que as soluções poliméricas de PPG-400 apresentam os maiores valores de μ (eixo dos yy da direita), atingindo

21,7 mPa.s na solução 60% (m/m), ao contrário das demais soluções, que nas concentrações analisadas, mantiveram-se abaixo de 5 mPa.s.

Após a análise da μ das soluções dos componentes, foram realizadas duas séries de ensaios para compreender o efeito da μ na pressão de retorno do CPC em função do escoamento das diferentes soluções. Na primeira série de ensaios avaliou-se o efeito da μ na pressão de retorno em função da variação do fluxo da fase, de 5 a 50 mL/min (em $\omega = 0$ rpm), conforme apresentado na Figura 4.

Figura 4 – Pressão de retorno no CPC em função do fluxo de fase para soluções de a) PPG-400, b) [Ch]Cl, c) K_3PO_4 e d) Etanol, sob diferentes concentrações e viscosidades.



Fonte: o autor.

A análise geral da Figura 4 permite observar que, para as soluções aquosas em estudo, a pressão no CPC aumenta de acordo com o fluxo. Em todas as soluções as pressões de retorno

atingiram valores máximos nos maiores fluxos e para as soluções mais concentradas, que correspondem aos maiores valores de μ . Para as soluções de K_3PO_4 30% (m/m), [Ch]Cl 30% (m/m) e etanol 40% (m/m) os valores máximos de pressão ocorrem entre 135 e 145 psi, no maior fluxo testado (40 mL/min).

Uma análise mais detalhada permite observar que as máximas pressões foram atingidas nas soluções de K_3PO_4 e [Ch]Cl nas concentrações de 30% (m/m), e não na maior concentração analisada, de 40% (m/m). O escoamento da solução mais concentrada de K_3PO_4 provoca a formação de bolhas e espuma, inviabilizando sua utilização. A solução aquosa de [Ch]Cl, por sua vez, apresenta um comportamento distinto das demais. Neste caso, a pressão gerada pelo escoamento da solução 30% (m/m) mantém-se superior a pressão gerada pela solução 40% (m/m), em fluxos maiores que 15 mL/min.

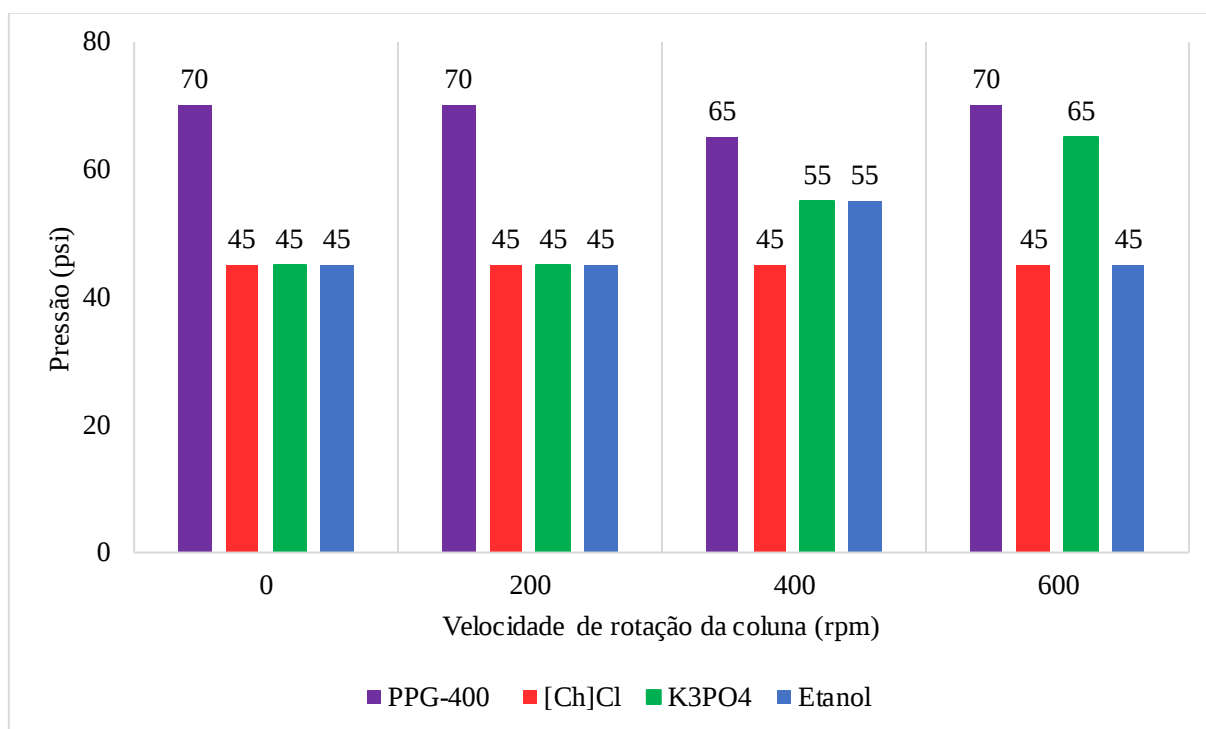
No caso da solução de PPG-400, a pressão máxima atingida é de 720 psi na concentração de 60% (m/m) e fluxo de 25 mL/min. Para esse componente, o aumento da pressão em relação ao fluxo da solução é tão maior quanto maior for a concentração de polímero, como demonstrado pelos diferentes coeficientes angulares apresentados. Por exemplo, para a concentração de PPG-400 60% (m/m), o aumento do fluxo de 10 mL/min para 15 mL/min, resulta em um aumento na pressão de 140 psi, ao passo que para soluções menos concentradas, 40% (m/m) e 20% (m/m), o mesmo aumento de fluxo leva a um acréscimo na pressão de 50 psi e 20 psi, respectivamente. Nota-se ainda que a solução de PPG-400 60% (m/m) só pode ser utilizada em fluxos de até 25 mL/min, uma vez que fluxos maiores ultrapassam a pressão limite das bombas (850 psi), provocando vazamentos no CPC. Os resultados obtidos com as soluções de PPG-400 são de certo modo esperados devido aos elevados valores de μ destas soluções, os quais são consideravelmente superiores aos das soluções aquosas salinas.

A relação entre o aumento da μ e o aumento da pressão no CPC está de acordo com estudos anteriores, os quais realçam uma maior preocupação na aplicação de SAB em cromatografias contracorrente, em razão dos maiores valores de μ das fases em equilíbrio apresentadas por estes sistemas em relação aos sistemas aquosos-orgânicos (OELMEIER *et al.*, 2012).

A análise conjunta da Figura 3 e Figura 4 mostra a influência das concentrações dos agentes formadores do SAB na pressão gerada no CPC, em particular para soluções poliméricas mais viscosas. No entanto, estes ensaios avaliaram o impacto da variação do fluxo e μ das soluções, mas na ausência de rotação da coluna ($\omega = 0$ rpm). Portanto, de forma analisar o comportamento da pressão com o aumento de ω , soluções aquosas (20% m/m) de PPG-400, [Ch]Cl, K_3PO_4 e etanol foram injetadas a um fluxo constante de 15 mL/min, em modo

descendente, para $\omega = 0, 200, 400$ e 600 rpm. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Pressão de retorno no CPC em função da velocidade de rotação da coluna (ω) de soluções aquosas 20% (m/m) de PPG-400, [Ch]Cl, K_3PO_4 e etanol, em modo descendente e fluxo de fase de 15 mL/min.



Fonte: o autor.

A Figura 5 mostra que para as soluções de [Ch]Cl, PPG-400 e etanol, em condições constantes de concentração da solução e fluxo de fase, a variação de ω de 0 a 600 rpm não provocou uma alteração considerável na pressão gerada no CPC. A solução aquosa de K_3PO_4 , por sua vez, apresentou um aumento de pressão de 20 psi quando aumentada a ω de 0 a 600 rpm. No entanto, em termos comparativos, este aumento de pressão devido ao aumento de ω é ainda inferior aos obtidos pela variação do fluxo de fase para as soluções de K_3PO_4 . Destaca-se ainda que esta variação de 20 psi na pressão encontra-se dentro da amplitude de variação das bombas do CPC, a qual apresenta uma variação de até 20 psi em condições de ausência de rotação da coluna ou em fluxo de fase constante.

A seleção do SAB mais adequado para aplicação em CPC deve ter como base uma análise conjunta dos valores de γ , $\Delta\rho$ e μ (ADELMANN e SCHEMBECKER, 2011). Desse modo, apesar dos SAB [Ch]Cl/ K_3PO_4 , [Ch]Cl/ K_2HPO_4 e [Ch]Cl/PPG-400 terem apresentado excelentes eficiências de extração para a enzima L-asparaginase em escala laboratorial

(eficiências de extração de até 100%) (MAGRI *et al.*, 2020), para os ensaios em CPC foi escolhido utilizar SAB com menores valores de μ nas fases, com V_{topo}/V_{fundo} próximas de 1 e maiores valores de γ e $\Delta\rho$. Além disto, a escolha do SAB também considerou os resultados dos efeitos de soluções aquosas de agentes formadores de SAB na pressão de retorno do CPC. Portanto, nas etapas de estudo da hidrodinâmica do SAB no CPC foi utilizado o sistema de composição (%m/m): 19,5 K₂HPO₄ + 19,5 Etanol + 19,5 H₂O.

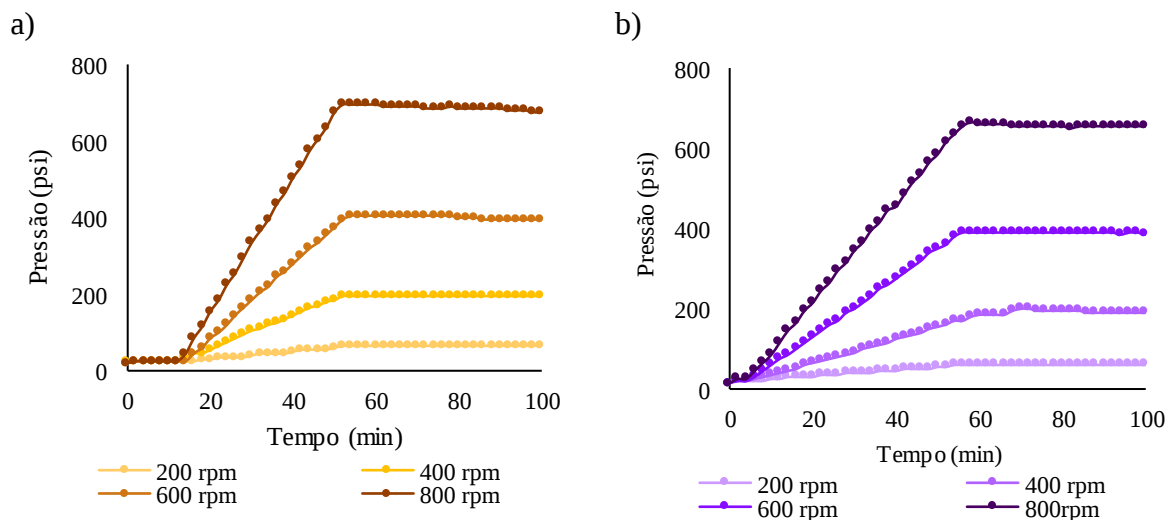
5.3. Estudo da hidrodinâmica no CPC utilizando o SAB K₂HPO₄/Etanol

Diante do exposto na seção anterior, optou-se por seguir os testes de hidrodinâmica no CPC utilizando o SAB que apresentou menores valores de μ das fases em equilíbrio, *i.e.*, o SAB K₂HPO₄/Etanol/H₂O ($\mu_{topo} = 2,5642$ mPa.s; $\mu_{fundo} = 3,9237$ mPa.s). Este estudo visou avaliar o efeito dos parâmetros operacionais (modo de operação, ω e F) nas duas variáveis hidrodinâmicas de maior importância na CPC, *i.e.*, pressão de retorno e S_F .

5.3.1. Pressão de retorno

A pressão de retorno gerada pelo escoamento das fases apresenta-se como um dos principais fatores limitantes na seleção das condições operacionais em uma separação por CPC. Os parâmetros operacionais que afetam a pressão de retorno, e por consequência a viabilidade da separação, foram analisados separadamente neste estudo. A Figura 6 mostra o efeito exercido na pressão de retorno do CPC, nos modos ascendente e descendente, em função ω .

Figura 6 – Pressão de retorno no CPC em função da velocidade de rotação da coluna (ω) para K₂HPO₄/Etanol/H₂O em $F = 2$ mL/min, nos modos ascendente (a) e descendente (b).



Fonte: o autor.

Nota: ascendente: FE = K₂HPO₄ e FM = Etanol; descendente: FE = Etanol e FM = K₂HPO₄.

A análise da Figura 6 mostra que, diferentemente do observado para as soluções aquosas dos agentes formadores dos SAB, o escoamento das fases de topo e de fundo do SAB apresenta uma relação direta entre ω (a qual permite a manutenção da FE) e a pressão de retorno no CPC. Observa-se também que o perfil de comportamento da pressão com a variação de ω é semelhante para ambos os modos de operação, ascendente e descendente.

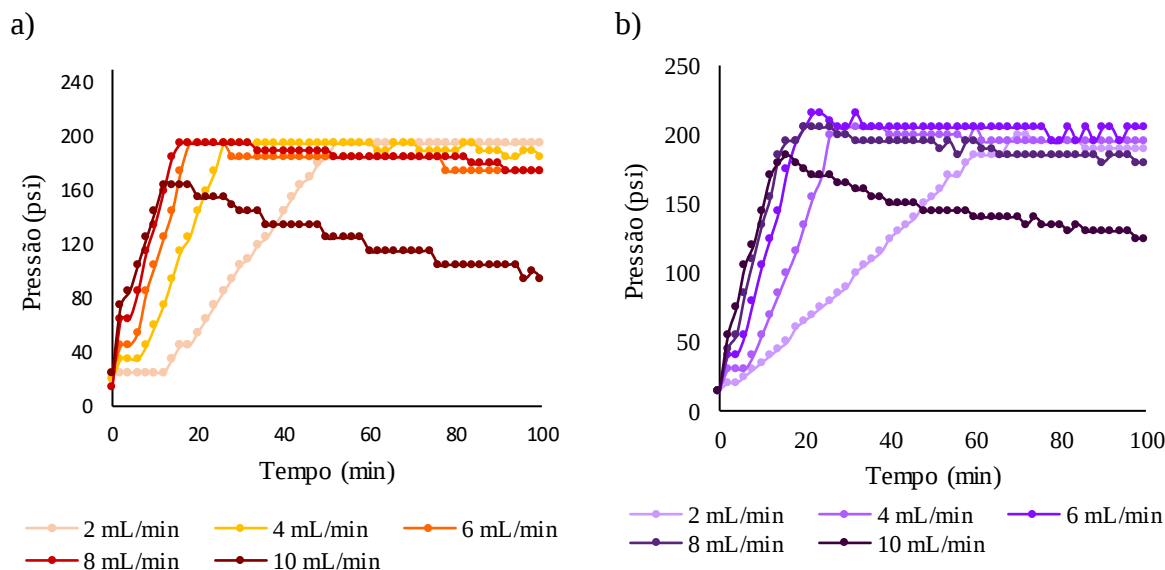
Para todas as ω analisadas (200, 400, 600 e 800 rpm), a pressão começa a aumentar linearmente após 10 min, correspondente ao momento em que a FM encontra a FE na coluna. O aumento linear da pressão ocorre até 50 min, aproximadamente, período em que a FE sai de forma constante da coluna devido à passagem da FM. Após este período, a pressão atinge seu ponto máximo, cujo valor varia de acordo com ω aplicada. A partir deste ponto, a pressão do CPC atinge uma estabilização, correspondente ao momento em que as fases de topo e fundo alcançam o equilíbrio dentro da coluna (FUMAT *et al.*, 2016).

Os valores de pressão mostram um expressivo acréscimo com o aumento da ω , o qual é superior para as ω mais elevadas. Por exemplo, para ambos os modos de operação, quando se aumenta a ω de 200 para 400 rpm, ocorre um aumento de pressão de aproximadamente 130 psi. Por outro lado, quando o aumento ocorre de 400 para 600 rpm, a pressão tem um aumento maior, equivalente a 200 psi. Seguindo o esperado, o aumento de ω de 600 para 800 rpm (limite máximo de ω no equipamento) resulta em um aumento da pressão de cerca de 285 psi.

Os resultados mostram também que a operação do CPC a uma ω de 800 rpm e com um F moderado de 2 ml/min, gera uma pressão muito próxima ao limite máximo do equipamento (850 psi). Este resultado confirma que a aplicação de F elevados pode ser impossibilitada para sistemas utilizando solvente semelhantes.

De forma equivalente, conforme apresentado na Figura 7, foi avaliado o efeito de F na pressão de retorno do CPC. Para este estudo, foi utilizado $\omega = 400$ rpm, que, como mostrado na Figura 6, apresenta valores intermediários de pressão, possibilitando a utilização de maiores valores de F , sem que o limite máximo de pressão do CPC seja atingido.

