



**Ana Margarida
Gonçalves Ferreira**

**Efeito de alta pressão na diálise de uma solução de
uma proteína com sal**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2011

**Ana Margarida
Gonçalves Ferreira**

**Efeito de alta pressão na diálise de uma solução de
uma proteína com sal**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Jorge Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família e amigos, pelo apoio, compreensão e carinho demonstrado durante o meu percurso académico.

o júri

presidente

Prof. Doutor José Joaquim Costa Cruz Pinto
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Teresa Maria Ribeiro da Silva Brandão
Investigadora Auxiliar do Departamento/Faculdade da Universidade Católica Portuguesa

agradecimentos

Em primeiro lugar, queria agradecer ao meu orientador Doutor Jorge Saraiva pelo apoio, disponibilidade, e pelos conhecimentos que me transmitiu ao longo do desenvolvimento deste trabalho

Queria agradecer do fundo do coração aos meus Pais e irmãos, que estiveram sempre lá para mim, especialmente à minha irmã Susana, por sempre me ter apoiado nos momentos em que precisei para a realização deste trabalho

Queria agradecer aos meus amigos Marina Matos, Cristina Ferreira, Ana Catarina Santos, Luísa Marinho, Anabel Oliveira, Filipe Silva, Cirilo Rocha, Luís Carta, José, Duarte Lima, Pedro Correia, João Davim, Ana Margarida pelo carinho demonstrado e pela ajuda prestada.

Queria deixar também um grande abraço e um grande obrigado ao Ângelo Correia e ao Mickael Santos, pelo apoio e ajuda prestados ao longo da realização deste trabalho.

palavras-chave

Diálise, purificação de proteínas, alta pressão hidrostática, sal (NaCl), difusão de sal

resumo

O principal objectivo deste trabalho consistiu no estudo da influência da alta pressão hidrostática na diálise de uma solução salina com uma proteína, no sentido de tentar acelerar a difusão de sal e conseqüentemente tentar diminuir o tempo de diálise. A proteína utilizada foi a Albumina Sérica Bovina (BSA) e o sal presente na solução foi NaCl. A diálise foi efectuada com um volume de retentato (ou seja de solução a dialisar) de 5 ml, e com um volume de dialisado de 30 ml, constituído por água destilada.

A quantidade de NaCl presente nas soluções foi primeiro determinada pelo método condutivimétrico e posteriormente pela titulação de Volhard, e a quantidade de BSA foi determinada através do teste de Biureto. Foram medidos os volumes iniciais e finais do retentato e dialisado para cada ensaio. Comparando o ensaio realizado à temperatura de 4°C à pressão atmosférica com o ensaio realizado à temperatura ambiente, verificou-se que a difusão de sal a 4°C foi um pouco mais lenta.

Nos ensaios realizados sob alta pressão hidrostática, os resultados obtidos demonstram que a aplicação da alta pressão hidrostática favorece o processo de diálise, acelerando a saída de sal do retentato para o dialisado.

Em todos os ensaios realizados a variação de volume do dialisado e retentato mostrou que ocorreu difusão de água do dialisado para o retentato, ou seja, em sentido contrário à difusão de sal. Esta variação foi irregular, com alguma perda de volume em alguns ensaios, devido a uma execução experimental que não foi a mais eficiente por limitações volumétricas do aparelho de alta pressão disponível.

Determinaram-se os coeficientes de difusão efectiva (m^2/s) do sal do retentato para o dialisado através da aplicação do modelo da solução da 2ª Lei de Fick para a geometria de um cilindro finito. Para o ensaio à Pressão Atmosférica o valor de coeficiente de difusão efectiva obtido foi de $1,12 \times 10^{-8}$ e para o ensaio à temperatura de 4°C foi de $1,28 \times 10^{-8}$. Para os ensaios sob alta pressão, para 100 MPa o coeficiente de difusão calculado foi de $3,16 \times 10^{-8}$, para 200 MPa foi de $8,20 \times 10^{-8}$ e para 300 MPa o valor encontrado foi de $4,42 \times 10^{-8}$. Como trabalho futuro, seria interessante tentar verificar se se comprovam os mesmos resultados mas para pressões mais baixas (como 50 MPa), o que significaria menos custos de aplicação. Testar a aplicação de alta pressão com volumes maiores de solução inicial seria também importante.

keywords

Dialysis, purification of proteins, high hydrostatic pressure, salt (NaCl), salt diffusion

abstract

The main objective of this work was to study the influence of high hydrostatic pressure on the dialysis of a saline solution with a protein, in order to try to accelerate the salt diffusion, and consequently reduce the duration of dialysis. The protein used was Bovine Serum Albumin (BSA) and the salt NaCl. Dialysis was performed with 5 ml of dialysis solution and 30 ml of dialysate, consisting of distilled water.

The amount of NaCl in the solutions was first determined by conductivity and then confirmed with the Volhard chemical standard method. The amount of BSA was determined using the Biuret test. The volumes of every solution were measured in the beginning and in the end of every dialysis.

Comparing the test performed at 4°C and atmospheric pressure with the test performed at room temperature it was found that the diffusion of the salt at 4°C was slightly slower.

The results of the tests conducted under high pressure demonstrate that the application of high hydrostatic pressure favors the dialysis, accelerating the removal of salt from the retentate to dialysate.

In all tests, the volume change of dialysate and retentate showed that occurred diffusion of water from the dialysate to the retentate, in the opposite direction to the diffusion of salt. This was irregular, with some loss of volume in some tests, due to an experimental implementation that was not the most efficient, because of volumetric limitations of the high pressure equipment used

The diffusivities (m^2/s) of salt were determined for each test based on the solution of Fick's second law from a finite cylinder. For the test performed at atmospheric pressure the value found was $1,12 \times 10^{-8}$, and for the temperature of 4°C the value obtained was $1,28 \times 10^{-8}$. For the high pressure tests, for the pressure of 100 MPa the value found was $3,16 \times 10^{-8}$, for 200 MPa the value obtained was $8,29 \times 10^{-8}$ and for 300 MPa the value found was $4,42 \times 10^{-8}$.

As future work, it would be interesting to run the same tests for lower pressures (e.g. 50 MPa), which would result in lower implementation costs. It would also be important to make the same tests but with a larger volume of initial solution.

Símbolos e abreviaturas

Ag^+ - Ião prata

AgCl - Cloreto de prata

AgNO_3 - Nitrato de prata

BSA - Proteína albumina sérica bovina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

Cl^- - Ião cloreto

φ - Coeficiente osmótico

k - Constante cinética de uma reacção química

K - Constante de equilíbrio de uma reacção química

C - Concentração de solutos (mol/L)

R - Constante ideal dos gases ($\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

l - Comprimento do cilindro (m)

Da - Daltons

D_{es} - Coeficiente de difusividade efectiva do NaCl (m^2/s)

KSCN - Tiocianato de potássio

MWCO - Molecular weight cut- off

MPa - Mega pascal

NaCl - Cloreto de sódio

Fe^+ - Ião ferro

$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - Indicador alúmen férrico

$\text{Fe}(\text{SCN})^{+2}$ - Tiocianato de ferro

F_o - Número de Fourier

i - Número de iões formado pela dissociação do soluto

PM - Peso molecular (g/mol)

P - Pressão (atm)

π - Pressão osmótica (mmHg, ou mol/s)

r - Raio do cilindro (m)

T - Temperatura (K)

ΔV^* - Variação de volume do sistema reaccional (cm^3/mol)

V_a - Volume de activação da reacção (cm^3/mol)

SCN^- - Ião tiocianato

S_0 - Concentração de sal na solução inicial (%)

S_∞ - Concentração de sal no equilíbrio (%)

S_t - Concentração de sal para qualquer tempo (%)

α - Rácio de volume de retentato e volume de dialisado utilizado nos ensaios experimentais

$S_r = \frac{(S_t - S_\infty)}{(S_0 - S_\infty)}$ - Rácio de soluto difundido

Índice

Símbolos e abreviaturas	VII
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas	XIV
Introdução.....	1
Capítulo I Revisão Bibliográfica	3
1.1. Separação por membranas	3
1.1.1. Osmose/ Pressão Osmótica.....	6
1.2. Diálise	7
1.2.1. Membrana.....	11
1.2.2. Dispositivos de diálise	12
1.2.3. Aplicações gerais da diálise.....	15
1.3. Tecnologia de alta pressão	16
1.4. Transferência de massa – Teoria.....	22
1.4.1. Determinação de coeficientes de difusividade a partir da 2ª Lei de Fick. 22	
1.4.2. Solução da 2ª Lei de Fick para o caso de um cilindro finito	22
Capítulo II Materiais e Métodos.....	25
2.1. Preparação da solução a dialisar	25
2.2. Esquema experimental	25
2.2.1. Membrana utilizada	25
2.2.2. Método de lavagem da membrana.....	25
2.2.3. Dispositivo experimental.....	26
2.3. Estimativa da quantidade de NaCl pelo método condutivimétrico.....	27
2.4. Determinação do conteúdo de NaCl pelo método químico	27
2.5. Determinação da quantidade de proteína BSA - Método de Biureto.....	28
2.6. Tratamentos de alta pressão	29
Capítulo III Análise e Discussão de Resultados.....	31
3.1. Ensaio preliminares	31
3.1.1. Quantificação de NaCl mediante o método condutivimétrico e método de Volhard 31	
3.1.2. Quantificação da proteína BSA pelo método de Biureto	33
3.2. Ensaio experimentais.....	34
3.2.1. Ensaio realizado à pressão atmosférica	34
3.2.2. Ensaio realizado à temperatura de 4°C	40

3.2.3. Ensaio realizado à pressão de 100 MPa.....	43
3.2.4. Ensaio realizado à pressão de 200 MPa.....	46
3.2.5. Ensaio realizado à pressão de 300 MPa.....	49
3.2.6. Comparação entre os ensaios realizados: Pressão atmosférica, 100, 200 e 300 MPa	53
3.2.7. Determinação da velocidade de transferência de sal/Coefficientes de difusão efectiva de NaCl	57
Capítulo IV Conclusão	61
Capítulo V Trabalho Futuro	63
Bibliografia.....	65
Anexo A: Tabelas Auxiliares.....	69
Anexo B: Equações Auxiliares	77

Índice de Figuras

Figura 1: Representação do conceito de osmose em que a membrana é apenas permeável ao solvente (imagem à esquerda), e pressão osmótica (imagem à direita) ^[5]	6
Figura 2: Esquema representativo de uma diálise (as setas que atravessam a membrana indicam o sentido do fluxo de solvente e solutos e a oval a tracejado a membrana de diálise) ^[3]	9
Figura 3: Esquema relacionado com a preparação e execução experimental da membrana de diálise ^[8]	12
Figura 4: Dispositivo de uma microdiálise envolta numa esfera de vidro. Legenda da figura: 1) Câmara de vidro 2) Amostra 3) Membrana semi permeável 4) Base do dispositivo 5) Buraco do dispositivo 6) Dispositivo de microdiálise 7) Dialisado ^[17]	14
Figura 5: Dispositivo de Alta Pressão que existe na Universidade de Aveiro, e que foi utilizada nos ensaios experimentais.....	21
Figura 6: Frasco do dispositivo experimental de diálise.	26
Figura 7: Membrana de diálise, antes de ser colocada no dispositivo de diálise.	27
Figura 8: Condutividade (mS/cm) em função da concentração de NaCl (%) à temperatura ambiente, juntamente com a representação da recta que relaciona os valores experimentais na gama linear.	32
Figura 9: Representação gráfica da relação linear existente entre o método condutivimétrico e o químico.	32
Figura 10: Representação da linearidade existente entre a concentração da proteína e a sua absorvância a 540 nm relativamente ao teste de Biureto.	33
Figura 11: Ensaio experimental para testar a validade do método de Biureto quando existe presença de NaCl na solução de BSA (1mg/mL).....	34
Figura 12: Resultados obtidos para a transferência de sal do retentato para o dialisado para o ensaio realizado à pressão atmosférica, em % de NaCl.....	35
Figura 13: Representação da variável Sr em função dos tempos realizados nos ensaios experimentais.....	36
Figura 14: Variação de volume no retentato e dialisado no ensaio realizado a pressão atmosférica.	36
Figura 15: Membrana com a solução inicial de proteína e sal utilizada nos ensaios (imagem à esquerda) e membrana no fim do ensaio, quando se retirava do dispositivo experimental (imagem à direita).....	37