Figura 7 – Pressão de retorno em função do fluxo de fase móvel (F) para K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O em $\omega = 400$ rpm, nos modos ascendente (a) e descendente (b).



Fonte: o autor.

Nota: ascendente: FE = K_2HPO_4 e FM = Etanol; descendente: FE = Etanol e FM = K_2HPO_4 .

Diferente do que foi observado com a variação de ω , o aumento de F , de 2 mL/min a 8 mL/min, não afetou expressivamente a pressão de retorno gerada no CPC, a qual se manteve próxima dos 200 psi ao longo dos 100 min de ensaio, para ambos os modos de operação. Um comportamento semelhante da pressão em relação à variação de F foi observado por Adelman *et al.* (2013), que estudaram a seleção de parâmetros operacionais com base na hidrodinâmica do CPC. Segundo os autores, a pressão total no CPC é formada pela soma de uma contribuição hidrodinâmica, dependente de F e μ , e de uma contribuição hidrostática, dependente de S_F e $\Delta\rho$. A menor dependência da pressão em relação à variação de F ocorre porque o aumento da contribuição hidrodinâmica na pressão (com aumento de F) é anulado pela diminuição da contribuição hidrostática (diminuição de S_F com aumento de F).

A Figura 7 permite verificar também que quando utilizado F de 10 mL/min, o platô de pressão mantém-se inferior aos platôs dos demais fluxos, os quais mantêm-se abaixo de 200 psi. Neste caso, por volta de 15 min, a pressão passa a decrescer de forma relativamente acentuada, atingindo-se valores de 95 e 125 psi, no modo ascendente e descendente, respectivamente. Isto ocorre porque o elevado valor de F pode resultar em uma passagem muito rápida da FM pela FE, não permitindo tempo suficiente para que as fases entrem em contato e se separem adequadamente, levando a um maior arraste da FE pela FM e impossibilitando o equilíbrio das fases no interior da coluna.

Por último, pelos resultados constata-se também que os diferentes valores de F resultam em diferentes tempos de equilíbrio de fases na coluna, os quais são indicados pelo platô de pressão que as curvas atingem no gráfico. Esta variação, também observada por Peng *et al.* (2018), ocorre de forma inversamente proporcional, de modo que quanto maior é o F , menor é o tempo necessário para que as fases atinjam o equilíbrio. Por exemplo, quando duplicado F de 2 mL/min para 4 mL/min, o tempo de equilíbrio reduz pela metade, aproximadamente, de 52 min para 26 min no modo ascendente e de 60 min para 26 min no modo descendente. Da mesma forma, quando triplicado F de 2 mL/min para 6 mL/min, o tempo de equilíbrio reduz para, aproximadamente, 1/3 do valor, ou seja, de 52 min para 18 min no modo ascendente e 60 min para 22 min no modo descendente. Estes resultados mostram a possibilidade de utilizar maiores valores de F , e assim diminuir o tempo de equilíbrio, e consequentemente, o tempo do processo de separação, sem causar um aumento excessivo da pressão interna do CPC.

5.3.2. Retenção de fase estacionária (S_F)

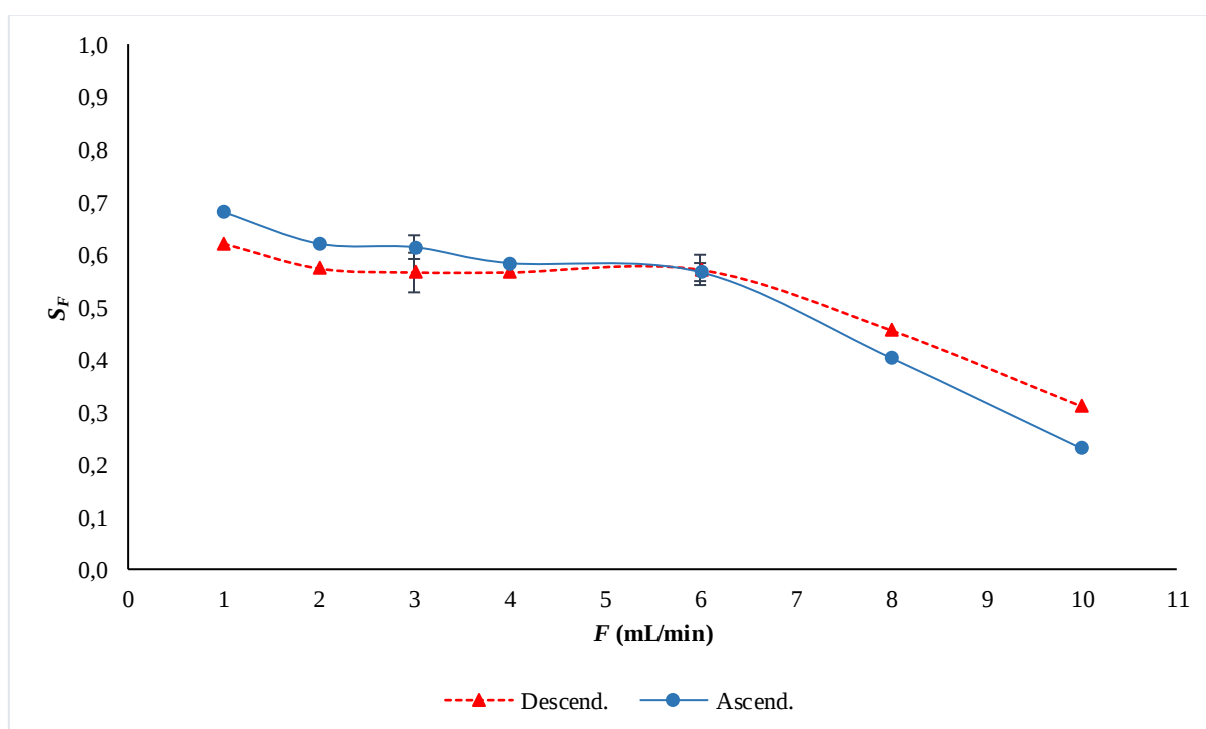
A S_F é a variável que mede a quantidade de FE retida na coluna após equilíbrio com a FM. Assim como a pressão de retorno, a determinação de S_F em equipamentos de cromatografia contracorrente é de extrema importância para o entendimento da hidrodinâmica das fases líquidas do sistema empregado. O volume de FE que permanece na coluna em equilíbrio é influenciado pelas características físicas da coluna, parâmetros operacionais aplicados ao processo de separação e propriedades físicas das fases do sistema bifásico (ADELMANN e SCHEMBECKER, 2011; ROEHRER *et al.*, 2016).

As propriedades físicas das fases (γ , $\Delta\rho$ e μ) possuem correlação direta com o t_s do sistema, ou seja, o tempo necessário para que as duas fases entrem em contato e se separem completamente. Quanto menor o tempo necessário para a completa separação das fases, maior a retenção de FE na coluna, e assim, maior o valor de S_F . O SAB K_2HPO_4 /Etanol, o qual se mostrou mais adequado para utilização em CPC nas análises anteriores, apresentou t_s médio de $30,85 \pm 0,80$ s, mostrando-se favorável para S_F , em conjunto com sua baixa μ (de 2,5642 mPa.s na fase de topo e 3,9237 mPa.s na fase de fundo) e com os valores relativamente altos de $\Delta\rho$ ($0,3554 \text{ g/cm}^3$) e γ ($31,78 \text{ dyn/cm}$). A particularidade das propriedades físicas de SAB formados pela mistura de um sal e um álcool de cadeia curta é a formação do regime de imiscibilidade (*i.e.*, a separação das fases) em curtos períodos, de aproximadamente 30 s, equivalentes aos dos sistemas de extração líquido-líquido aquosos-orgânicos (AL-MARZOUQI *et al.*, 2005).

Os trabalhos de Lange *et al.* (2018) e Bezold *et al.* (2015) mostraram ainda que baixos valores de γ podem gerar emulsificação das fases, resultando em longos t_s e, consequentemente,

menor S_F . Por outro lado, valores elevados de $\Delta\rho$, maiores que $0,1 \text{ g/cm}^3$, resultam em t_s relativamente baixos, menores que 60 s. Considerando a potencialidade do SAB $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{Etanol}$ em obter altos valores de S_F , este foi utilizado para avaliar o efeito da variação de F , ω e modos de operação em CPC, de forma semelhante ao estudo da pressão de retorno. Na Figura 8 é apresentado o efeito da variação de F em S_F utilizando o SAB $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{Etanol}$, nos modos ascendente e descendente, com uma ω fixada em 400 rpm.

Figura 8 – Retenção de fase estacionária (S_F) em função da variação do fluxo de fase móvel (F) para $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{Etanol}/\text{H}_2\text{O}$, nos modos ascendente e descendente, em $\omega = 400 \text{ rpm}$.



Fonte: o autor.

Nota: ascendente: FE = K_2HPO_4 e FM = Etanol; descendente: FE = Etanol e FM = K_2HPO_4 .

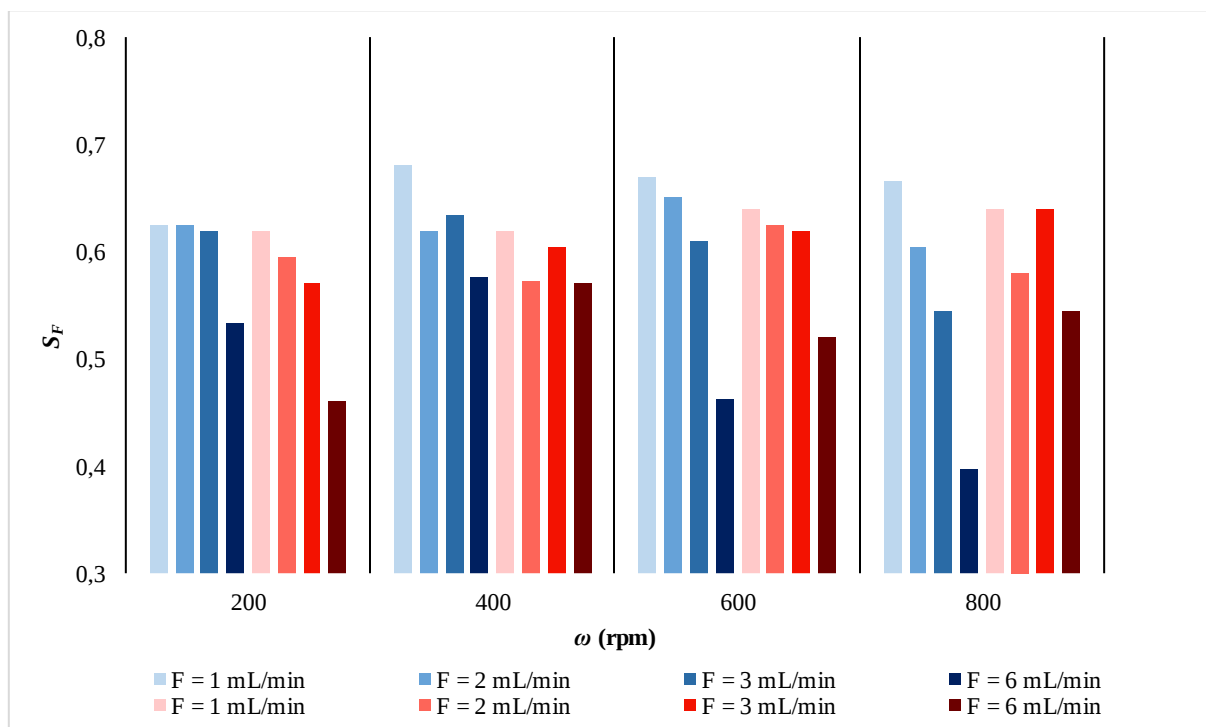
Os resultados da Figura 8 mostram que a S_F é influenciada pela variação de F , de modo que a FE retida na coluna diminui com o aumento de F , *i.e.*, os valores de S_F são menores quanto maior o valor de F . Em particular, observa-se que para ambos os modos de operação, há uma diminuição em S_F quando aumentado F de 1 mL/min a 6 mL/min, com decréscimos em S_F de 11,41% no modo ascendente (curva azul) e 5% no modo descendente (curva vermelha). Em particular, verifica-se que o aumento de F de 1 mL/min a 2 mL/min causa uma diminuição em S_F de 6% para o modo ascendente e, aproximadamente, 5% para o modo descendente, enquanto no intervalo seguinte, *i.e.*, de 2 mL/min a 6 mL/min, S_F decresce aproximadamente 5% no modo ascendente, enquanto praticamente não se altera no modo descendente. Entretanto, para fluxos

maiores, de 8 mL/min e 10 mL/min, existe uma diminuição acentuada em S_F , alcançando valores de 23% e 31% nos modos ascendente e descendente, respectivamente (em $F = 10$ mL/min). Roehrer e Minceva (2019) também observaram uma tendência decrescente de S_F em função do aumento de F para uma série de equipamentos CCC e CPC. Os autores destacaram ainda que, principalmente para CPC, a correlação entre S_F e F é linear até certo valor de F , e que, ultrapassado este valor, S_F sofre uma diminuição abrupta.

No que se refere ao modo de operação, verifica-se que até $F = 6$ mL/min, o modo descendente apresenta valores de S_F menores que no modo ascendente. Isto ocorre provavelmente porque o modo descendente emprega como FE a fase de topo rica em etanol, menos densa e viscosa, que é arrastada mais facilmente pela FM rica em sal. Entretanto, importa destacar que independentemente do modo de operação utilizado, para F até 6 mL/min, S_F se mantém acima de 55%, ou seja, superior ao valor de 50%, o qual é considerado satisfatório para promover separações eficientes em cromatografias contracorrentes (ITO, 2005). Dessa forma, podemos considerar que os resultados obtidos são promissores para futuras aplicações comerciais, uma vez que o emprego de maiores F , implica em menores tempos de separação e, conseqüentemente, maior economia do processo. Assim, confirma-se a possibilidade de utilizar em sistemas etanol/sal F de até 6 mL/min, sem que ocorra perda significativa em S_F e mantendo-se dentro da janela de operação da pressão crítica do CPC.

De forma equivalente, foi avaliado o efeito do aumento da ω na S_F utilizando o SAB K_2HPO_4 /Etanol, para valores fixos de F de 1, 2 e 3 mL/min, respectivamente, nos modos ascendente (tons de azul) e descendente (tons de vermelho), como representado na Figura 9.

Figura 9 – Retenção de fase estacionária (S_F) em função da velocidade de rotação da coluna (ω) para K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O , nos modos ascendente e descendente, para $F = 1, 2, 3$ e 6 mL/min.



Fonte: o autor.

Nota: ascendente: FE = K_2HPO_4 e FM = Etanol; descendente: FE = Etanol e FM = K_2HPO_4 .

Pela análise da Figura 9, verifica-se que a variação da ω para F de 1 mL/min a 3 mL/min, quando comparada à variação do F , não afeta de forma expressiva a S_F em ambos os modos de operação. Para estas condições, o aumento da ω causou variações menores que 10% na S_F , ou seja, o aumento da ω não gera necessariamente um aumento ou diminuição dos valores de S_F . Este comportamento é observado, por exemplo, no modo ascendente, onde S_F máximo ocorre em 400 rpm para $F = 1, 3$ e 6 mL/min e 600 rpm para $F = 2$ mL/min. Similarmente, no modo descendente, S_F máximo ocorre em diferentes valores de ω para cada F .

Para F de 6 mL/min ocorre uma diminuição mais acentuada em S_F , de, aproximadamente, 18% no modo ascendente (alcançando $S_F = 40\%$ em $\omega = 800$ rpm) e 11% no modo descendente (alcançando $S_F = 46\%$ em $\omega = 200$ rpm). No entanto, embora F maiores ou iguais a 6 mL/min resultem na diminuição de S_F , quando visada a economia de tempo e reagentes no processo de separação, a utilização de maiores fluxos pode ser vantajosa. Além disto, segundo Brown (2018), os valores de S_F para o CPC (coluna hidrostática) são frequentemente menores quando comparados aos encontrados nas colunas hidrodinâmicas. Em compensação, os valores relativamente baixos de S_F são menos críticos às eficiências de separação de solutos no CPC do que no CCC (colunas hidrodinâmicas). Por exemplo, no

trabalho de Santos *et al.* (2018) foi realizada a separação de uma mistura complexa de compostos fenólicos utilizando PEG 8000/NaPA8000/H₂O/NaCl em CPC, com S_F de apenas 37%, porém resultando em taxas de recuperação de até 87%. Oelmeier *et al.* (2013), por sua vez, realizou a purificação de anticorpo monoclonal a partir do sobrenadante do meio de cultura utilizando sistemas compostos de PEG-400 e citrato em CPC, com S_F de 53%, e alcançou recuperação de 96,9% do anticorpo e redução de 88,2% do conteúdo de proteínas contaminantes provenientes da célula hospedeira.

A análise conjunta das Figuras 8 e 9 mostra que é possível alcançar altos valores de S_F , próximos de 70% para o sistema K₂HPO₄/Etanol/H₂O, quando operado o CPC em modo ascendente, com F de 1 mL/min e ω de 400 a 800 rpm. No entanto, mesmo nas demais condições avaliadas, *i.e.*, para F de até 3 mL/min, S_F se manteve em um intervalo de 55% a 65%, independentemente de ω aplicada. Embora a utilização de menores valores de ω (200 rpm, para este estudo) promova valores de S_F superiores e pressões de retorno menores, a literatura mostra que menores ω tendem a causar maior eluição de FE ao longo do processo de separação. Esta eluição, conhecida pelo termo inglês “*bleeding*”, é um problema já bem conhecido na CPC, responsável por causar ruídos na linha de base e alterações no tempo de retenção da amostra. Por estas razões, ω maiores que 200 rpm e dentro da pressão crítica das bombas foram adotadas nos ensaios posteriores de partição de biomoléculas no CPC (BERTHOD e ARMSTRONG, 1988; FUMAT *et al.*, 2016).

PARTE II – Análise de partição de biomoléculas utilizando SAB

O estudo das condições hidrodinâmicas mais adequadas para o funcionamento do CPC e obtenção de elevada retenção de FE na coluna, permitiu identificar o SAB K₂HPO₄/Etanol/H₂O como mais adequado para aplicação no equipamento no estudo de partição de biomoléculas. Considerando que a eficiência de separação em CPC, além de ser influenciada pelas propriedades do sistema solvente e parâmetros operacionais, depende também de condições relacionadas às propriedades do soluto-alvo, foi então realizada uma primeira etapa de avaliação da partição dos solutos em escala laboratorial.

5.4. Avaliação dos coeficientes de partição (K_D) de solutos-modelo em escala laboratorial

Além de possuir alta solubilidade nas fases do sistema bifásico, a fim de promover uma elevada transferência de massa, o soluto que se pretende separar na CPC deve possuir um valor de K_D adequado, isto é, preferencialmente o mais próximo de 1 ou, dependendo da sua natureza,

em faixas de 0,5 a 3, ou de 0,25 a 16 (ADELMANN e SCHEMBECKER, 2011; KUMAR *et al.*, 2014, BOJCZUK *et al.*, 2017). Como referido acima, baixos valores de K_D acabam por promover eluição do soluto no primeiro volume de FM, resultando em uma R_S reduzida, enquanto maiores valores de K_D , ou seja, alta afinidade pela FE, podem resultar em tempos de eluição demasiadamente longos e diluição do soluto (ITO, 2005; YIN *et al.*, 2010).

Considerando esses aspectos, na primeira parte deste estudo foi realizada uma triagem de solutos-modelo, em escala laboratorial, buscando solutos que apresentassem K_D mais próximo de 1, ou dentro da faixa de aplicação adequada para o SAB 19,5 % (m/m) de K_2HPO_4 + 19,5 % (m/m) de etanol + 19,5 % (m/m) de H_2O . As biomoléculas analisadas e seus respectivos valores de K_D estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Coeficientes de partição (K_D), em escala laboratorial, de solutos-modelo no SAB composto por 19,5 % (m/m) K_2HPO_4 + 19,5 % (m/m) Etanol + 19,5 % (m/m) de H_2O , e seus respectivos comprimentos de onda de absorção máxima.

Soluto-modelo	K_D	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
Ácido gálico	0,5072 ($\pm 0,0136$)	266
L-tirosina	2,2880 ($\pm 0,0307$)	223
Riboflavina	3,9700 ($\pm 0,0470$)	445
Ácido p-cumárico	19,1801 ($\pm 5,1736$)	315
Albumina do soro bovino (BSA)	21,8391	278
Ácido trans-ferúlico	33,4699 ($\pm 0,4771$)	315
Proteína verde fluorescente (GFP)	44,07	(1)
Colorante verde malaquita	(2)	618
Colorante vermelho de fenol	(2)	559
Colorante verde brilhante	(2)	633
Colorante vermelho de <i>T. amestolkiae</i>	(2)	500

Fonte: o autor.

Nota: (1) Concentração de GFP determinada por fluorescência com excitação a 488 nm e emissão a 510 nm; (2) Partição total do soluto para a fase de topo.

Como descrito na Tabela 3 e apresentado na Figura A1 (em anexo), o colorante vermelho presente no meio de cultura produzido por *T. amestolkiae*, e os colorantes comerciais verde brilhante e verde malaquita apresentaram uma partição total, ou quase total, no caso do vermelho de fenol, pela fase de topo, a qual foi possível verificar visualmente através da forte coloração da fase de topo (rica em etanol), em comparação à fase de fundo (rica em sal). A partição completa dos colorantes para a fase de topo corresponde a um valor de K_D “infinito” destes solutos (uma vez que a concentração na fase de fundo é zero). Considerando que o

objetivo da triagem de partição é encontrar moléculas com K_D próximos de 1, estas foram descartadas para serem aplicadas nos estudos posteriores de separação em CPC.

Observa-se na Tabela 3 que o ácido p-cumárico, ácido trans-ferúlico, a BSA e a proteína GFP apresentaram valores de K_D bastante elevados, entre 19 e 44, ou seja, superiores a faixa de trabalho recomendada para aplicação em CPC (0,25 a 16). Por outro lado, o ácido gálico, a L-tirosina e a riboflavina apresentaram menores valores de K_D em relação aos demais (entre 0,5 e 4) e dentro dos limites recomendados de aplicação. Portanto, optou-se por utilizar como solutos-modelo nas próximas etapas de partição em CPC, o ácido gálico, a L-tirosina e a riboflavina, que apresentaram para o sistema K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O K_D de $0,51 \pm 0,01$, $2,29 \pm 0,03$ e $3,87 \pm 0,05$, respectivamente. Estes valores indicam que a L-tirosina e a riboflavina particionam preferencialmente para a fase de topo (rica em etanol), enquanto o ácido gálico é particionado preferencialmente para a fase de fundo (rica em K_2HPO_4).

Os solutos-modelo selecionados foram utilizados nos ensaios de partição em CPC, no quais foram utilizadas as melhores condições hidrodinâmicas encontradas nos estudos anteriores, ou seja, valores de F e ω que não excederam o limite máximo de pressão e que resultaram em maiores valores de S_F .

5.4.1. Ensaio de partição de ácido gálico em CPC

O estudo de partição do ácido gálico em CPC foi realizado através de quatro ensaios variando-se F e a concentração da amostra. Em todos os ensaios foi utilizado o modo descendente, no qual FM é a fase de fundo salina (rica em ácido gálico) e $\omega = 600$ rpm. As condições operacionais e de retenção respectivas de cada ensaio estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros operacionais e de retenção dos ensaios de partição de ácido gálico em K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O no CPC a $\omega = 600$ rpm.

Ensaio	F (mL/min)	Concentração de ácido gálico no SAB (g/L)	V_M (mL)	S_F (%)	t_R calculado (min)
1	2	0,1525	128	47,0	82,4
2	2	0,3050	128	47,0	82,4
3	1	0,3050	118	52,0	159,8
4	4	0,3050	141	40,5	42,8

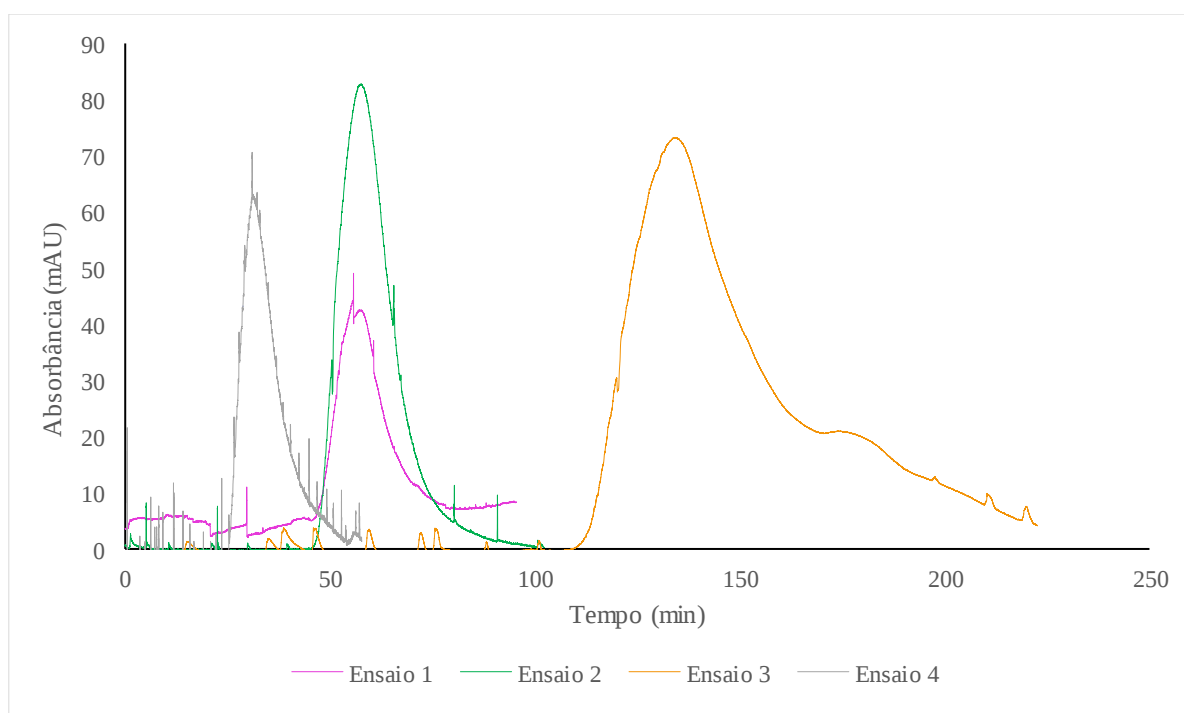
Fonte: o autor.

Nota: F = fluxo de fase móvel; V_M = volume de fase móvel na coluna; S_F = retenção de fase estacionária; t_R = tempo de retenção do soluto.

Pela análise da Tabela 4 observa-se que o equilíbrio da coluna com FE e FM resultou em maiores valores de S_F para F menores (em $\omega = 600$ rpm). Embora estes resultados estejam em conformidade com os obtidos nos estudos anteriores de hidrodinâmica, verifica-se uma diminuição do S_F (valores entre 40 e 52%) comparativamente aos obtidos nos ensaios hidrodinâmicos (os quais se mantiveram acima de 60%). Esta diferença em S_F pode ser atribuída à estabilização do equipamento, uma vez que nos dois estudos referidos, foram aplicadas as mesmas condições operacionais.

Com base nos valores obtidos de S_F , V_M e K_D do ácido gálico (igual a 0,51), foram calculados o volume de retenção (V_R) e tempo de retenção (t_R) dos solutos, utilizando a equação de retenção (Eq. 2), obtendo-se para os ensaios 1, 2, 3 e 4, respectivamente: $V_{R1} = 164,7$ mL ($t_{R1} = 82,4$ min); $V_{R2} = 164,7$ mL ($t_{R2} = 82,4$ min); $V_{R3} = 159,8$ mL ($t_{R3} = 159,8$ min); $V_{R4} = 171,1$ mL ($t_{R4} = 42,8$ min). Após o equilíbrio da coluna com FM e FE e determinação dos parâmetros de retenção, a amostra de cada respectivo ensaio foi injetada no CPC, resultando nos cromatogramas apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Partição de ácido gálico em K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O no CPC, em modo descendente, e $\omega = 600$ rpm, com F (mL/min) e concentração da amostra no sistema bifásico (g/L) respectivamente iguais a: 2 e 0,1525 (Ensaio 1); 2 e 0,3050 (Ensaio 2); 1 e 0,3050 (Ensaio 3); 4 e 0,3050 (Ensaio 4).



Fonte: o autor.

Nota: F = fluxo de fase móvel; ω = velocidade de rotação da coluna.

Uma primeira análise da Figura 10 permite verificar que os t_R reais, observados em cada curva apresentada, foram aproximadamente iguais a 58 min (ensaios 1 e 2), 136 min (ensaio 3) e 32 min (ensaio 4). Comparativamente aos t_R calculados, apresentados na Tabela 4, observa-se que em todos os ensaios realizados ocorreu uma eluição antecipada do soluto. O soluto foi eluído cerca de 24 min antecipadamente ao t_R calculado nos ensaios 1, 2 e 3, e cerca de 10,8 min no ensaio 4. Contudo, é possível observar, que, como esperado, o aumento do F leva à diminuição do t_R real. O aumento de 1 mL/min para 2 mL/min, resultou na diminuição do t_R real de 136 min para 58 min, enquanto o aumento do F de 2 mL/min para 4 mL/min, resultou na diminuição do t_R real de 58 min para 32 min.

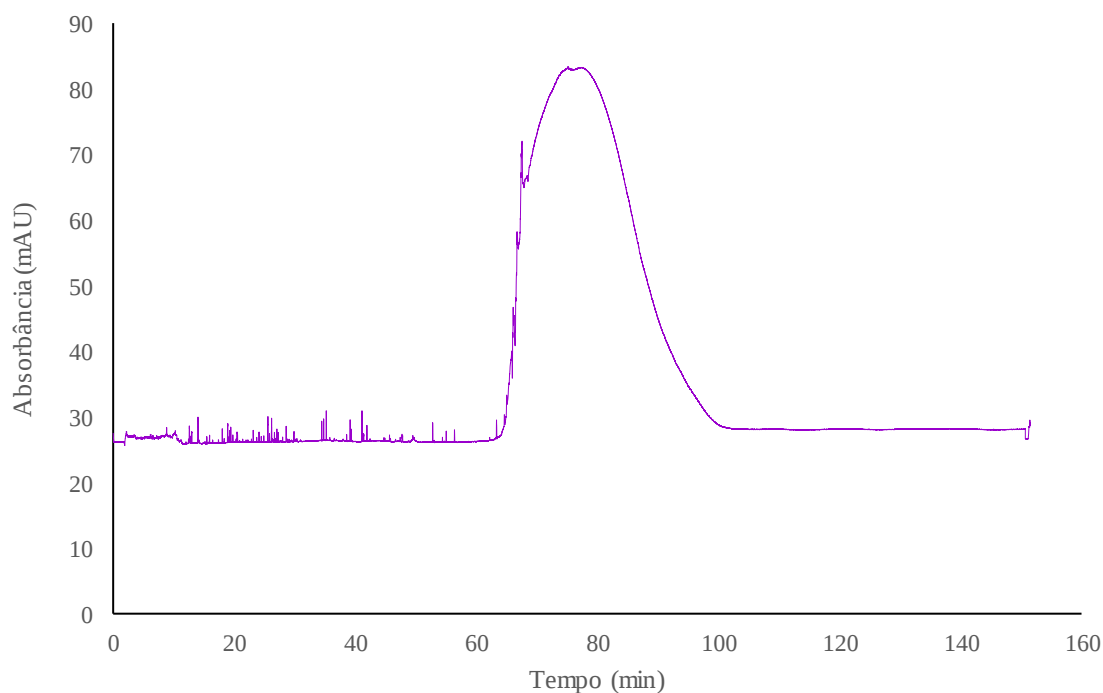
Com relação à variação da concentração da amostra, nota-se que a injeção de 0,3050 g/L de ácido gálico (ensaios 2, 3 e 4), resultou em picos cromatográficos de alturas semelhantes, com detecção entre 60 mAU e 80 mAU. No ensaio 1, a injeção de ácido gálico com metade da concentração dos demais ensaios (0,1525 g/L), resultou em pico cromatográfico de altura relativamente menor (absorbância de 40 mAU). Independentemente do F e concentração da amostra utilizados, é possível verificar que ocorreu o alargamento do pico cromatográfico em todos os ensaios realizados, sobretudo no ensaio 3, onde foi utilizado o menor valor de F , igual a 1 mL/min.

Após a compreensão inicial da partição deste soluto em diferentes condições, foi realizada uma segunda etapa utilizando amostra contendo os ácidos gálico e vanílico, a fim de analisar a separação destes compostos fenólicos. Para tal, foram selecionados os parâmetros operacionais com base nos resultados obtidos para o ácido gálico. Embora o $F = 4$ mL/min tenha possibilitado menor t_R , este fluxo também resultou em um menor valor de S_F . Portanto, no ensaio de separação dos dois compostos fenólicos optou-se por um fluxo intermediário de 3 mL/min, cujo valor permite não só um t_R relativamente baixo (consequentemente uma economia de solventes), mas também maior estabilidade da FE, como mostrado nos estudos de hidrodinâmica de S_F . Com relação à ω , optou-se por diminuir de 600 rpm (utilizado nos ensaios anteriores) para 400 rpm, com objetivo de reduzir os problemas de pressão apresentados nas bombas e por considerar que a alteração deste parâmetro não mostrou influenciar a S_F nos estudos de hidrodinâmica. Relativamente ao modo de operação, foi mantido o modo descendente, no qual o ácido gálico particiona-se preferencialmente para fase de fundo ($K_D = 0,51$), equivalente a FM, enquanto o ácido vanílico particiona-se para a fase de topo ($K_D = 6,3$) (FARIAS *et al.*, 2020), equivalente a FE.