Figura 16: Variação da massa de NaCl (em g) ao longo do tempo, assim como da massa total das amostras.	38
Figura 17: Resultados do teste de biureto efectuado a algumas amostras de retentato. .	39
Figura 18: Comparação dos resultados obtidos para a difusão de sal do retentato para o dialisado dos ensaios realizados a 4°C e à pressão atmosférica, em % de NaCl.	40
Figura 19: Variação de volume no retentato e dialisado no ensaio realizado à temperatura de 4°C.	41
Figura 20: Variação da massa de NaCl (em g) no retentato e dialisado, e da massa total no ensaio realizado a 4°C.	42
Figura 21: Resultados obtidos para a transferência de sal do retentato para o dialisado para o ensaio realizado a 100 MP, em % de NaCl.	43
Figura 22: Variação de volume no dialisado e no retentato, em ml.	44
Figura 23: Variação da massa de NaCl (em g) tanto no retentato como no dialisado, assim como a variação de massa total deste sal no ensaio realizado a 100 MPa.	45
Figura 24: Resultados obtidos para a transferência de sal do retentato para o dialisado para o ensaio realizado a 200 MP, em % de NaCl.	46
Figura 25: Variação de volume no retentato e dialisado para o ensaio realizado a 200 MPa.	46
Figura 26: Variação da massa de NaCl (g) no dialisado, retentato e massa total do sal, no ensaio realizado a 200 MPa.	48
Figura 27: Resultados obtidos para a transferência de sal do retentato para o dialisado para o ensaio realizado a 300 MP, em % de NaCl.	49
Figura 28: Variação do volume de retentato e dialisado para cada ensaio, em ml.	50
Figura 29: Representação da gama linear para as primeiras experiências a 300 MPa. .	50
Figura 30: Variação da massa de NaCl do retentato, dialisado e massa total deste sal, em g, para cada experiência realizado a 300 MPa.	51
Figura 31: Massa de proteína BSA presente nas amostras realizadas a pressão atmosférica, 4°C, e 100, 200 e 300 MPa.	52
Figura 32: Representação gráfica da entrada de NaCl (%) para o dialisado dos ensaios à pressão atmosférica, 100 MPa, 200 MPa e 300 MPa.	53
Figura 33: Representação gráfica da saída de NaCl (%) do retentato dos ensaios à pressão atmosférica, 100 MPa, 200 MPa e 300 MPa.	53

Figura 34: Representação gráfica da entrada de NaCl (%) para o dialisado dos ensaios à pressão atmosférica, 100 MPa, 200 MPa e 300 MPa num intervalo de tempo inicial, até 30 minutos.	54
Figura 35: Representação gráfica de saída de NaCl (%) do retentato dos ensaios à pressão atmosférica, 100 MPa, 200 MPa e 300 MPa num intervalo de tempo inicial, até 30 minutos.	54
Figura 36: Comparação da variação da massa de NaCl (g) no dialisado dos ensaios realizados à pressão atmosférica, 100, 200 e 300 MPa.	56
Figura 37: Comparação da variação da massa de NaCl (g) no retentato dos ensaios realizados à pressão atmosférica, 100, 200 e 300 MPa.	56
Figura 38: Determinação de velocidade de saída de sal para o ensaio realizado à pressão atmosférica.	57

Índice de Tabelas

Tabela 1: Resumo de processos de separação por membrana ^[2-3, 5]	5
Tabela 2: Perda e variação de volume entre dialisado e retentato, em ml.....	37
Tabela 3: Perda de volume (em ml) e variação de volume do retentato e dialisado (em ml) no ensaio realizado à temperatura de 4°C	41
Tabela 4: Perda de volume (em ml) e variação de volume do retentato e dialisado (em ml) no ensaio realizado à pressão de 100 MPa.....	44
Tabela 5: Perda de volumes (em ml) e variação de volume do retentato e dialisado (em ml) no ensaio realizado a 200 MPa	47
Tabela 6: Diferença de volumes entre retentato e dialisado (em ml) e variação do volume do retentato e dialisado (em ml) para o ensaio de 300 MPa.....	51
Tabela 7: Comparação da quantidade de NaCl (%) presente no retentato e dialisado, para o tempo de 5 minutos do ensaio realizado à pressão atmosférica e dos ensaios realizados na alta pressão (100,200 e 300 MPa).	55
Tabela 8: Comparação da massa de NaCl (g) presente no retentato e dialisado, para o tempo de 5 minutos do ensaio realizado à pressão atmosférica e dos ensaios realizados na alta pressão (100, 200 e 300 MPa).....	57
Tabela 9: Coeficientes de difusão efectivos e S_{∞} para os ensaios realizados.....	58

Introdução

Actualmente, existem diversos processos de separação, quer a nível industrial quer a nível laboratorial, que utilizam membranas como barreira física de separação. A composição da solução inicial e os compostos que se querem separar determinam qual o tipo do processo a aplicar, assim como o tipo de membrana a utilizar, de modo a que a separação seja suficientemente eficiente.

Para purificação de soluções com proteínas, a diálise é um dos processos de separação por membranas mais aplicados em técnicas laboratoriais. Numa diálise são envolvidas duas soluções, a solução inicial, denominada retentato, que é introduzida dentro de uma membrana fechada num volume muito maior de solução de um solvente (normalmente água destilada), que se designa como dialisado. Neste caso, os compostos que interessa separar e que permeiam a membrana são os solutos presentes na solução inicial, e a força motriz deste processo é a diferença de concentrações do soluto entre o retentato e o dialisado. Os compostos difundem-se da solução inicial para o solvente até se atingir o equilíbrio, ou seja, até que a concentração de solutos se iguale dentro e fora da membrana, enquanto que as macromoléculas (como proteínas) ficam retidas devido ao facto de terem um tamanho grande e não conseguirem permear os poros da membrana. Em sentido contrário à difusão de compostos ocorre um fluxo de solvente para dentro da membrana, diluindo a solução inicial.

As diálises com o intuito de purificar soluções de proteínas de compostos de menor peso molecular como iões possuem uma grande desvantagem: é um processo muito demorado, que pode levar várias horas até se atingir o nível de purificação desejada. A difusão é lenta, também devido ao facto deste processo decorrer normalmente a 4°C (temperatura favorável à conservação das proteínas), e as diversas trocas de solvente, são algumas questões que contribuem para a lentidão deste processo.

O objectivo proposto para esta tese é tentar acelerar um processo de diálise, diminuindo assim o tempo de operação deste, o que traria vantagens para a sua aplicação. Como tal, a solução que se propõe é a aplicação de pressão hidrostática, tentando assim acelerar os fluxos de difusão dos compostos envolvidos na diálise, e desta forma diminuir o tempo de operação. A tecnologia de alta pressão tem vindo a ser aplicada em situações semelhantes para tentar acelerar processos de difusão de solutos e solvente, nomeadamente a nível de alimentos, como no caso de desidratação osmótica.