O equilíbrio da coluna neste ensaio resultou em $V_M = 106$ mL, e, portanto, $S_F = 58\%$. Considerando estes valores, juntamente aos valores de K_D dos compostos fenólicos, foram

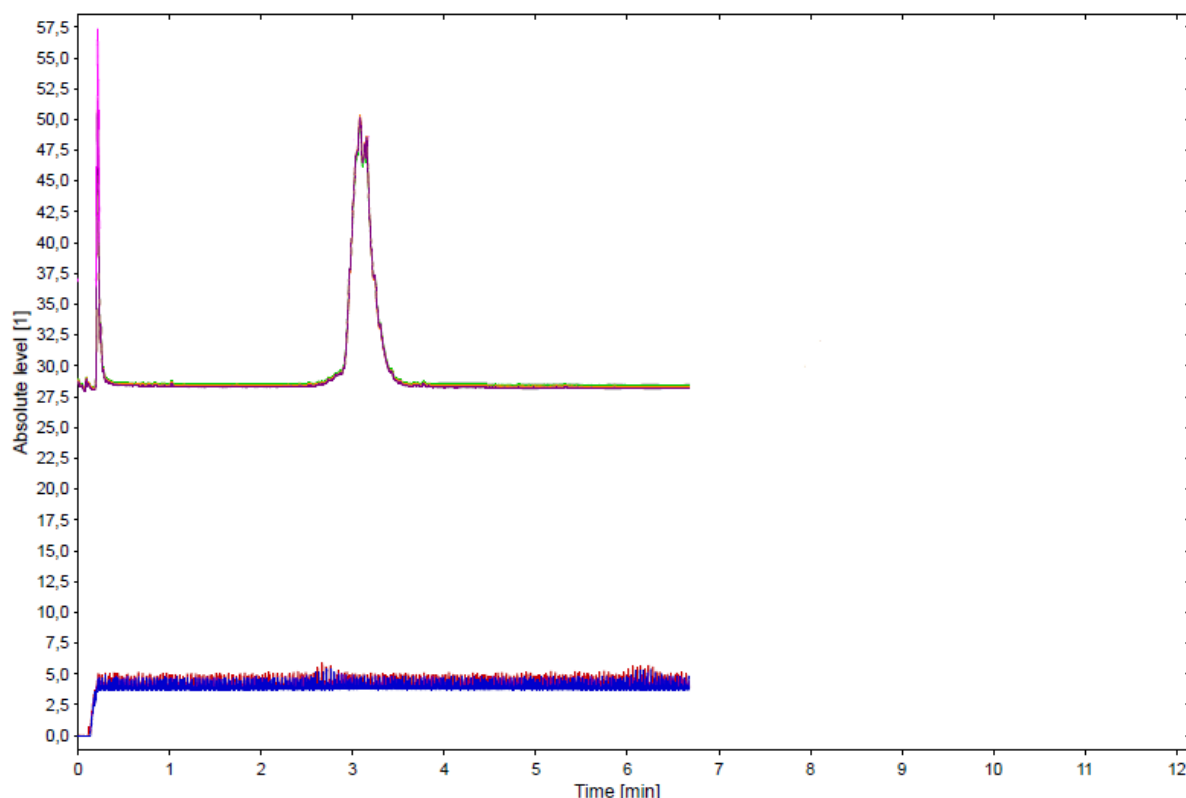
determinados os parâmetros de retenção para o ácido gálico, $V_R = 153,94$ mL ($t_R = 51,31$ min), e para o ácido vanílico, $V_R = 698,2$ mL ($t_R = 232,73$ min). Considerando o elevado t_R calculado para o ácido vanílico, optou-se por eluir primeiramente o ácido gálico (em modo descendente) e, posteriormente, recuperar o ácido vanílico através de uma etapa de extrusão da FE, realizada através da inversão do modo de operação, ou seja, alteração de descendente para ascendente. Para realizar a extrusão, a força centrífuga que mantém FE estável na coluna foi reduzida, diminuindo ω para 100 rpm, enquanto o F foi aumentado para 80 mL/min. Os cromatogramas obtidos no CPC na eluição do ácido gálico e recuperação do ácido vanílico, estão apresentados nas Figura 11 e Figura 12, respectivamente.

Figura 11 – Eluição de ácido gálico (em modo descendente) em ensaio de separação em CPC de compostos fenólicos utilizando K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O .



Fonte: o autor.

Figura 12 - Eluição de ácido vanílico (em modo ascendente) em ensaio de separação em CPC de compostos fenólicos utilizando K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O .



Fonte: obtida no Quattro LabPrep™ CPC em sistema de detecção UV-Vis.

Assim como no ensaio anterior, observa-se na Figura 11 a eluição do ácido gálico em t_R diferente do t_R calculado e a existência de alargamento do pico cromatográfico. Neste caso, o t_R real para o ácido gálico foi superior ao calculado, o que pode ser explicado com uma perda de FE após o equilíbrio da coluna, bem como uma possível perda de amostra e de FM por vazamentos no injetor de amostra e nas partes rotativas do CPC. De qualquer modo, verifica-se que foi possível separar os compostos fenólicos através da recuperação do ácido vanílico com a extrusão da FE. Como evidenciado na Figura 12, a eluição do ácido vanílico ocorreu aos 3 min da etapa de extrusão, totalizando um V_R de 690 mL (450 mL respectivos aos 150 min em modo descendente com um F de 3 mL/min, e 240 mL respectivos aos 3 min em modo ascendente com um F de 80 mL/min). Neste caso, o V_R real foi semelhante ao calculado (com valor igual a 698,2 mL).

Os cromatogramas confirmaram a separação dos compostos fenólicos. No entanto, as frações coletadas do CPC apresentaram alteração da coloração da solução (também observada nos ensaios apenas com ácido gálico), turbidez elevada e formação de precipitado, que inviabilizaram análises posteriores destas frações. Estas alterações podem ser resultado da degradação dos solutos nas condições alcalinas das fases sistema bifásico utilizado. Segundo

Friedman e Jurgens (2000), a estabilidade dos compostos fenólicos, incluindo o ácido gálico, é altamente dependente do valor de pH, do tempo de armazenamento e da estrutura de cada composto. De acordo com os autores, a natureza do solvente, efeitos estéricos, substituintes doadores e retiradores de elétrons no anel benzênico, ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, e a formação de híbridos de ressonância dependentes do pH, são responsáveis por influenciar o espectro de absorção e coeficiente de extinção dos fenóis. Em adição, e diferentemente de outros compostos fenólicos, o ácido gálico não possui reversibilidade no espectro de absorção, sugerindo que o composto seja alterado quimicamente com a alteração do pH. Na faixa de valores de pH entre 1 a 8, embora haja alteração da forma do composto, é possível ainda que sejam mantidas as propriedades antioxidantes, o que não ocorre em pH mais alcalinos (FRIEDMAN e JURGENS, 2000). Em razão disto, considerando o pH ≈ 10 das fases do SAB K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O , optou-se por seguir os ensaios em CPC com as demais biomoléculas anteriormente selecionadas, *i.e.*, L-tirosina e riboflavina.

5.4.2. Ensaio de partição de L-tirosina em CPC

Para avaliar a partição de L-tirosina no CPC, os parâmetros operacionais utilizados foram $F = 2$ mL/min, $\omega = 600$ rpm e modo de operação ascendente, no qual a FM é igual a fase de topo rica em etanol, na qual é concentrada a L-tirosina. Importa destacar que este estudo foi realizado em duplicata, representada pelos Ensaio 1 e Ensaio 2.

Através de análise prévia do espectro de absorção da solução aquosa de L-tirosina, observou-se que a máxima absorção ocorre em $\lambda_{m\acute{a}x} = 275$ nm. No entanto, foi possível observar que o aminoácido também apresenta forma derivada com absorção em $\lambda = 223$ nm, o que está de acordo com informações encontradas na literatura (CREED, 1984). Embora a detecção do soluto no CPC tenha sido monitorada em ambos os comprimentos de onda, não foi possível identificar o aparecimento de picos cromatográficos, como mostrado na figura em anexo (Figura A2).

De qualquer modo, partindo da equação de retenção (Eq. 2), foram calculados o V_R e t_R teóricos do soluto, nos quais deveria ocorrer aparecimento do pico cromatográfico da L-tirosina. Como mostra a equação, estes parâmetros de retenção são influenciados pelo volume de FM (V_M), e consequentemente, pelo volume de FE na coluna após o equilíbrio. Para os dois ensaios realizados, obteve-se $V_{M1} = 92$ mL e $V_{M2} = 108$ mL. Assim, considerando para ambos os ensaios $K_D = 2,29$, $V_C = 200$ mL e $F = 2$ mL/min, foram obtidos $V_{R1} = 139,16$ mL ($t_{R1} = 69,58$ min) e $V_{R2} = 148,17$ mL ($t_{R2} = 74,08$ min).

Devido a ausência do pico cromatográfico no CPC, e consequente impossibilidade de detecção do soluto no equipamento de aquisição de dados, optou-se por coletar frações nos tempos que englobassem os t_R calculados (de 63 min a 78 min). Desta forma, para ambos os ensaios realizados, foram coletadas as frações de volumes variados (F_{22} , F_{23} , F_{24} , F_{25} e F_{26}), as quais foram analisadas em espectrofotômetro quanto à sua concentração ($\lambda = 275$ nm), como apresentado na Tabela 6.

Tabela 5 – Concentração de L-tirosina (g/L) de frações obtidas no ensaio de partição em CPC realizado em duplicata (Ensaio 1 e Ensaio 2), utilizando K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O .

Fração	Ensaio 1	Ensaio 2	Média $\pm$ Desvio padrão
F₂₂	0,1183	0,2020	0,1601 $\pm$ 0,0592
F₂₃	0,1544	0,2005	0,1774 $\pm$ 0,0326
F₂₄	0,1804	0,1516	0,1660 $\pm$ 0,0204
F₂₅	0,1436	0,1144	0,1290 $\pm$ 0,0207
F₂₆	0,1243	0,0697	0,0970 $\pm$ 0,0386

Fonte: o autor.

Embora os ensaios em duplicata tenham apresentado uma diferença nos valores de S_F , os quais foram de 65% no Ensaio 1 e 57% no Ensaio 2 (o que resulta também em diferença no V_R), os resultados da Tabela 6 confirmam que nas frações analisadas a variação da concentração de L-tirosina entre ambos os ensaios não foi significativa, isto é, apresentaram um desvio padrão menor que 5%.

A inviabilidade de detecção do soluto pode ter sido ocasionada pela diluição do soluto durante a partição em CPC, ou mesmo devido a perda de amostra por vazamento no injetor de amostra e outras partes físicas do equipamento, observada durante os ensaios. Além disto, é possível que não tenha ocorrido a eluição do soluto, que teria ficado retido na FE, em razão da alteração do equilíbrio da coluna após injeção da amostra, o qual resulta também na alteração dos parâmetros de retenção calculados.

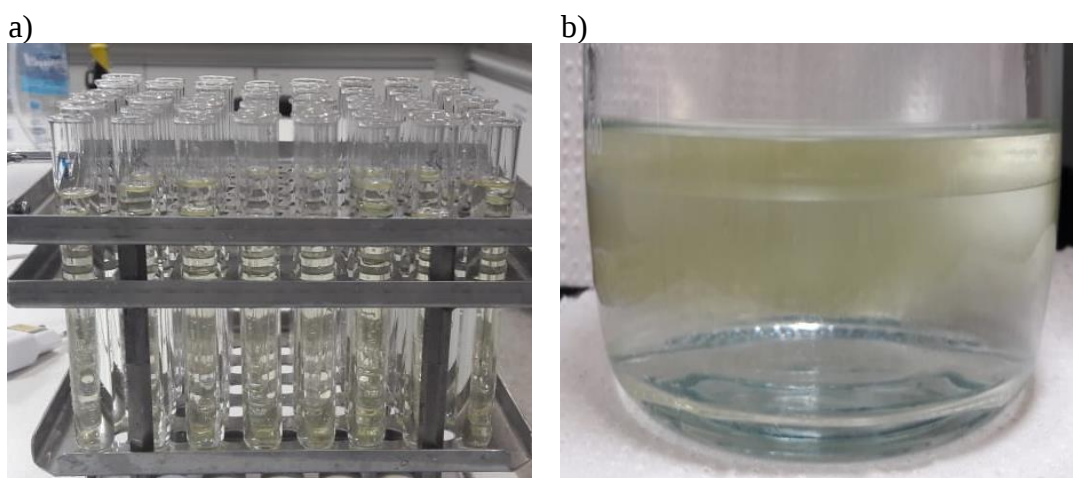
5.4.3. Ensaio de partição de riboflavina em CPC

O estudo de partição da riboflavina em CPC, assim como os demais, foi realizado nas condições de hidrodinâmica mais adequadas em relação a S_F e pressão de retorno ($F = 3$ mL/min e $\omega = 600$ rpm). Para este estudo, visto que o K_D da riboflavina obtido experimentalmente foi de 3,87, escolheu-se o modo descendente (FE = fase de topo e FM = fase de fundo). Neste caso foram realizados dois ensaios variando-se a concentração da amostra injetada no CPC. No primeiro ensaio, a amostra consistiu em 5 mL da fase de fundo (FM) do SAB K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O contendo 40% (m/m) de solução aquosa de riboflavina 0,1 g/L. No segundo ensaio para avaliar a concentração do soluto e o efeito da injeção da amostra em S_F , foi injetada diretamente a própria solução aquosa de riboflavina com uma concentração de 0,1 g/L.

O equilíbrio da coluna com FE e FM resultou em $S_{F1} = 54\%$ e $S_{F2} = 59\%$ para o primeiro e segundo ensaios, respectivamente (valores determinados utilizando a Eq. 5). Embora o segundo ensaio tenha apresentado maior S_F , foi observada uma perda elevada da FE após a injeção da amostra, acarretando consequentemente em uma diminuição acentuada do S_{F2} . Por outro lado, no primeiro ensaio não foi observada perda de FE, ensaio no qual a riboflavina foi injetada junto com a FM, evidenciado uma melhor estabilidade de FE na coluna nesta condição.

A partir dos valores de S_F calculados, obteve-se para o primeiro e segundo ensaio tempos de retenção do soluto iguais a $t_{R1} = 148,9$ min e $t_{R2} = 158,5$ min, respectivamente. Embora os ensaios de eluição tenham sido realizados por 375 min (ensaio 1) e 200 min (ensaio 2), não foi observado nenhum pico cromatográfico devido às falhas técnicas no sistema de aquisição de dados do CPC. Apesar disto, como mostra a Figura 13, os volumes coletados de ambos os ensaios, bem como o volume de FE obtido da extrusão da coluna ao final de cada corrida, apresentaram uma leve coloração amarelada (cor característica da riboflavina). De qualquer modo, como pode ser observado na Figura 13, tanto nas frações coletadas ao longo da corrida em CPC, como nas amostras finais de FE e FM obtidas após extrusão da coluna do CPC (ao final do ensaio), houve uma alteração da coloração da solução de riboflavina, a qual adquiriu um tom mais claro e opaco, quando comparada com a solução inicial injetada (a qual apresenta um tom amarelo mais intenso). Assim, embora a riboflavina apresente um K_D adequado no SAB composto de álcool/sal, estes compostos provavelmente causaram a degradação deste composto.

Figura 13 – Ensaio em CPC de partição de riboflavina em K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O - a) frações coletadas ao longo da corrida e b) volumes de fase estacionária e móvel obtidos da extrusão da coluna ao final do ensaio.



Fonte: o autor.

Segundo a literatura, diversos fatores podem ser responsáveis por afetar a estabilidade da riboflavina, por exemplo, a radiação (de acordo com fonte, intensidade e comprimento de onda), polaridade e viscosidade dos solventes, presença de estabilizadores e agentes complexantes, concentração e força iônica do tampão, presença de oxigênio e pH (SHERAZ *et al.*, 2014). Dentre estes fatores, a fotoestabilidade da riboflavina é fortemente afetada pelo pH, podendo resultar na formação de diversos produtos de degradação. Os principais produtos são a formilmetilflavina (FMF) e o lumicromo (LC), formados na faixa de pH de 1 a 12, e a lumiflavina, formada em pH de 7 a 12, os quais são, por sua vez, também suscetíveis à fotodegradação em determinados valores de pH (SHERAZ *et al.*, 2014).

Segundo o trabalho de Ahmad *et al.* (2004), a riboflavina tem sua estabilidade ótima em pH de 5 a 6, devido ao seu baixo potencial de redução nesta faixa. O aumento do pH para a região alcalina aumenta a taxa de fotólise da riboflavina em cerca de 80 vezes em relação à faixa de 5 a 6, e atinge seu ponto máximo em pH = 10. Ainda, Sheraz *et al.* (2014) verificaram que uma maior taxa de fotólise da riboflavina ocorre na presença de solventes mais polares, como álcool e misturas de álcool/água, que levam a formação de FMF e LC. Além disto, a presença de ânions divalentes, como o HPO_4^{2-} leva à formação do produto de degradação ciclodehidroriboflavina. Dadas estas considerações, conclui-se para este estudo de partição utilizando o SAB composto por K_2HPO_4 / Etanol/ H_2O não é adequado para a partição da riboflavina, visto que este apresenta um pH das fases de aproximadamente 10, o que provavelmente causou a degradação da riboflavina e formação de produtos de degradação.

Em suma, apesar do SAB K_2HPO_4 / Etanol/ H_2O apresentar características hidrodinâmicas ideais para utilização no CPC, verificou-se que as biomoléculas avaliadas nos estudos de partição, *i.e.*, L-tirosina, riboflavina, ácido gálico e ácido vanílico, apresentaram instabilidade nas fases do sistema, sobretudo devido à elevada alcalinidade das fases ($pH \approx 10$). Neste caso, deve-se ser considerada uma escolha de outro SAB etanol/sal para recuperação destas biomoléculas. Por exemplo, Reis *et al.* (2012) caracterizaram uma série de SAB compostos de etanol e sais inorgânicos, nomeadamente, K_2HPO_4 (o mesmo utilizado neste estudo), K_3PO_4 , e K_2HPO_4/KH_2PO_4 , observando que estes apresentam curvas binodais com perfis semelhantes entre eles. Estes dados parecem indicar que os SAB, considerando seus dados de equilíbrio e propriedades físicas semelhantes, podem resultar em um comportamento hidrodinâmico semelhante quando aplicados no CPC. Esta evidência é de extrema importância, visto que os valores de pH das fases utilizando SAB com K_2HPO_4/KH_2PO_4 são menores (entre 7,70 e 8,01), e dessa forma podem ser mais adequados para garantir a estabilidade das biomoléculas. Assim, verifica-se que os SAB aplicados ao CPCe devem apresentar adequabilidade no funcionamento do equipamento, paralelamente à capacidade de separar biomoléculas e garantir sua estabilidade e integridade estrutural.

PARTE III – Análise de partição de biomoléculas utilizando sistema aquoso-orgânico em CPC

5.4.4. Partição de biomoléculas em sistema aquoso-orgânico

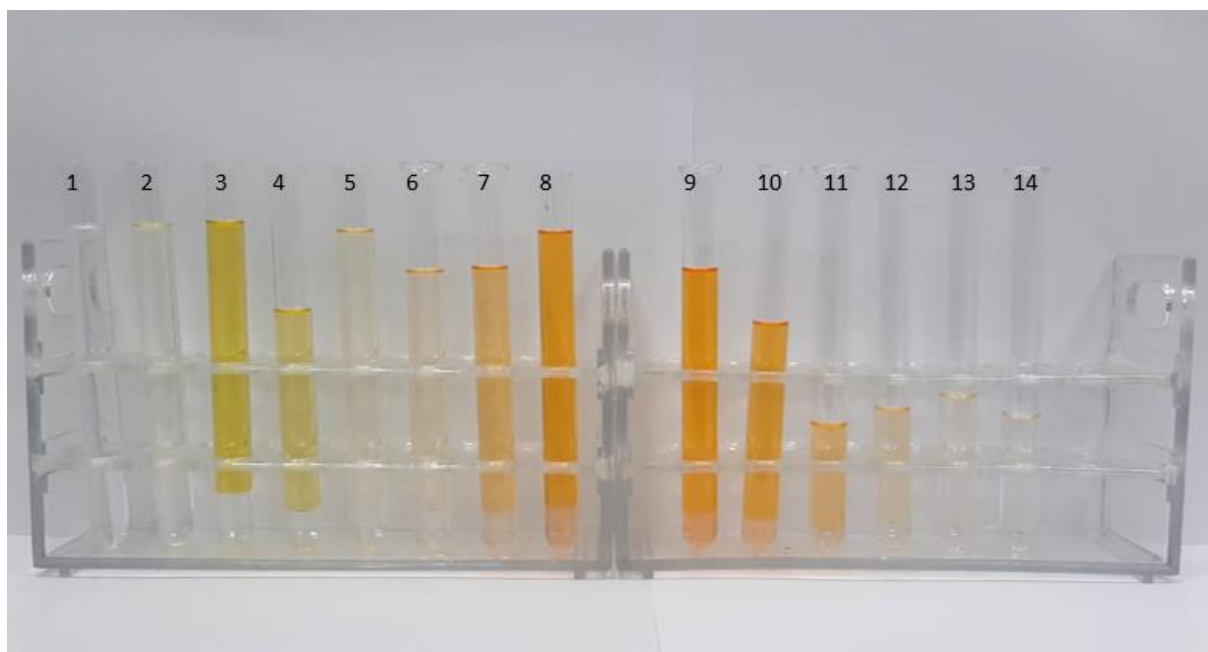
Diferente do que ocorre com os SAB, os sistemas líquido-líquido aquosos-orgânicos possuem características que permitem uma estabilidade superior das fases em equilíbrio no interior da coluna do CPC. Estes sistemas já vêm sendo amplamente utilizados em processos de cromatografias contracorrente, existindo muito conhecimento sobre sua aplicação, bem como estudos de otimização das condições operacionais em equipamentos CPC (HU e PAN, 2012; SCHWIENHEER *et al.*, 2015). Assim, visando ampliar a compreensão sobre o funcionamento do CPC utilizando sistemas aquosos-orgânicos, bem como avaliar a viabilidade destes para implementação no equipamento Quattro CPC™ - AECS-QuikPrep Ltd., foi realizado um ensaio de separação de uma mistura dos carotenoides astaxantina e β -caroteno. Para tal, foi utilizado o sistema de composição volumétrica (% v/v): 25% Etanol + 25% Acetona + 25% Hexano + 25% H_2O , o qual foi selecionado com base no trabalho de Du *et al.* (2016), que avaliaram uma série de sistemas líquido-líquido na purificação de astaxantina em *HSCCC*.

Os valores de absorvância e K_D dos solutos no sistema aquoso-orgânico estão apresentados em anexo (Tabela A1). Na análise de partição, em escala laboratorial, o valor de K_D obtido para o β -caroteno foi de $K_D = 87,97$, evidenciando a concentração do soluto predominantemente na fase de topo, mais apolar. A astaxantina, por sua vez, apresentou $K_D = 3,16$, uma partição inferior que resulta da diferença da sua polaridade. Na estrutura molecular da astaxantina, verifica-se a presença de dois grupos hidroxila (OH), dois grupos carbonila (C=O) e uma série de ligações duplas conjugadas entre os anéis β -ionona, que conferem à molécula uma natureza mais polar que a do β -caroteno e outros carotenoides (DHANKHAR *et al.*, 2012).

Como observado, o valor de K_D da astaxantina no sistema escolhido encontra-se dentro da faixa adequada de aplicação no CPC, de $0,25 < K_D < 16$. Este valor mostra que a astaxantina, assim como o β -caroteno, particiona-se preferencialmente para a fase de topo, porém em t_R distintos. Isto posto, o modo de operação escolhido para os ensaios em CPC foi o ascendente, no qual a fase de topo, concentrada em carotenoides, é utilizada como FM. Neste ensaio, a utilização de $F = 2$ mL/min e $\omega = 700$ rpm resultou em baixas pressões de retorno (aproximadamente de 300 a 320 psi) e equilíbrio das fases na coluna com S_F de 66%. Este valor de S_F mostra-se semelhante aos valores encontrados nos ensaios utilizando o SAB etanol/ K_2HPO_4 , evidenciando a similaridade das propriedades físicas do SAB composto de etanol com os sistemas aquosos-orgânicos.

Embora o volume de coleta das frações no CPC seja configurado para coletar frações com volumes de 8 mL, por falhas no coletor e detector UV-Vis do equipamento, não foi possível a visualização dos picos cromatográficos, e consequentemente não foram identificados os t_R e V_R reais dos solutos. No entanto, devido às cores características dos carotenoides, coletou-se as frações representadas na Figura 14, que correspondem à astaxantina e β -caroteno.

Figura 14 – Frações coletadas em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .



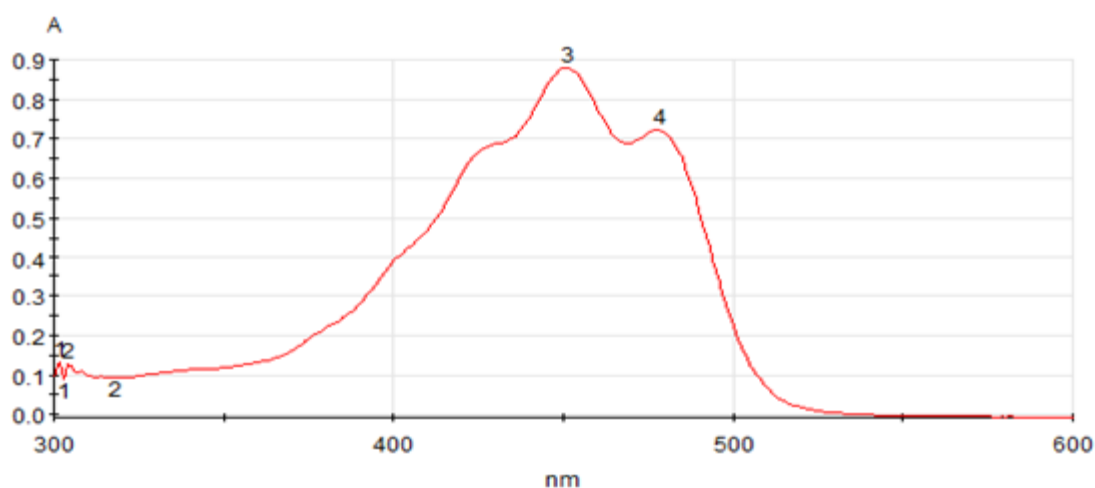
Fonte: o autor.

Nota: modo de operação ascendente; $F = 2$ mL/min; $\omega = 700$ rpm.

Em uma primeira análise, é possível identificar a presença de frações com colorações características do β -caroteno e de astaxantina, *i.e.*, amarelo e alaranjado, respectivamente. Percebe-se que as frações F3 e F4 apresentaram coloração amarela mais visível, enquanto as frações F7, F8, F9 e F10 apresentam tom mais alaranjado. As frações F5 e F6, por sua vez, mostraram uma coloração intermediária. As demais frações também foram coletadas ao longo do ensaio, porém não apresentam nenhuma coloração, indicando a ausência, ou baixíssima concentração dos carotenoides.

Uma vez que não possível obter os cromatogramas, foram analisados o perfil de varredura das frações F1 a F14. Essa análise foi realizada pois compostos que possuem cor apresentam cromóforos com comprimentos de onda máximo na região do visível. Assim, os perfis das frações mais concentradas, F3 e F9, estão apresentados nas Figura 15 e Figura 16, respectivamente. Os perfis das demais frações estão contidos em anexo (Figura A2).

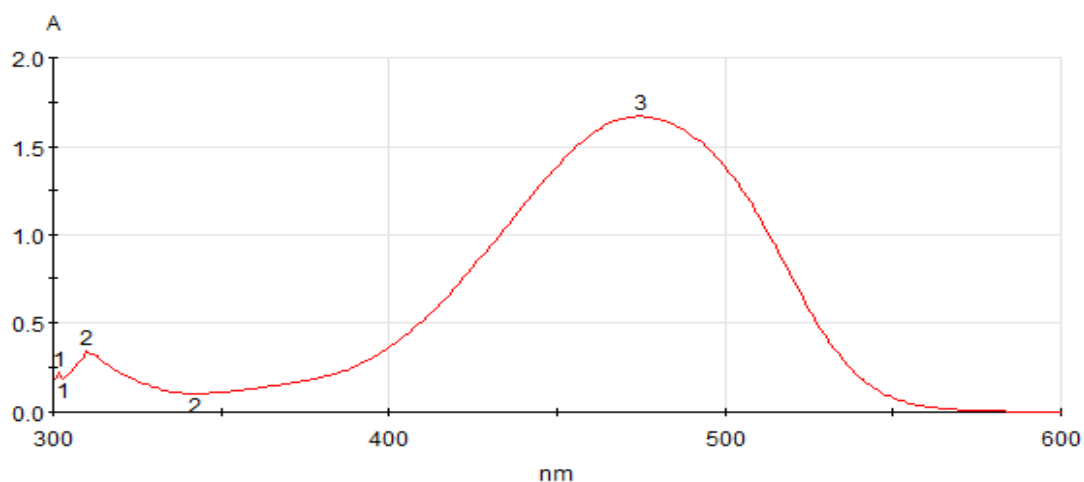
Figura 15 – Perfil de varredura da fração F3, coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .



Fonte: o autor.

Nota: Pico 3 (comprimento de onda, $\lambda_{\max}$: 451 nm; Absorvância: 0,880 UA); Pico 4 (comprimento de onda, $\lambda_{\max}$: 478 nm; Absorvância: 0,722 UA).

Figura 16 – Perfil de varredura da fração F3, coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .



Fonte: o autor.

Nota: Pico 3 (comprimento de onda, $\lambda_{\max}$: 475 nm; Absorvância: 1,670 UA).

Observa-se na Figura 15, a presença de dois picos de absorbância em F3, em $\lambda_{\max}$ 451 nm (0,880 UA) e $\lambda_{\max}$ 478 nm (0,722 UA), relativos ao β -caroteno e astaxantina, respectivamente. Embora a fração tenha apresentado uma coloração mais amarelada, característica do β -caroteno, a análise de varredura indica a presença de ambos os carotenoides, evidenciando a ausência de separação dos carotenoides nesta fração.

Por outro lado, na Figura 16, relativa à F9, nota-se a presença predominante de astaxantina, representada por um único pico de absorbância em 475 nm (1,670 A). Estes resultados, mesmo que preliminares, demonstram a possibilidade de separar seletivamente a astaxantina, a qual pode ser purificada a partir da fração F9.

Ainda, embora o equilíbrio da coluna tenha resultado em elevado S_F , nota-se nas frações coletadas (Figura 14) a presença de elevado volume de FE, equivalente à fase de fundo. Esta perda de FE ao longo do ensaio pode ter sido ocasionada pelo desequilíbrio da coluna devido a própria injeção da amostra, ou devido ao aumento de calor gerado pela rotação da coluna, dado que o equipamento utilizado é ausente de controlador de temperatura.

Assim, uma vez que a diminuição de S_F devido a perda de FE é responsável por diminuir a resolução cromatográfica e afetar os valores de t_R e V_R , evidencia-se a necessidade de estudos de hidrodinâmica do sistema aquoso-orgânico, visando obter maior estabilidade de FE, e consequentemente, maior resolução cromatográfica, além da avaliação de outras formas de injeção da amostra, por exemplo, com os solutos solubilizados em FE ou FM.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo corroboraram a importância da hidrodinâmica na operação adequada do CPC e, mais especificamente, a influência dos parâmetros operacionais nos fenômenos hidrodinâmicos, S_F e pressão de retorno, que tendem a promover as melhores eficiências de separação seletiva. Relativamente à pressão de retorno, os resultados demonstraram que este é um dos principais elementos limitantes ao funcionamento do CPC, sobretudo para a aplicação de SAB. Verificou-se na pressão de retorno um aumento acentuado em função do aumento da velocidade de rotação da coluna e de elevados valores de viscosidade das fases do sistema líquido bifásico. Concluiu-se com isso que a utilização de SAB de baixa viscosidade e elevada tensão interfacial, como o K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O , é uma opção adequada para uma aplicação bem-sucedida do CPC. A velocidade de fluxo de fase móvel, por sua vez, mostrou exercer maior influência em S_F , a qual apresentou uma diminuição mais expressiva em velocidades de fluxo superiores a 6 mL/min, quando utilizado o SAB K_2HPO_4 /Etanol. Por outro lado, a alteração da velocidade de rotação da coluna e do modo de operação não influenciou a S_F .

Como conclusão geral, constatou-se que, independentemente do modo de operação ascendente ou descendente aplicado, a utilização de velocidades de fluxo moderadas, de 2 mL/min e 3 mL/min, paralelamente a aplicação de uma velocidade de rotação da coluna intermediária, de 600 rpm, é mais aconselhada quando utilizados os SAB etanol/sal e resultam em elevados valores de S_F , maiores que 60%.

Em relação à partição de solutos-modelo no SAB K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O , identificou-se uma maior dificuldade na adequação do K_D aos requerimentos operacionais da técnica de CPC, *i.e.*, encontrar solutos com K_D próximos de 1 para o SAB em questão. Ainda, os resultados demonstraram que os solutos L-tirosina, riboflavina, ácido gálico e ácido vanílico apresentaram instabilidade nas condições físico-químicas do SAB, sobretudo devido a elevada alcalinidade das fases do sistema. Em conjunto, os resultados permitiram concluir que SAB compostos por sal e álcoois de cadeia curta apresentam características hidrodinâmicas favoráveis para aplicação em CPC, porém a seleção de biomoléculas a serem separadas nestes sistemas necessitam de uma análise bastante cuidadosa. Quanto ao ensaio de partição em CPC utilizando sistema aquoso-orgânico (Hexano/Acetona/Etanol/Água), demonstrou-se a viabilidade da separação seletiva de astaxantina, a partir de uma mistura contendo outro importante carotenoide comercial, o β -caroteno.