Capítulo I Revisão Bibliográfica

1.1. Separação por membranas

A separação por membranas é utilizada em inúmeros processos industriais, em diferentes áreas, como a química, petroquímica, ambiental, farmacêutica, tratamento de águas, entre muitas outras. As suas aplicações incluem diálise para purificar o sangue humano (rim artificial), a utilização de electrodiálise para a obtenção de água potável, osmose inversa para remoção do sal da água do mar, ultrafiltração para concentrar as proteínas presentes em diversos alimentos (como queijo, leite, etc.) e microfiltração para esterilizar produtos médicos e farmacêuticos, cerveja, vinho e outro tipo de bebidas. O baixo custo associado a este tipo de separação, assim como o baixo consumo de energia durante a sua utilização, leva a que existam inúmeras aplicações para separações com membranas, sendo uma área com futuro e que sofreu uma grande evolução nas últimas duas décadas^[1-2].

As membranas usadas podem encontrar-se no estado líquido ou sólido, sendo que actualmente as líquidas são aplicadas na implementação de uma variedade de extracções líquido-líquido. Quando se lida com membranas sólidas semi-permeáveis, os dois fluidos envolvidos na separação normalmente encontram-se no estado líquido, em que um dos fluidos constitui a amostra (normalmente referida como “alimentação” ou “solução de Donner”), e o outro é designado como “receptor”. A membrana impede na maior parte dos casos o contacto directo entre as soluções, funcionando como barreira física entre estas. Este facto é muito importante para o caso de separações como a diálise, ultrafiltração e osmose inversa. Os diversos processos de separação por membranas caracterizam-se por, entre outros aspectos, o tipo de soluções a separar, força motriz que leva ao desenvolvimento do processo, componentes que ficam retidos na membrana e outros que a permeiam^[2-4].

De modo a que seja eficiente a separação de uma mistura de componentes, a membrana em questão deve possuir uma elevada relação de permeância para as duas espécies a serem separadas. A permeância para uma determinada espécie que se consegue difundir na membrana está relacionada com o coeficiente de transferência de massa, ou

seja, corresponde ao fluxo da espécie que atravessa a membrana por unidade de área da membrana e por unidade de força motriz (que pode ser para diferentes concentrações, força parcial etc.).

Na tabela 1 apresenta-se um resumo de diversos tipos de processos de separação por membranas.

Tabela 1: Resumo de processos de separação por membrana^[2-3, 5]

Processo	Soluções utilizadas	Força motriz	Componentes que permeiam preferencialmente a membrana	Natureza das espécies retidas (tamanho)
Diálise	Soluções aquosas	Diferença de concentrações	Solutos	>0,02 μm espécies retidas
Electrodiálise	Soluções aquosas	Campo eléctrico	Solutos	Iões, macro iões e água retida
Osmose inversa	Soluções aquosas de concentrações baixas Soluções orgânicas aquosas	Diferença de pressão (≤ 100 bar)	Solvente	1 a 10 Å espécies de microsolutos
Ultrafiltração	Soluções macromoleculares Emulsões	Diferença de pressão (≤ 10 bar)	Solvente	10 a 200- Å macrosolutos
Microfiltração	Suspensões Emulsões	Diferença de pressão (≤ 5 bar)	Fase Contínua	0,02 a 10 μm partículas
Permeação gasosa	Misturas gasosas Misturas vapor de água e gases	Diferença de pressão (≤ 80 bar)	O componente que for preferível permear a membrana	Espécies maiores retidas, excepto as que são muito solúveis
Pervaporação	Misturas orgânicas Misturas orgânicas aquosas	Lado permeado: relação entre a pressão parcial com a pressão de saturação	O componente que preferivelmente permear a membrana	Espécies maiores retidas, excepto as que são muito solúveis
Técnica da membrana líquida	Soluções aquosas de concentrações baixas	Diferença de concentrações	Soluto	Geralmente não é selectiva relativamente ao tamanho das espécies
Nanofiltração	Purificação de proteínas - Separação de compostos orgânicos e sais	Gradiente de pressão 1.5 – 40 bar	Solvente	Moléculas de peso molecular médio 500 < PM < 2000 (PM-Peso molecular em g/mol)

1.1.1. Osmose/ Pressão Osmótica

A osmose pode ser descrita como o movimento físico espontâneo de um solvente (em muitos processos este solvente é a água) através de uma membrana semi-permeável e que apenas deixa atravessar o solvente em questão, baseado na diferença do potencial químico entre as duas soluções envolvidas na separação. Esta diferença de potencial químico é causada pela diferença de concentração de solutos entre dois fluidos, em que um apresenta uma maior concentração comparativamente ao outro, o que gera pressão osmótica. O fluxo do solvente em direcção ao lado da membrana com a concentração mais elevada deixa de ocorrer quando ocorre igualdade dos potenciais químicos em ambos os lados da membrana^[1, 3, 5].

A pressão osmótica (π) é um conceito importante para estudar e compreender processos de diálise. Consiste na pressão que é necessário exercer para obrigar o fluxo de solvente através da membrana permeável apenas ao solvente. A pressão osmótica exercida pelas partículas em solução é determinada pelo número de partículas por unidade de volume, e pode ser calculada pela lei de Van't Hoff (equação 1)^[3-4].

$$\pi = RT(\varphi iC) \quad (1)$$

Em que φ é o coeficiente osmótico, e que depende da concentração de soluto, i é o número de partículas formado pela dissolução do soluto, C é a concentração de todos os solutos (mol/L), R é a constante ideal dos gases ($J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$) e T é a temperatura absoluta em Kelvin.

Na figura 1 está exemplificado o conceito de osmose e de pressão osmótica.

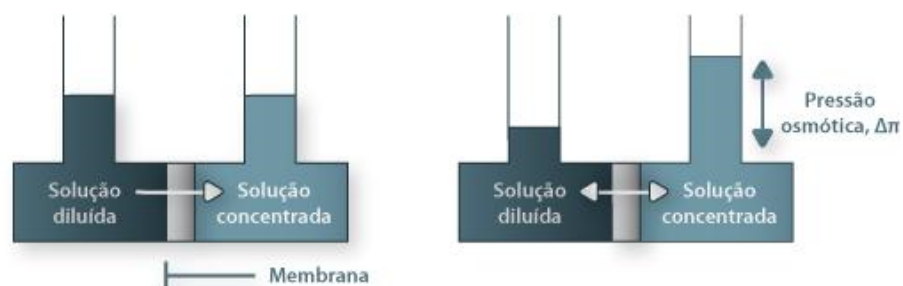


Figura 1: Representação do conceito de osmose em que a membrana é apenas permeável ao solvente (imagem à esquerda), e pressão osmótica (imagem à direita)^[5].