De maneira geral, este trabalho demonstrou a potencialidade dos sistemas líquidos bifásicos aplicados em CPC na separação e purificação de biomoléculas em um processo semi-preparativo, versátil e economicamente viável, e que pode ser escalado à níveis de produção industrial e aplicado na extração seletiva de biomoléculas a partir de meios complexos. Verificou-se também a importância dos estudos de hidrodinâmica no funcionamento adequado do equipamento, bem como a necessidade de uma análise atenta aos requisitos de partição e estabilidade das biomoléculas no sistema líquido bifásico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELMANN, S.; BALDHOFF, T.; KOEPCKE, B.; SCHEMBECKER, G. Selection of operating parameters on the basis of hydrodynamics in centrifugal partition chromatography for the purification of nybomycin derivatives. *Journal of Chromatography A*, 1274, p. 54 – 64, 2013.

ADELMANN, S.; SCHEMBECKER, G. Influence of physical properties and operating parameters on hydrodynamics in Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218, p. 5401 – 5413, 2011.

AHMAD, I.; FASIHULLAH, Q.; NOOR, A.; ANSARI, I. A.; ALI, Q. N. M. Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. *International Journal of Pharmaceutics*, 280, p. 199 – 208, 2004.

AL-MARZOUQI, I.; LEVY, M. S.; LYE, G. J. Hydrodynamics of PEG-Phosphate Aqueous Two-Phase Systems in a J-Type Multilayer Countercurrent Chromatograph. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28:9, p. 1311 – 1332, 2005.

BERGERON, B.; CHAN, P. *Biotech Industry: A Global, Economic, and Financing Overview*. 1. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p. 368.

BERTHOD, A. Fundamental of countercurrent chromatography. In:_____. (org.). *Countercurrent chromatography: the support-free liquid stationary phase*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2002. p. 1 – 20.

BERTHOD, A.; ARMSTRONG, D. Centrifugal Partition Chromatography. I. General features. *Journal of Liquid Chromatography*, 11:3, p. 547 – 566, 1988.

BERTHOD, A.; BILLARDELLO, B. Test to evaluate countercurrent chromatographs liquid stationary phase retention and chromatographic resolution. *Journal of Chromatography A*, 902, p. 323 – 335, 2000.

BERTHOD, A.; RUIZ-ÁNGEL, M. J.; CARDA-BROCH, S. Countercurrent chromatography: People and applications. *Journal of Chromatography A*, 1216, p. 4206 – 4217, 2009.

BEZOLD, F.; GOLL, J.; MINCEVA, M. Study of the applicability of non-conventional aqueous two-phase systems in counter-current and centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1388, p. 126 – 132, 2015.

BOJCZUK, M.; ŻYŻELEWICZ, D.; HODUREK, P. Centrifugal partition chromatography – A review of recent applications and some classic references. *J. Sep. Sci*, 40, p. 1597 – 1609, 2017.

BUTTENBENDER, S. L.; SIMON, E. S.; VOLPATO, N. M. Cromatografia contracorrente: princípios e aplicações. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 15, 2018.

COONS, R. Industrial Biotechnology is Firing on All Cylinders. *Industrial Biotechnology*, 17, 2, p. 49 – 50, 2021.

CREED, D. The photophysics and photochemistry of the near-uv absorbing amino acids-II. Tyrosine and its simple derivatives. *Photochemistry and Photobiology*, 39, n. 4, p. 563 – 575, 1984.

DANIELSON, N.; MCKAY, S.; BLOOM, P.; DUNN, J.; JAKEL, N.; BAUER, T.; HANNON, J.; JEWETT, M. C.; SHANKS, B. Industrial Biotechnology – An Industry at an Inflection Point. *Industrial Biotechnology*, 16, p. 321 – 332, 2020.

DE OLIVEIRA, F.; ROCHA, I. L. D.; PINTO, D. C. G. A.; VENTURA, S. P. M. V.; SANTOS, A. G.; CREVELIN, E. J.; SANTOS-EBINUMA, V. C. Identification of azaphilone derivatives of *Monascus* colorants from *Talaromyces amestolkiae* and their halochromic properties. *Food Chemistry*, 372, 2022.

DESAI, M. A. Immunoaffinity Adsorption in the Large-Scale Isolation of Biomolecules. In: ____ (org.). *Downstream Processing of Proteins: Methods and Protocols*. 1. Ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000, p. 109 – 120.

DESAI, M. A.; RAYNER, M.; BURNS, M.; BERMINGHAM, D. Application of Chromatography in the Downstream Processing of Biomolecules. In: DESAI, M. A. (org.). *Downstream Processing of Proteins: Methods and Protocols*. 1. Ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000, p. 73 – 95.

DHANKHAR, J.; KADIAN, S. S.; SHARMA, A. Astaxanthin: a potential carotenoid. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3, p. 1246 – 1259, 2012.

DOS SANTOS, N. V.; MARTINS, M.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO, J. A. P.; VALENTINI, S. R.; PEREIRA, J. F. B. Aqueous Biphasic Systems Composed of Cholinium Chloride and Polymers as Effective Platforms for the Purification of Recombinant Green Fluorescent Protein. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 6, 7, p. 9383 – 9393, 2018.

DOS SANTOS, N. V.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; PESSOA JR, A.; PEREIRA, J. F. B. Liquid-liquid extraction of biopharmaceuticals from fermented broth: trends and future prospects. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93, p. 1845 – 1863, 2018.

DRELICH, J.; FANG, C.; WHITE, C. L. Measurement of interfacial tension in fluid-fluid systems. In: HUBBARD, A. T. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. 1 Ed. New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2002, p. 3152 – 3166.

DU, Q.; WU, C.; QIAN, G.; WU, P.; ITO, Y. Relationship between the flow rate of the mobile phase and retention of the stationary phase in counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 835, p. 231 – 235, 1999.

DU, X.; DONG, C.; WANG, K.; JIANG, Z.; CHEN, Y.; YANG, Y.; CHEN, F.; NI, H. Separation and purification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by preparative high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1029-1030, p. 191 – 197, 2016.

DUNDAR, M.; PRAKASH, S.; LAL, R.; MARTIN, D. K. Future Biotechnology. *The EuroBiotech Journal*, 3, 2, p. 53 – 56, 2019.

FARIAS, F. O.; OLIVEIRA, G.; LEAL, F. C.; WOJEICCHOWSKI, J. P.; YAMAMOTO, C. I.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Cholinium chloride effect on ethanol-based aqueous biphasic systems: Liquid-liquid equilibrium and biomolecules partition behavior. *Fluid Phase Equilibria*, 505, 112363, 2020.

FREITAG, R. Chromatographic Techniques in the Downstream Processing of Proteins in Biotechnology. In: Pörtner, R. (org). *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, 3. ed. Totowa, NJ, Humana Press, 2014, 1104, p. 419 – 458.

FREITAG, R.; HORVÁTH, C. Chromatography in the downstream processing of biotechnological products. In: FIECHTER, A. (org.). Downstream Processing Biosurfactants Carotenoids. 1. ed. Berlin: Springer, 1995. p. 17 – 59.

FRIEDMAN, M.; JURGENS, H. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. J. Agric. Food. Chem., 48, p. 2101 – 2110, 2000.

FROMME, A.; FUNKE, F.; MERZ, J.; SCHEMBECKER, G. Correlating physical properties of aqueous-organic solvent systems and stationary phase retention in a centrifugal partition chromatograph in descending mode. Journal of Chromatography A, 1651, 460742, 2020.

FUMAT, N.; BERTHOD, A.; FAURE, K. Effect of operating parameters on a centrifugal partition chromatography separation. Journal of Chromatography A, 1474, p. 47 – 58, 2016.

GRONEMEYER, P.; DITZ, R.; STRUBE, J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. Bioengineering, 1, p. 188 – 2012, 2014.

HATTI-KAUL, R. Downstream Processing in Industrial Biotechnology. In: SOETAERT, W. e VANDAMME, E. J. (org). Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success. 1 Ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010, p. 273 – 321.

HOPMANN, E.; GOLL, J.; MINCEVA, M. Sequential Centrifugal Partition Chromatography: A New Continuous Chromatographic Technology. Chem. Eng. Technol, 35, No. 1, p. 72 – 82, 2012.

HU, R.; PAN, Y. Recent trend in counter-current chromatography. Trends in Analytical Chemistry, 40, p. 15 – 27, 2012.

HUANG, X.; PEI, D.; LIU, J.; DI, D. A review on chiral separation by counter-current chromatography: Development, applications and future outlook. Journal of Chromatography A, 1531, p. 1 – 12, 2018.

IQBAL, M.; TAO, Y.; XIE, S.; ZHU, Y.; CHEN, D.; WANG, X.; HUANG, L.; PENG, D.; SATTAR, A.; SHABBIR, M. A. B.; HUSSAIN, H. I.; AHMED, S.; YUAN, Z. Aqueous two-

phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, 18:18, 2016.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1065, 145-168, 2005.

JUNGBAUER, A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. *Trends in Biotechnology*, 31, no. 8, 2013.

LIU, Y.; FRIESEN, B.; McALPINE, J. B.; PAULI, G. F. Solvent system selection strategies in countercurrent chromatography. *Planta Med*, 81(17), p. 1582 – 1591, 2015.

LORÁNTFY, L.; RUTTERSCHMID, D.; ÖRKÉNYI, R.; BAKONYI, D.; FARAGÓ, J.; DARGÓ, G.; KÖNCZÖL, A. Continuous Industrial-Scale Centrifugal Partition Chromatography with Automatic Solvent System Handling: Concept and Instrumentation. *Org. Process Res. Dev.*, 24, p. 2676 – 2688, 2020.

LOPES, C.; DOS SANTOS, N. V.; DUPONT, J.; PEDROLI, D. B.; VALENTINI, S. R.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; PEREIRA, J. F. B. Improving the cost effectiveness of enhanced green fluorescent protein production using recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3): Decreasing the expression inducer concentration. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66, 4, p. 527 – 536, 2019.

MAGRI, A.; PIMENTA, M. V.; SANTOS, J. H. P. M.; COUTINHO, J. A. P.; VENTURA, S. P. M.; MONTEIRO, G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; PEREIRA, J. F. B. Controlling the L-asparaginase extraction and purification by the appropriate selection of polymer/salt-based aqueous biphasic systems. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95, n.4, p. 1016 – 1027, 2020.

MARCHAL, L.; LEGRAND, J.; FOUCAULT, A. Centrifugal Partition Chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field. *The Chemical Record*, vol. 3, p. 133 – 143, 2003.

MOLINA, G.; GUPTA, V. K.; SINGH, B. N.; GATHERGOOD, N. *Bioprocessing for Biomolecules Production*. John Wiley & Sons, 1, p. 536, 2019.

MUSSAGY, C. U.; REMONATTO, D.; PAULA, A. V.; HERCULANO, R. D.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; COUTINHO, J. A. P.; PEREIRA, J. F. B. Selective recovery and purification of carotenoids and fatty acids from *Rhodotorula glutinis* using mixtures of biosolvents. *Separation and Purification Technology*, 266, 2021.

OSLOOS, M.; ROOSTA, A. Experimental study of choline chloride and K₂HPO₄ aqueous two-phase system, and its application in the partitioning of penicillin G. *Journal of Molecular Liquids*, 279, p. 171 – 176, 2019.

PASSOS, H.; TAVARES, D. J. P.; FERREIRA, A. M.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Are Aqueous Biphasic Systems Composed of Deep Eutectic Solvents Ternary or Quaternary Systems?, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 4, p. 2881 – 2886, 2016.

PEREIRA, J. F. B.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Aqueous two-phase systems: Towards novel and more disruptive applications. *Fluid Phase Equilibria*, 505, 2020.

POOLE, C. F. Laboratory-Scale Preparative Chromatography. In:_____. (org.). *The Essence of Chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2003. p. 847 – 899.

PRADO-RUBIO, O. A.; GASCA-GONZÁLEZ, R.; FONTALVO, J.; GÓMEZ-CASTRO, F. I.; PÉRES-CISNEROS, E. S.; MOLARES-RODRIGUEZ, R. Design and evaluation of intensified downstream technologies towards feasible lactic acid bioproduction. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 158, 108174, 2020.

REIS, I. A. O.; SANTOS, S. B.; SANTOS, L. A.; OLIVEIRA, N.; FREIRE, M. G.; PEREIRA, J. F. B.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO, J. A. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. *Food Chemistry*, 135, p. 2453 – 2461, 2012.

RENAULT, J. H. Solvent systems. In: BERTHOD, A. (org.). *Countercurrent chromatography: the support-free liquid stationary phase*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2002. p. 49 – 83.

ROEHRER, S.; MINCEVA, M. Evaluation of Inter-Apparatus Separation Method Transferability in Countercurrent Chromatography and Centrifugal Partition Chromatography. *Separations*, 6 (3), 36, 2019.

RONCO, N. R.; GAGLIARDI, L. G.; CASTELLS, C. B. Aqueous-organic biphasic systems: extraction of organic compounds. In: POOLE, C. F. (org.). *Handbooks in Separation Science. Liquid-Phase Extraction*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 91 – 119.

SANTOS, J. H. P. M.; ALMEIDA, M. R.; MARTINS, C. I. R.; DIAS, A. C. R. V.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P.; VENTURA, S. P. M. Separation of phenolic compounds by centrifugal partition chromatography. *Green Chemistry*, 20, p. 1906 – 1916, 2018.

SCHWIENHEER, C.; KRAUSE, J.; SCHEMBECKER, G.; MERZ, J. Modelling centrifugal partition chromatography separation behavior to characterize influencing hydrodynamic effects on separation efficiency. *Journal of Chromatography A*, 1492, p. 27 – 40, 2017.

SCHWIENHEER, C.; MERZ, J.; SCHEMBECKER, G. Selection and Use of Poly Ethylene Glycol and Phosphate Based Aqueous Two-Phase Systems for the Separation of Proteins by Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38, p. 929 – 941, 2015.

SCHWIENHEER, C.; PRINZ, A.; ZEINER, T.; MERZ, J. Separation of active laccases from *Pleurotus sapidus* culture supernatant using aqueous two-phase systems in centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1002, p. 1 – 7, 2015.

SCHWIENHEER, C.; SCHEMBECKER, G. Investigation, comparison and design of chambers used in centrifugal partition chromatography on the basis of flow pattern and separation experiments. *Journal of Chromatography A*, 1390, p. 39 – 49, 2015.

SUTHERLAND, I. A. Liquid stationary phase retention and resolution in hydrodynamic CCC. In: BERTHOD, A. (org.). *Countercurrent chromatography: the support-free liquid stationary phase*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2002. p. 159 – 176.

TONG, S.; GUAN, Y.; YAN, J.; ZHENG, B.; ZHAO, L. Enantiomeric separation of (R, S) - naproxen by recycling high speed counter-current chromatography with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector. *Journal of Chromatography A*, 1218, p. 5434 – 5440, 2011.

TONG, S.; ZHENG, Y.; YAN, J. Enantioseparation of chiral aromatic acids by multiple dual mode counter-current chromatography using hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector. *J. Sep. Sci.*, 36, p. 2035 – 2042, 2013.

VAN BUEL, M. J.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; LUYBEN, K. Ch. A. M. Pressure drop in centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 773, p. 1 – 12, 1997.

VETTER, W.; MULLER, M.; ENGLERT, M.; HAMMANN, S. Countercurrent Chromatography—When Liquid-Liquid Extraction Meets Chromatography. In: POOLE, C. F. (org.). *Handbooks in Separation Science. Liquid-Phase Extraction*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 289 – 325.

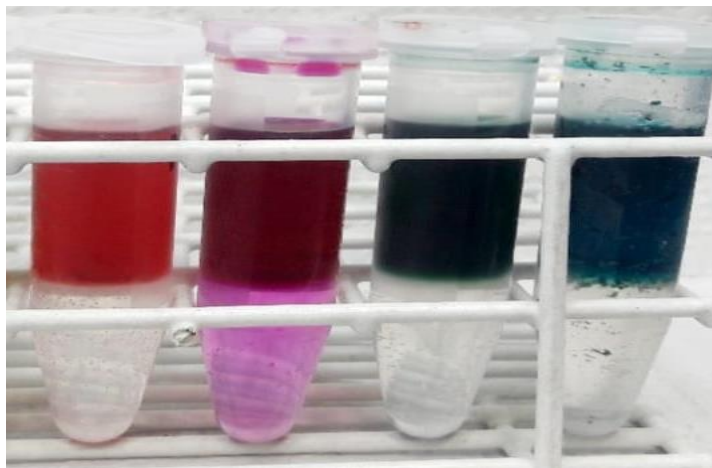
WALSH, G. *Pharmaceutical Biotechnology: Concepts and Application*. John Wiley & Sons Ltd, p. 498, 2007.

WINTERHALTER, P. Application of countercurrent chromatography (CCC) to the analysis of natural pigments. *Trends in Food Science & Technology*, 19, p. 507 – 513, 2007.

YIN, L.; LI, Y.; LU, B.; JIA, Y.; PENG, J. Trends in countercurrent chromatography: applications to natural products purification. *Separation & Purification Reviews*, 39, p. 33 – 62, 2010.