1.2. Diálise

O processo de diálise foi referido pela primeira vez em 1881 por Graham, que utilizava papel de pergaminho como membrana. As suas experiências basearam-se nas observações efectuadas por um professor, W.G. Schmidt, que mostravam que as membranas animais eram menos permeáveis a colóides do que a açúcar ou sal^[2]. Nos 100 anos seguintes, este processo de separação tornou-se uma técnica laboratorial muito usada para purificação de pequenas quantidades de solutos, e em alguns casos é utilizada em escala industrial^[2].

Realçando a utilização de diálises a nível laboratorial, foi nos anos 50 que este processo de separação ganhou popularidade, e artigos da altura referiam a diálise como uma ferramenta de ponta, que os investigadores podiam utilizar em misturas complexas, como biomacromoléculas. Existem duas grandes diferenças entre a diálise aplicada hoje em dia e a de antigamente: o tempo de preparação da membrana e a quantidade de perda de amostra, em que ambas diminuíram consideravelmente.

O fenómeno físico base da diálise é a difusão, que se pode definir como o movimento espacial e aleatório dos átomos, moléculas ou partículas, determinado pela energia térmica da própria partícula. A difusão é um processo espontâneo, que aumenta a desordem/entropia, e considera-se que um estado de equilíbrio de um sistema é aquele em que a entropia é máxima, a energia livre é mínima e os solutos estão uniformemente distribuídos pelo sistema. Se existir um gradiente de concentrações no sistema, o movimento individual dos solutos causa um movimento orientado dos locais de maior concentração para o de menor concentração, até ser atingido um estado de equilíbrio em que a distribuição de soluto é uniforme.

A diálise é um processo de separação que combina a remoção de solutos da amostra com a introdução de um novo solvente (que pode ser por exemplo água) na amostra. A solução a purificar, designada por alimentação ou retentato e que se encontra no estado líquido, contém solvente, solutos de baixo peso molecular e macromoléculas como por exemplo proteínas ou outro tipo de solutos. O retentato é a solução que é colocada dentro da membrana, ou seja, no saco de diálise. A membrana possui a característica de ser microporosa, o que leva a que os solutos de baixo peso molecular consigam atravessar, ao contrário dos restantes constituintes do retentato. Do outro lado da membrana encontra-

se o dialisado, que consiste numa quantidade enorme de solvente ou de um líquido relativamente ao retentato, onde está colocada a membrana e que não contém quaisquer tipos de solutos. A relação volume de retentato/volume de dialisado é um parâmetro importante a ter em conta, e é favorável ao processo que o volume do dialisado seja consideravelmente maior. Ocorre a difusão de solutos que conseguem permear a membrana do retentato para o dialisado devido à força motriz causada pela diferença de pressão osmótica da solução exterior e interior, ou seja, que existe nas duas interfaces da membrana. Não há transporte das macromoléculas, que devido ao seu tamanho não conseguem permear a membrana, ficando retidas na solução inicial de alimentação. Simultaneamente, ocorre difusão de solvente para o interior da membrana (osmose), também devido à diferença de pressão osmótica. Quando se está a lidar com uma amostra com elevada concentração de solutos ou de solvente orgânico na amostra, a osmose é o primeiro fenómeno a ocorrer na diálise antes da difusão do soluto, levando a um aumento considerável de volume do retentato nos instantes iniciais da diálise. Este é um processo que se realiza à pressão atmosférica^[2-3, 6-7].

Eventualmente, passado algum tempo do início da diálise, a concentração de solutos em ambos os lados equilibra, levando a que não exista diferença de pressão osmótica. A taxa de diálise abranda à medida que a concentração de solutos se aproxima do equilíbrio anteriormente referido. Este fenómeno leva a que a remoção completa dos solutos de uma amostra não ocorra apenas numa diálise, pois os compostos que se encontravam inicialmente dentro da membrana são distribuídos simultaneamente no solvente e no saco de diálise. Para resolver esta questão, troca-se o solvente que se encontra no exterior da membrana as vezes necessárias, para criar novamente diferença de pressão osmótica, até que a remoção do soluto atinja um valor aceitável. A agitação do dialisado é também uma solução muitas vezes aplicada para aumentar a taxa de diálise, e um sistema bem agitado pode atingir o equilíbrio a 90% em 2/3 horas. A utilização de um volume maior no exterior da membrana é preferível a um volume pequeno como já referido, pois permitirá separar uma quantidade dos solutos que permeiam a membrana, reduzindo o número de trocas de solvente^[8].

Na figura 2 está representado um esquema do processo de separação que decorre numa diálise.

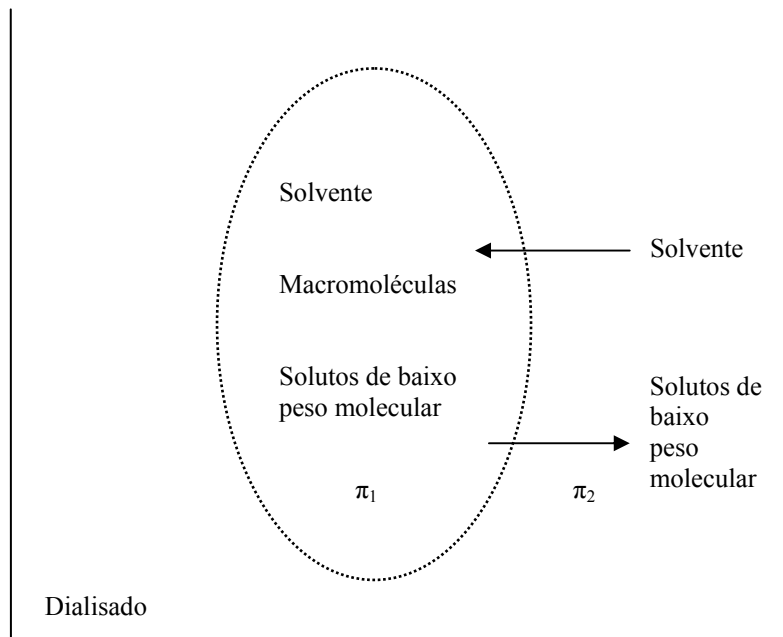


Figura 2: Esquema representativo de uma diálise (as setas que atravessam a membrana indicam o sentido do fluxo de solvente e solutos e a oval a tracejado a membrana de diálise)^[3].

A transferência relativa dos solutos através da membrana de diálise é função das difusividades pela membrana e das suas forças motrizes. O coeficiente de difusão expressa a velocidade individual das partículas, e está dependente da temperatura (quanto maior a temperatura maior a taxa de difusão). A separação é eficiente apenas para espécies que diferem de forma significativa relativamente ao parâmetro de coeficiente de difusão. Uma vez que os coeficientes de difusão são um parâmetro não muito influenciado pelo tamanho das moléculas, a diálise é limitada para separar espécies que possuem tamanhos bastante diferentes. Outra limitação deste processo de separação que se pode realçar consiste no facto de ser uma técnica eficiente apenas quando a concentração de solutos a ser separada é elevada, pois como já referido anteriormente os fluxos de transferência de massa dependem directamente do gradiente de concentrações transmembranar, sendo que esta é uma propriedade intrínseca das correntes de alimentação e do dialisado. Este factor não acontece noutra tipo de separações através de membranas, como por exemplo no caso da osmose inversa, em que os fluxos transmembranares dependem da pressão aplicada, e são independentes das propriedades dos caudais do processo. Quando o gradiente de

concentrações transmembranar é baixo, é possível melhorar o processo aumentando a área membranar, o que por sua vez pode comprometer a viabilidade económica do processo^[2, 4, 7].

Uma das aplicações mais recorrentes da diálise a nível laboratorial é a purificação e a concentração de soluções que contêm proteínas, por exemplo na preparação de amostras. Apesar de ser um procedimento simples e uma rotina bem estudada, apresenta duas grandes questões que em muitos casos são situações desvantajosas: a necessidade de trocar de dialisado, e o facto de demorar várias horas até estar concluída e ser caracterizada por ser um processo com taxas de fluxo baixas em comparação com outros processos de separação com membranas. Esta última consideração pode ser importante em determinadas circunstâncias, como no caso em que as espécies a separar são sensíveis à degradação mecânica quando sujeitas a stress mecânico^[2, 9]. O procedimento padrão que existe para uma diálise de proteínas é o seguinte: i) iniciar a diálise à temperatura ambiente durante duas horas; ii) Trocar o dialisado e colocar a amostra a dialisar durante mais duas horas à mesma temperatura; iii) Trocar o dialisado novamente e deixar a amostra a dialisar de noite à temperatura de 4°C o tempo necessário^[10]. Como se verifica neste protocolo, o tempo de operação de uma diálise pode ser muito elevado, e é uma variável que pode ser importante otimizar, de modo a que a diálise se torne cada vez mais vantajosa.

A temperatura à qual a diálise ocorre é outra variável importante do processo, e que afecta o coeficiente de difusão como já referido anteriormente. A temperatura é um parâmetro termodinâmico que afecta a difusão das moléculas pois um aumento de temperatura significa um aumento de energia para o movimento livre das partículas, o que faz aumentar a sua difusão favorecendo o processo de diálise. A maior parte das diálises que envolve proteínas é efectuada à temperatura de 4°C para minimizar as perdas de actividade biológica e de modo a que as proteínas envolvidas não sofram desnaturação.

O facto de se realizar a esta temperatura faz aumentar o tempo de diálise, tornando-a mais lenta do que se se realizasse à temperatura ambiente^[6, 8, 11]. Para melhorar o tempo de operação da diálise, não é viável aumentar a temperatura devido ao facto de que as proteínas constituintes da amostra podem sofrer degradação térmica, como já referido, e é por isso importante procurar outras soluções mais viáveis para se conseguir melhorar este parâmetro importante de uma diálise.

1.2.1. Membrana

A membrana é a chave de um processo de diálise. Como já referido anteriormente, é semi-permeável, usualmente constituída por acetato de celulose e contém poros de tamanho conhecido que deixam os solutos de baixo peso molecular passar, retendo os compostos de elevado peso molecular (como por exemplo proteínas e ácidos nucleicos). As membranas usadas em laboratório têm uma espessura de 12-30 μm , poros de diâmetro na ordem dos Å , não deixando passar solutos maiores do que 15000 a 20000 Da^[10]. A membrana deve garantir uma boa relação entre a difusão dos compostos de baixo peso molecular e a sua estrutura, de modo a que a separação seja o mais eficiente possível.

As duas dimensões críticas que se deve ter em consideração relativamente à escolha da membrana são o diâmetro desta e o tamanho nominal do poro da membrana, também denominado como “cut-off” ou MWCO (Molecular Weight Cut-Off). O MWCO de uma membrana é uma medida baseada no tamanho das moléculas que não conseguem atravessar a membrana. É uma boa prática escolher uma membrana com um “cut-off” significativamente abaixo do peso molecular da proteína presente na solução a dialisar de modo a evitar perdas^[12].

Existem métodos para pré-preparar a membrana de diálise de modo a remover os compostos químicos utilizados na sua obtenção. Ferver a membrana numa solução com EDTA e NaHCO_3 é um dos procedimentos recomendados, assim como conservá-la numa solução com a mesma constituição. A contaminação com compostos químicos afecta mais as soluções com proteínas diluídas, pois a relação membrana/proteína é mais elevada.

Após secar a membrana, e de modo a preparar sacos de diálise, pode dar-se um ou dois nós numa das extremidades da membrana, e coloca-se o retentato dentro do saco de diálise; após este passo, fecha-se o saco de diálise dando um outro nó na outra extremidade da membrana, e por último coloca-se no meio do volume de dialisado, dando início à diálise. É importante deixar algum ar para expansão no saco de diálise quando se está a separar uma solução com uma concentração elevada de solutos, pois ocorre entrada de um volume elevado de solvente no saco. Se este espaço não for deixado, a expansão pode causar danos no saco e inviabilização do ensaio em si^[8].

Na figura 3 apresentam-se esquematicamente três situações relacionadas com a preparação da membrana: na situação a) mostra-se o enchimento da membrana com amostra no saco de diálise; situação b) mostra que a maior parte das diálises realiza-se com

agitação constante do dialisado, com o intuito de aumentar o fluxo de transferência de massa e diminuir o tempo de diálise, e c) mostra o aumento de volume de solução dentro da membrana devido à transferência de água do dialisado para o retentato devido às forças osmóticas^[8].