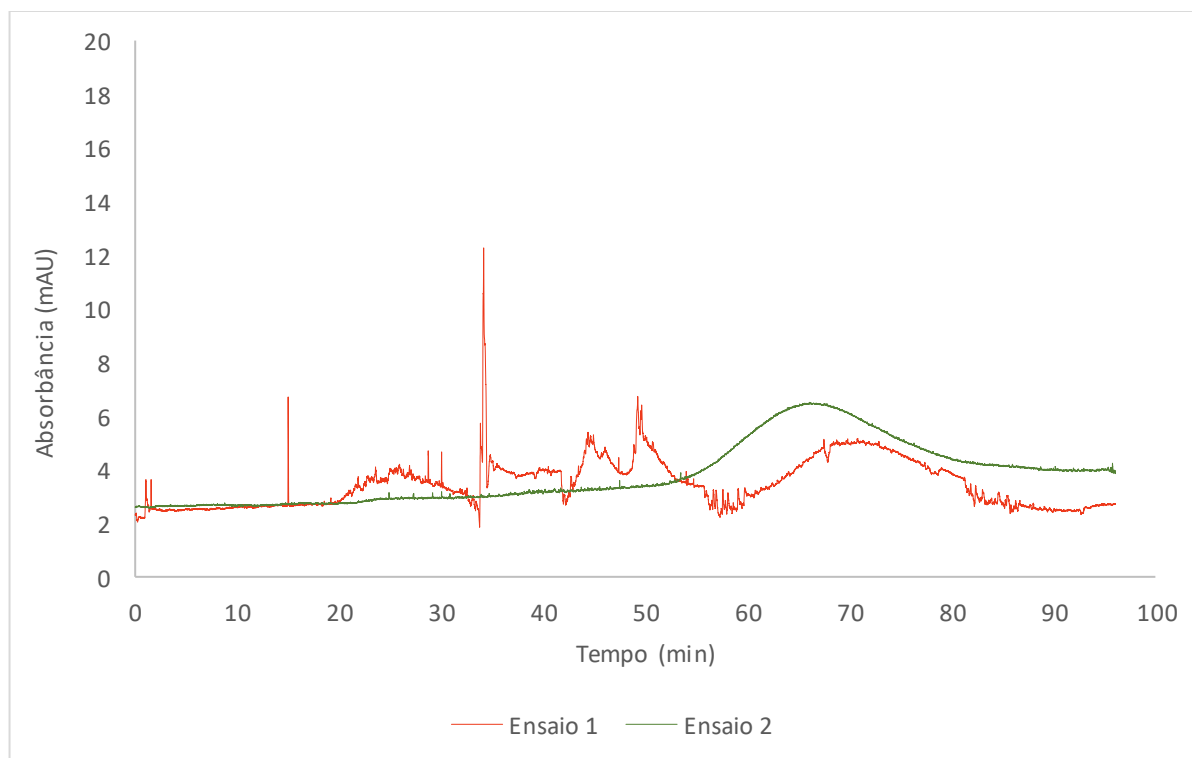
APÊNDICE A

Figura A1 – Partição (da esquerda para direita) do colorante vermelho produzido por *Talaromyces amestolkiae*, e colorantes comerciais vermelho de fenol, verde brilhante e verde malaquita em sistema aquoso bifásico composto por (%m/m) 19,5 K_2HPO_4 + 19,5 Etanol + 61,0 H_2O .



Fonte: o autor.

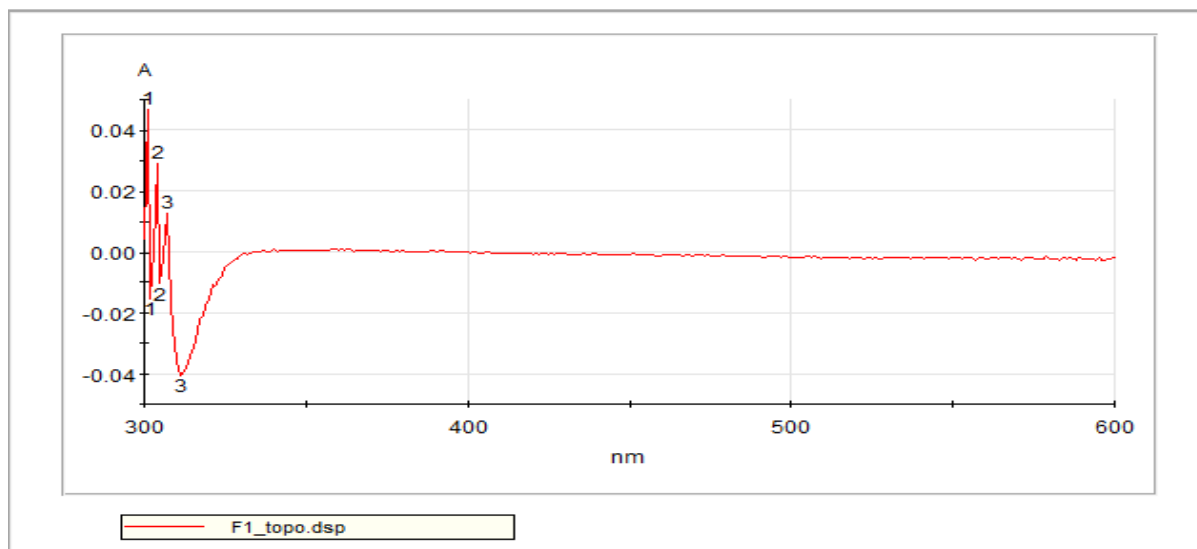
Figura A2 – Partição de L-tirosina [0,2135 g/L] em K_2HPO_4 /Etanol/ H_2O no CPC, em modo ascendente, $F = 2$ mL/min e $\omega = 600$ rpm.



Fonte: o autor.

Nota: detecção da L-tirosina em 275 nm. F = fluxo de fase móvel e ω = velocidade de rotação da coluna.

Figura A3 – Perfil de varredura da fração F1 coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .

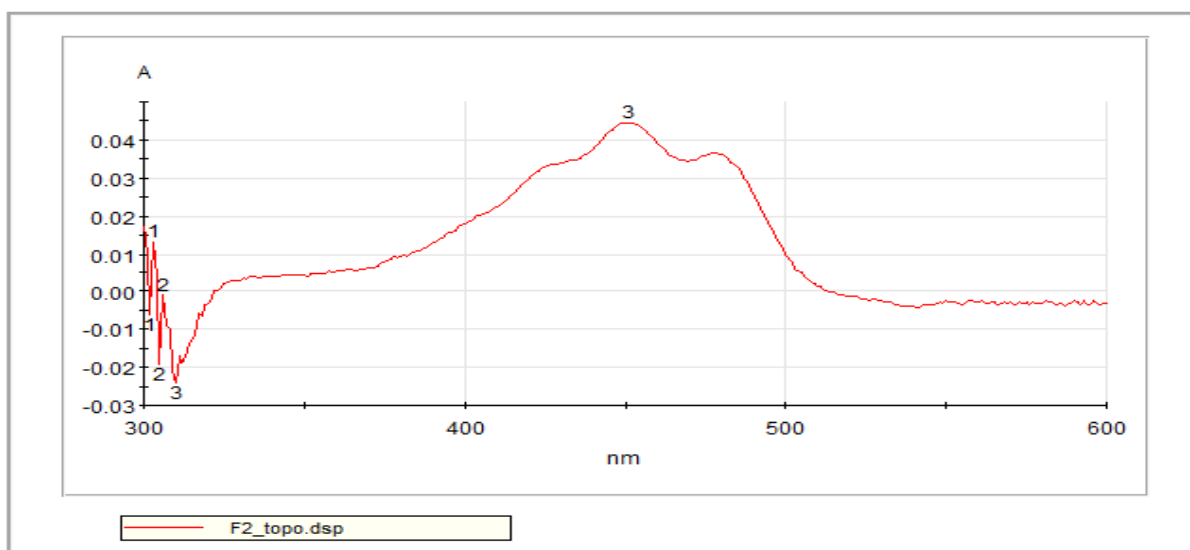


F1_topo.dsp

Máximo	Limite: 0,01 A				
1 301 nm;	0,047 A	2 304 nm;	0,029 A	3 307 nm;	0,013 A
Mínimo	Limite: 0,01 A				
1 302 nm;	-0,016 A	2 305 nm;	-0,010 A	3 311 nm;	-0,041 A

Fonte: o autor.

Figura A4 – Perfil de varredura da fração F2 coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .

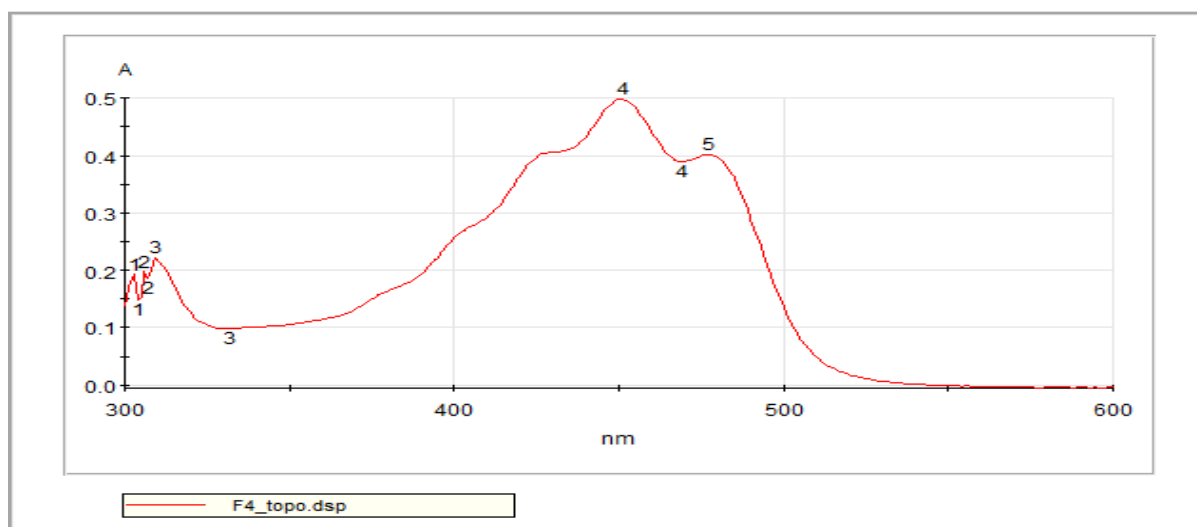


F2_topo.dsp

Máximo		Limite: 0,01 A	
1	303 nm; 0,013 A	2	306 nm; -0,001 A
3	451 nm; 0,045 A		
Mínimo		Limite: 0,01 A	
1	302 nm; -0,006 A	2	305 nm; -0,019 A
3	310 nm; -0,024 A		

Fonte: o autor.

Figura A5 – Perfil de varredura da fração F4 coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .

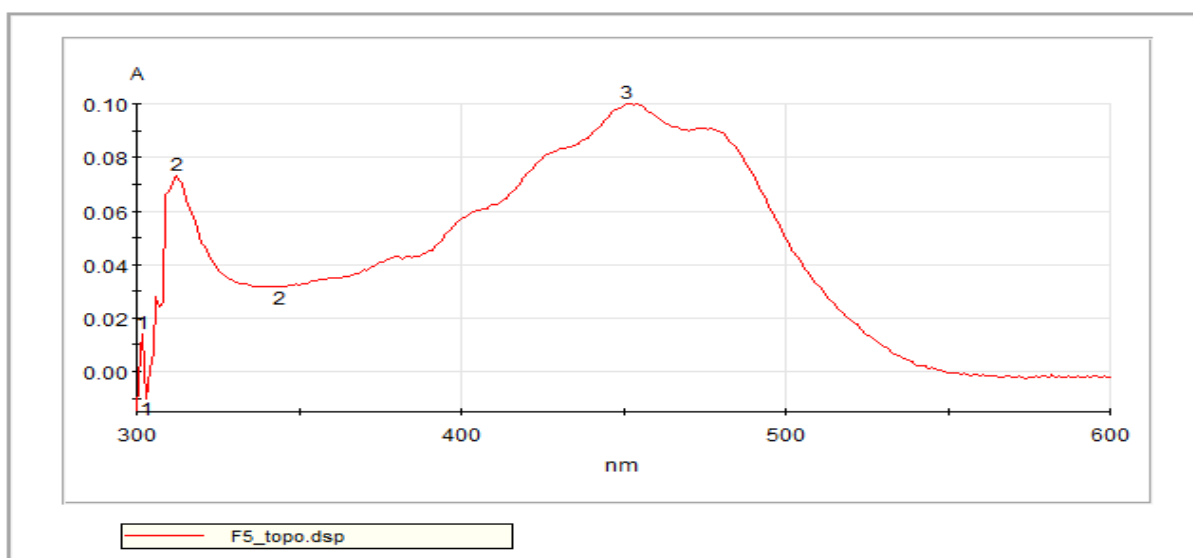


F4_topo.dsp

Máximo		Limite: 0,01 A	
1	303 nm;	0,192 A	2 306 nm;
4	451 nm;	0,497 A	5 477 nm;
			0,198 A
			0,402 A
			3 309 nm;
			0,223 A
Mínimo		Limite: 0,01 A	
1	304 nm;	0,149 A	2 307 nm;
4	469 nm;	0,390 A	3 332 nm;
			0,098 A

Fonte: o autor.

Figura A6 – Perfil de varredura da fração F5 coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .

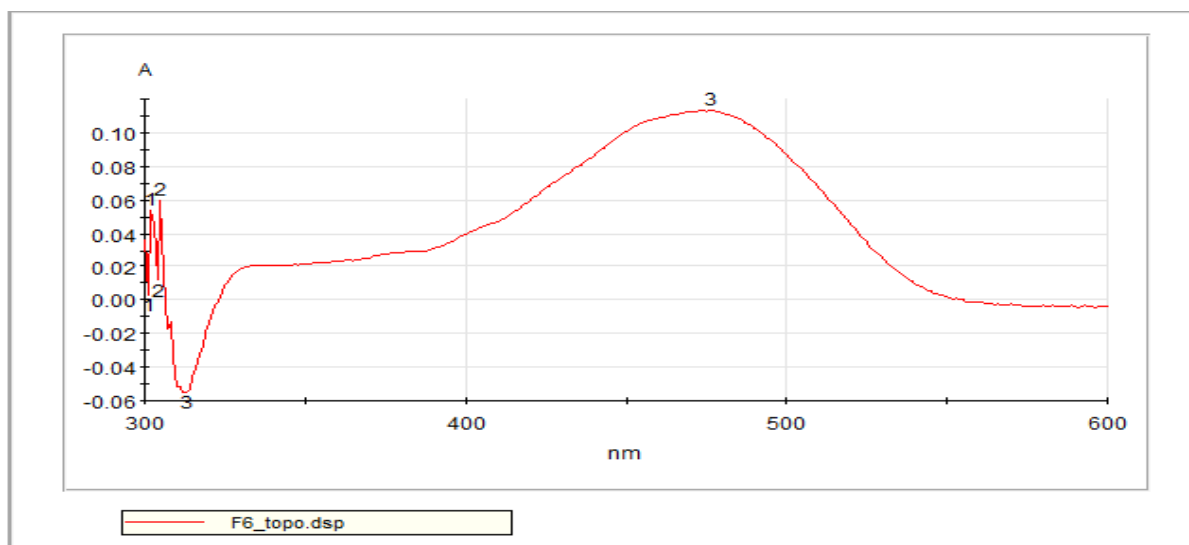


F5_topo.dsp

Máximo	Limite: 0,01 A			
1 302 nm;	0,014 A	2 312 nm;	0,073 A	3 451 nm; 0,100 A
Mínimo	Limite: 0,01 A			
1 303 nm;	-0,010 A	2 344 nm;	0,031 A	

Fonte: o autor.

Figura A7 – Perfil de varredura da fração F6 coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .

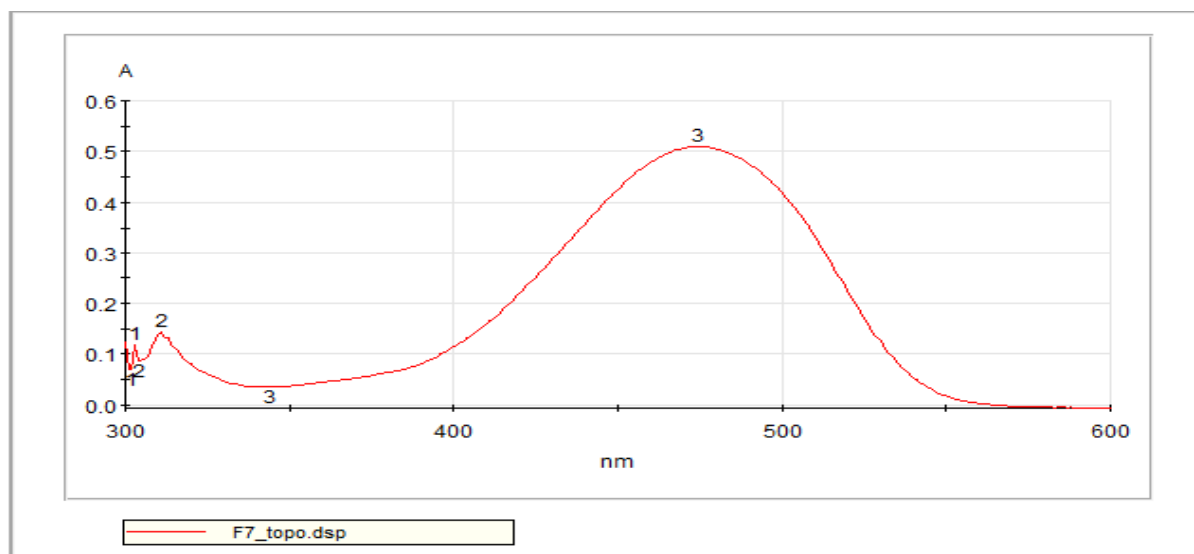


F6_topo.dsp

Máximo	Limite: 0,01 A				
1 302 nm;	0,054 A	2 305 nm;	0,060 A	3 476 nm;	0,113 A
Mínimo	Limite: 0,01 A				
1 301 nm;	0,003 A	2 304 nm;	0,012 A	3 313 nm;	-0,055 A

Fonte: o autor.