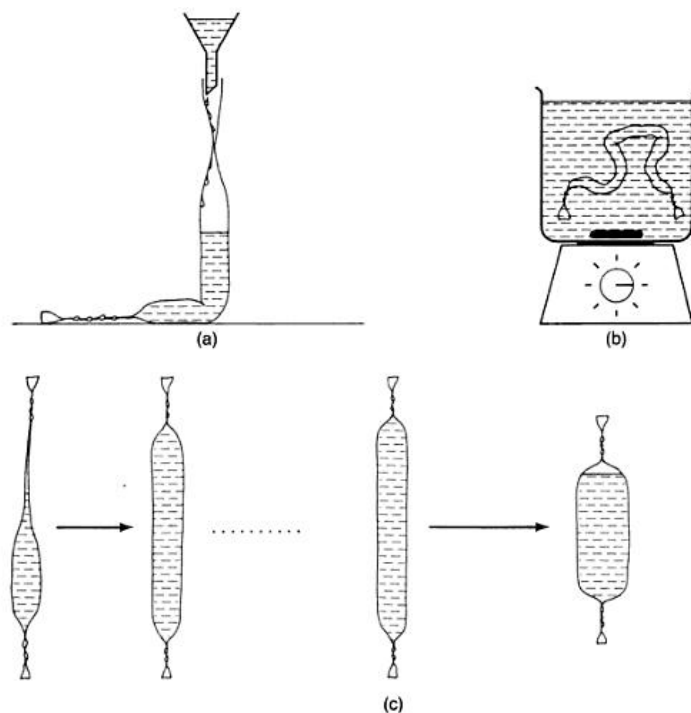


Figura 3: Esquema relacionado com a preparação e execução experimental da membrana de diálise^[8].

1.2.2. Dispositivos de diálise

Existem dispositivos de diálise mais elaborados, disponíveis comercialmente, que cobrem uma vasta gama de volumes de amostra, e que não são recomendados para volumes menores do que 500 μl , devido à fraca recolha de amostra. Os dispositivos comerciais para grandes volumes não se adequam a volumes pequenos, devido à recolha e perda de amostra quando se lida com volumes menores^[13]. Tem sido feita investigação no sentido de desenvolver microdializadores viáveis, e que tentem superar as limitações dos existentes: problemas relacionados com a recolha de amostra, possibilidade de evaporação de amostra, perda acidental devido à ruptura da membrana e entrada de ar entre a amostra e o dialisado^[14]. Como exemplo de dispositivos pesquisados, destaca-se a utilização de um tubo de microcentrifugação que funciona como microdializador, e também de um ensaio

que foi realizado com uma pipeta de Pasteur com o mesmo intuito. Ambos os dispositivos mostraram ser viáveis e práticos, e dos estudos realizados retiraram-se conclusões interessantes que podem abrir portas para mais investigação nesta área^[13-15]. Existe igualmente um dispositivo disponível para amostras de volumes de cerca de 10 µl, que são constituídos por polipropileno e celulose regenerada, e que já revelaram ser um avanço na área de preparação de amostras através de diálise de microvolumes^[10].

Nos casos de dispositivos para pequenos volumes, a relação área da membrana/volume a dialisar é normalmente elevada, pelo que o tempo de diálise é normalmente reduzido. Para amostras de maiores volumes, em que se usam mangas, esta relação é menor, o que leva a diálises mais demoradas. Nestes casos, é interessante desenvolver metodologias que possam acelerar a diálise, como é proposto ser provado com os ensaios nas experiências realizadas.

Nos dispositivos de diálise pode ser adicionada uma pressão hidráulica transmembranar como um componente adicional do transporte de massa convectivo. O fenómeno de transporte convectivo também pode ocorrer se um dos fluxos, usualmente o do retentato, estiver muito concentrado, o que aumenta o gradiente osmótico transmembranar, através do qual o solvente escoar. Nestas circunstâncias, a descrição do transporte de soluto torna-se mais complexa pois incorpora uma parcela da velocidade do fluido transmembranar ao processo de transferência de massa^[6-7].

A diálise, principalmente a nível de laboratório, considera-se que é um processo bastante demorado devido a enormes volumes de solução a separar, podendo levar várias horas ou dias para se obter uma separação dos componentes aceitável com várias trocas de solvente.

Foram já dados os primeiros passos no sentido de acelerar este processo de separação. Efectuaram-se ensaios para diminuir o tempo de diálise aumentando a pressão através de um dispositivo de extracção de solvente, com o intuito de separar xenobióticos orgânicos de triolina. O intervalo de pressão aplicada na experiência foi 3,45-15 MPa, sendo que se concluiu que a mais eficiente para o processo em questão era de 3,45 MPa. Os parâmetros que afectam o processo, nomeadamente pressão, temperatura, solvente e número de ciclos de diálise, foram optimizados com uma considerável redução de tempo de análise em comparação a diálise convencional, de 48h para 40 minutos (70 vezes mais rápido) com uma redução também do consumo de solvente. O facto de o processo ter sido

acelerado revelou-se adequado como um procedimento de limpeza para vários tipos de amostras de lípidos e outras matrizes complexas^[16]. O seu desempenho contínuo permite integrá-lo noutras etapas do processo analítico^[6, 15]. Resumindo, este estudo provou que é possível acelerar a taxa de diálise através da aplicação de pressão, reduzindo assim o seu longo tempo de operação.

Encontram-se igualmente dispositivos patenteados, e também já alguns disponíveis comercialmente, que se baseiam na mesma ideia de acelerar o processo de diálise. Um destes encontra-se representado na figura 4, que mostra um esquema experimental de uma microdiálise efectuada numa câmara esférica que favorece este processo de separação. O dispositivo possui uma tampa com um buraco que, quando esta é colocada, a membrana entra em contacto com o dialisado aumentando a taxa de diálise e ao mesmo tempo diminuindo o risco da amostras não serem dialisadas. A câmara de diálise possui uma tampa pesada de modo a assegurar o aumento de pressão e o bom funcionamento deste processo^[17].

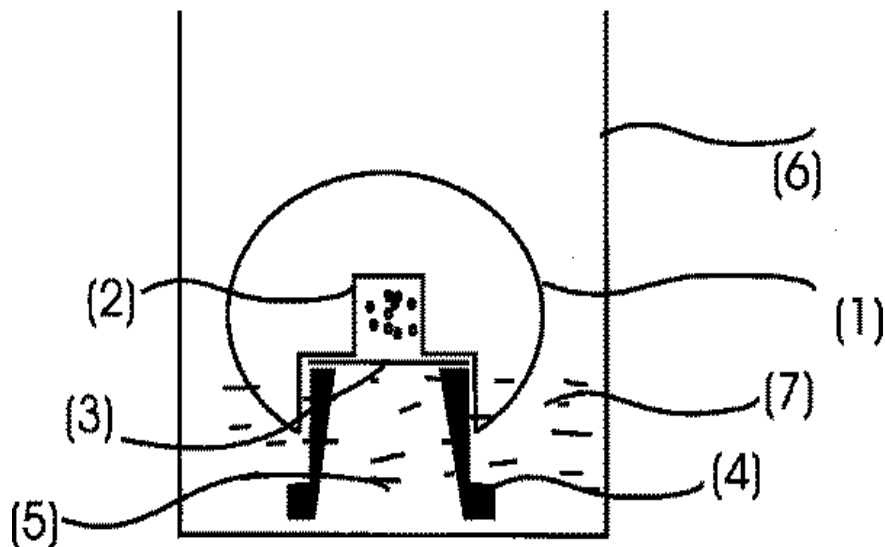


Figura 4: Dispositivo de uma microdiálise envolta numa esfera de vidro. Legenda da figura: 1) Câmara de vidro 2) Amostra 3) Membrana semi permeável 4) Base do dispositivo 5) Buraco do dispositivo 6) Dispositivo de microdiálise 7) Dialisado^[17]