Figura A8 – Perfil de varredura da fração F7 coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .

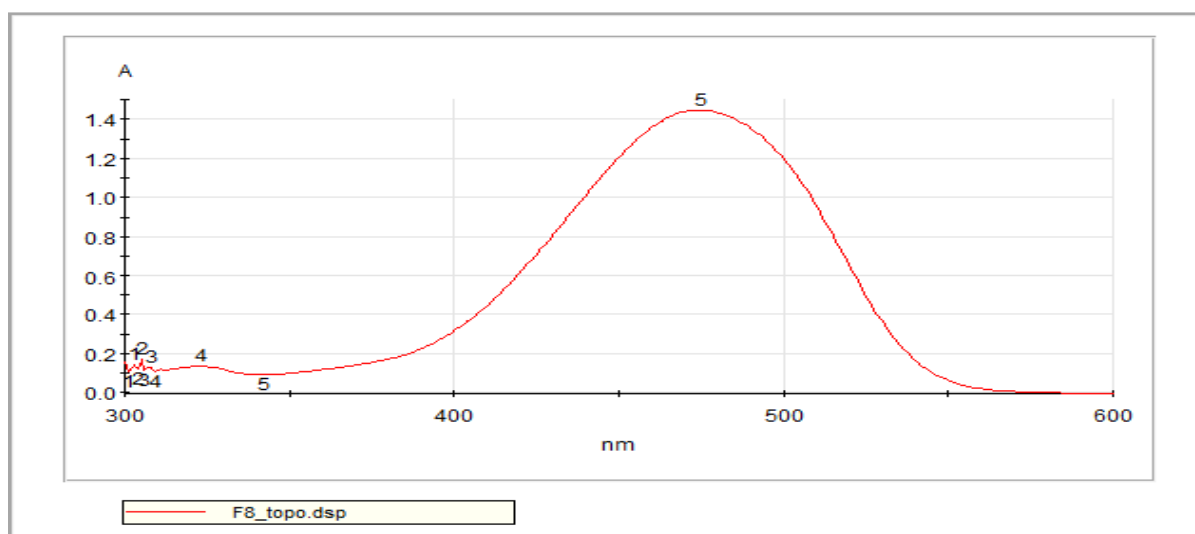


F7_topo.dsp

Máximo		Limite: 0,01 A	
1	303 nm;	0,117 A	2 311 nm; 0,144 A
3	474 nm;	0,510 A	
Mínimo		Limite: 0,01 A	
1	302 nm;	0,069 A	2 304 nm; 0,086 A
3	344 nm;	0,035 A	

Fonte: o autor.

Figura A9 – Perfil de varredura da fração F8 coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .

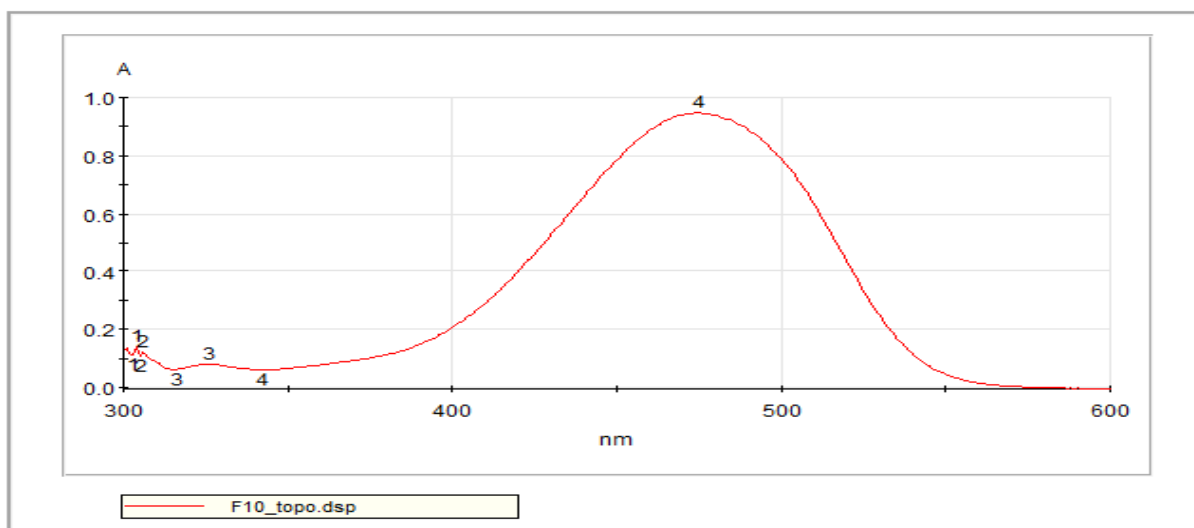


F8_topo.dsp

Máximo		Limite: 0,01 A			
1	303 nm;	0,142 A	2	305 nm;	0,168 A
4	323 nm;	0,136 A	5	475 nm;	1,447 A
3	308 nm;	0,129 A			
Mínimo		Limite: 0,01 A			
1	301 nm;	0,108 A	2	304 nm;	0,125 A
4	309 nm;	0,110 A	5	342 nm;	0,092 A
3	306 nm;	0,112 A			

Fonte: o autor.

Figura A10 – Perfil de varredura da fração F10 coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .

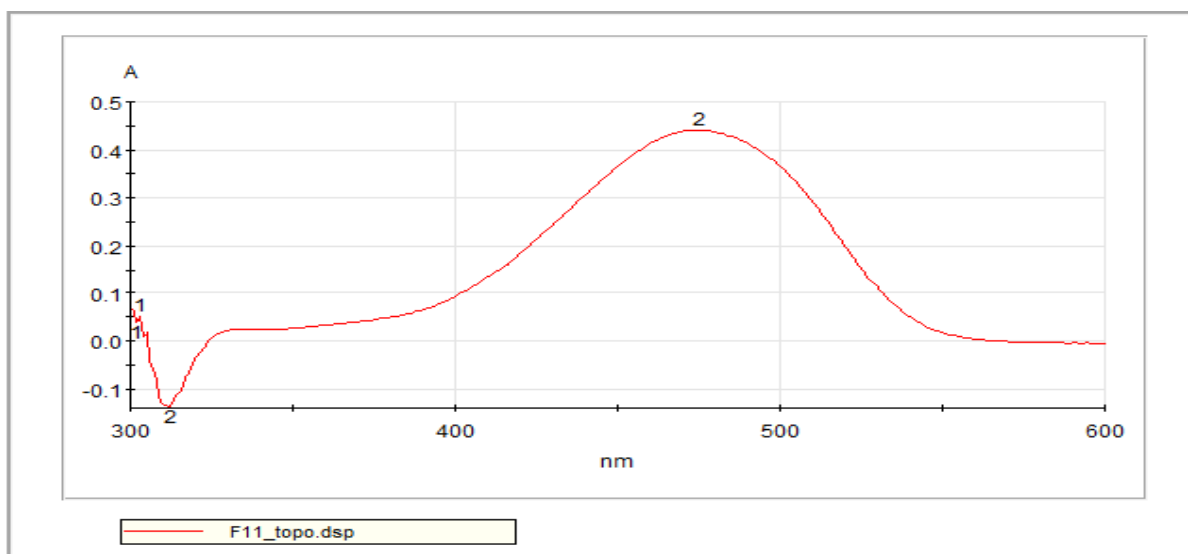


F10_topo.dsp

Máximo		Limite: 0,01 A			
1	304 nm;	0,139 A	2	306 nm;	0,120 A
4	475 nm;	0,947 A	3	326 nm;	0,080 A
Mínimo		Limite: 0,01 A			
1	303 nm;	0,112 A	2	305 nm;	0,108 A
4	342 nm;	0,061 A	3	316 nm;	0,061 A

Fonte: o autor.

Figura A11 – Perfil de varredura da fração F11 coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .

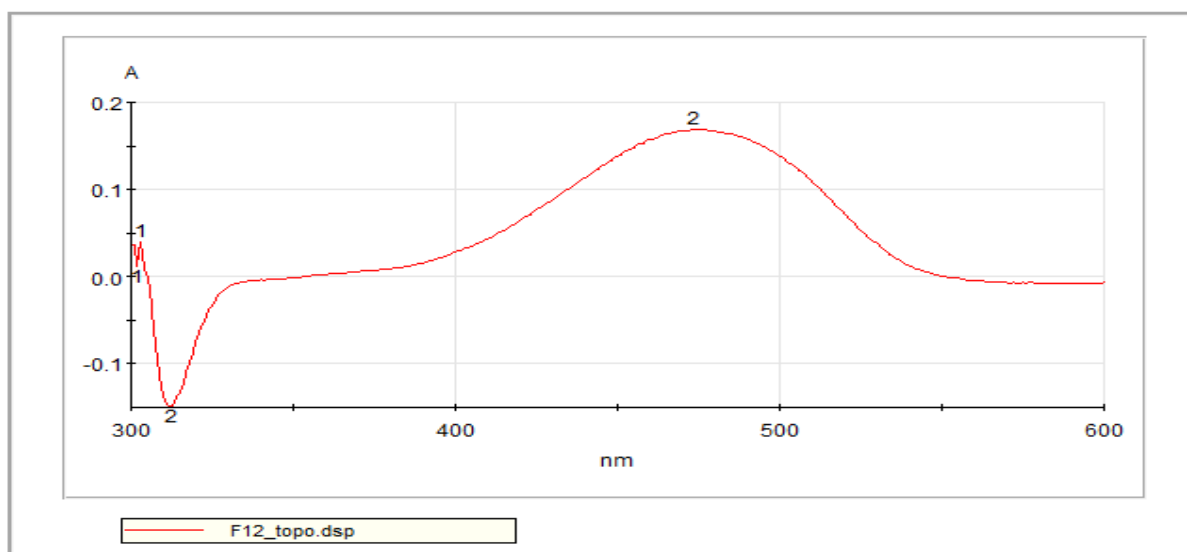


F11_topo.dsp

Máximo		Limite: 0,01 A	
1	303 nm;	0,051 A	2 475 nm; 0,441 A
Mínimo		Limite: 0,01 A	
1	302 nm;	0,037 A	2 312 nm; -0,136 A

Fonte: o autor.

Figura A12 – Perfil de varredura da fração F12 coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .

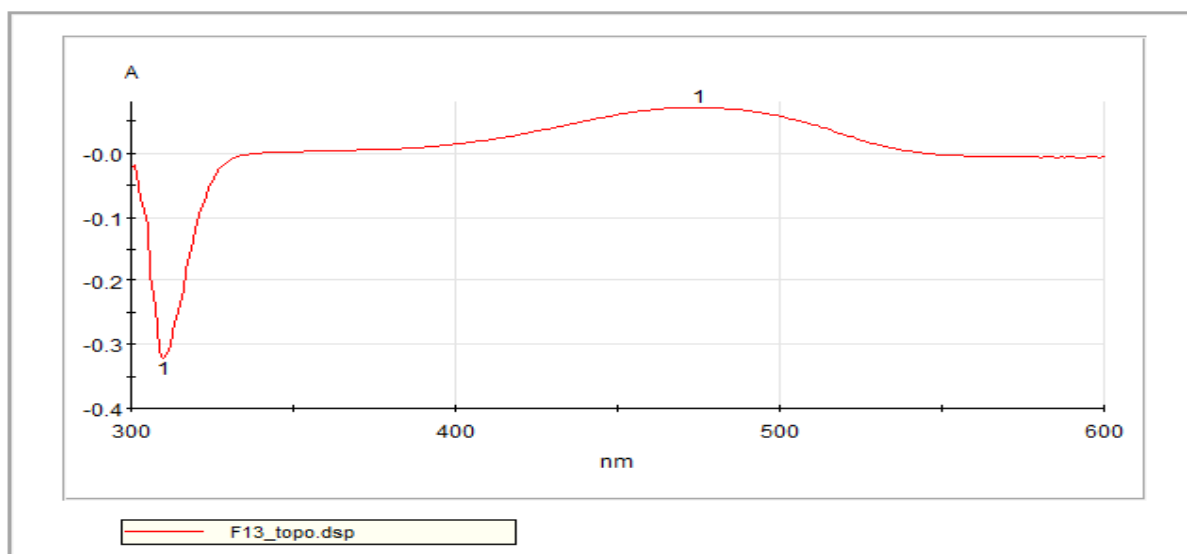


F12_topo.dsp

Máximo	Limite: 0,01 A	
1 303 nm;	0,040 A	2 473 nm; 0,169 A
Mínimo	Limite: 0,01 A	
1 302 nm;	0,013 A	2 312 nm; -0,149 A

Fonte: o autor.

Figura A13 – Perfil de varredura da fração F13 coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .

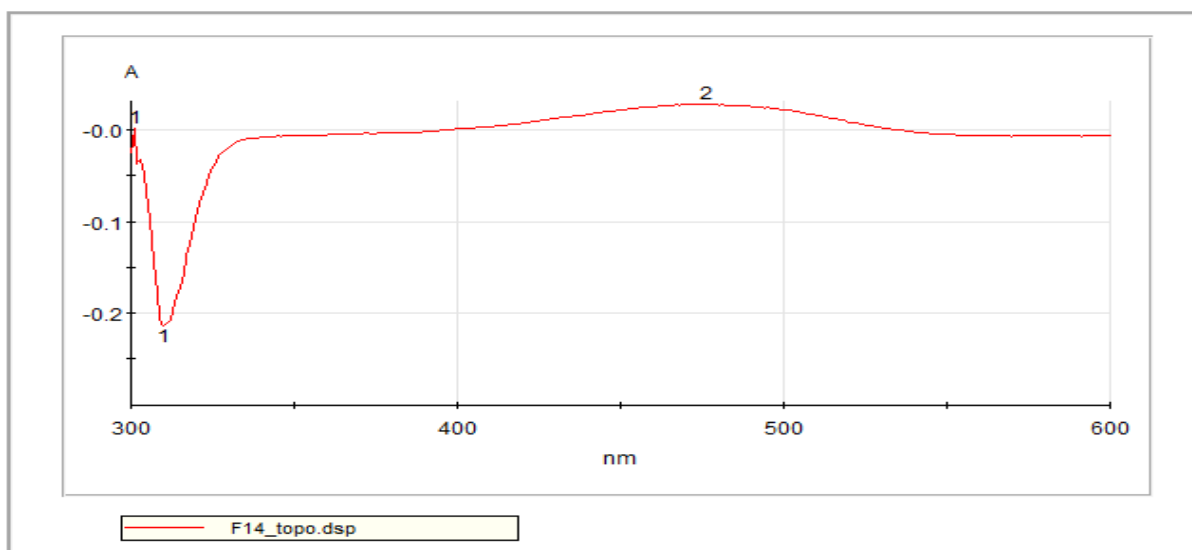


F13_topo.dsp

Máximo	Limite: 0,01 A
1 475 nm;	0,072 A
Mínimo	Limite: 0,01 A
1 310 nm;	-0,323 A

Fonte: o autor.

Figura A14 – Perfil de varredura da fração F14 coletada em CPC em ensaio de separação de astaxantina e β -caroteno comerciais em sistema aquoso-orgânico composto de etanol + acetona + hexano + H_2O .



F14_topo.dsp

Máximo Limite: 0,01 A
 1 301 nm; 0,001 A 2 476 nm; 0,027 A
 Mínimo Limite: 0,01 A
 1 310 nm; -0,213 A

Fonte: o autor.

Tabela A1 – Absorbâncias de astaxantina (479 nm) e β -caroteno (451 nm), em triplicata, e coeficientes de partição (K_D) em sistema aquoso-orgânico (% v/v): 25% Etanol + 25% Acetona + 25% Hexano + 25% H_2O .

	Astaxantina (479 nm)			β -caroteno (451 nm)		
Fase de topo	0,4280	0,4318	0,4245	10,7640	7,7500	8,8580
Fase de fundo	0,1364	0,1336	0,1352	0,0972	0,1080	0,1088
K_D	3,1377	3,2321	3,1398	110,7407	71,7593	81,4154
K_D médio	3,1699 ($\pm$ 0,0538)			87,9718 ($\pm$ 20,3009)		

Fonte: o autor.