Resumindo, foram já dados os primeiros passos no sentido de tentar acelerar a taxa de diálise e, conseqüentemente, tentar diminuir o tempo de diálise de modo a tentar ultrapassar esta desvantagem e assim trazer enormes benefícios, principalmente a nível laboratorial e mais especificamente no tratamento de purificação de soluções de proteínas.

A aplicação de uma elevada pressão hidrostática apresenta-se como a solução proposta para os ensaios realizados, e foi o objectivo proposto para o estudo efectuado e apresentado nesta tese.

1.2.3. Aplicações gerais da diálise

Até ao ano de 1960, muito poucas aplicações deste processo eram utilizadas em larga escala industrial, sendo que a mais importante consistia na separação de soluções de hidróxido de sódio concentrado que continham hemicelulose. A partir de 1960, a diálise ganhou importância na área da saúde, e uma das suas principais aplicações ainda hoje em dia consiste no tratamento artificial do sangue de pacientes com insuficiência renal, denominado hemodiálise. Este facto levou ao desenvolvimento de dispositivos inovadores de diálise e de novas membranas, e a diálise começou a ganhar relevância noutras áreas de aplicação. Em 1969, Schultz e Gerhardt analisaram o uso desta tecnologia como meio para controlar culturas de bactérias para diversas aplicações, e actualmente são efectuados inúmeros estudos para esta aplicação em sistemas microbiológicos^[2, 4]. Hoje em dia, a diálise é um processo rotineiro usado em química de proteínas, bioquímica, biotecnologia, laboratórios de biologia molecular e indústrias que envolvem a preparação de compostos bioquímicos, como por exemplo para remover sais de soluções contendo macromoléculas como proteínas. Outro exemplo que se pode destacar é na área de biotecnologia, em que é favorável aplicar esta tecnologia, pois os produtos a separar são por vezes frágeis e muitas vezes sensíveis ao calor, e a diálise é um processo que se pode desenrolar a qualquer temperatura.

A diálise tornou-se numa técnica relevante para a indústria da cerveja, no campo de redução e remoção do álcool. Podem-se referir outros tipos de aplicações, como a remoção de ácidos ou bases de certos produtos.

Em geral, as diálises são restritas para o uso em soluções aquosas, apesar de também poderem ser realizadas com solventes orgânicos, desde que se utilizem as membranas adequadas^[2].

1.3. Tecnologia de alta pressão

A aplicação de pressões elevadas na produção e na obtenção de produtos e alimentos é uma área recente que tem vindo a despertar cada vez mais interesse. Continua a oferecer novas oportunidades de desenvolvimento, e actualmente é importante para reacções e separações na indústria química e para actividades processuais diversas, como homogeneização, micronização, plastificação e tratamentos físico-biológicos, como pasteurização, esterilização e coagulação. Tem vindo a ser evidente, principalmente nas últimas décadas, que a alta pressão se poderá tornar numa das tecnologias mais importantes na área da qualidade a nível da indústria alimentar, e apresenta vantagens tanto a nível económico como ambiental, no desenvolvimento de mais processos e produtos sustentáveis para gerações futuras^[18-20].

Apesar do desenvolvimento de processos de alta pressão (que utilizam pressões de 100 a 1000 MPa aproximadamente) ter surgido nos anos vinte e trinta na área de materiais, a investigação desta tecnologia tem sido particularmente activa nas últimas duas décadas, criando inúmeras oportunidades em vastas áreas, como por exemplo na microbiologia, ciência de materiais, produção de produtos alimentares, farmacêuticos e cosméticos^[18, 21].

Esta técnica está inserida num campo muito específico, e que tem vindo a ser muito discutida por físicos, químicos e engenheiros químicos. O *scale-up* desta tecnologia, por ainda não estar muito desenvolvido, apresenta-se como uma das principais desvantagens desta tecnologia mas constitui simultaneamente o objectivo principal a atingir pela comunidade científica. O seu custo elevado, devido essencialmente ao capital inicial necessário, também é uma limitação importante a ter em conta.

O tratamento por alta pressão pode provocar diversos efeitos que podem ser distinguidos. O efeito químico passa por estimular a selectividade e a taxa das reacções químicas, conjugando a possibilidade de melhorar as propriedades e qualidade dos produtos a menor custo. O objectivo passa por melhorar as condições físico-químicas e termodinâmicas das reacções, como por exemplo a densidade, equilíbrio químico, entre outros. Relativamente ao efeito bio-físico-químico do tratamento por alta pressão, este está a ser predominantemente aplicado na indústria de produção de alimentos e de cosméticos. Para os processos de esterilização, este tipo de tratamento oferece uma alternativa ao tratamento com altas temperaturas. Existem ainda dois efeitos que estão a ser estudados

para abrir novas portas: os efeitos físico-hidronómico e o físico-hidráulico. O efeito físico-hidronómico está relacionado com a conversão da energia potencial em energia cinética, e pode servir, por exemplo, para homogeneizar misturas; por outro lado, o efeito físico-hidráulico é envolvido durante o transporte de fluidos através de uma grande pressão diferencial, como acontece no caso da filtração, entre outras aplicações^[18].

Fisicamente, a pressão hidroestática pode ser gerada adicionando energia livre como, por exemplo, fornecer calor a volume constante ou reduzir de forma mecânica o volume. O aumento de pressão sob um sistema, do ponto de vista da termodinâmica, segue o princípio de *Le Chatelier*, pois provoca uma diminuição do volume da mistura reaccional, favorecendo o fenómeno em que ocorre uma diminuição de volume.

No tratamento térmico, para o interior do produto que está a ser processado atingir a temperatura necessária leva tempo, tendo em conta o seu tamanho e as suas características termo-físicas. No tratamento com pressões elevadas, a pressão é transmitida de modo uniforme (isostática), causando o mesmo efeito na superfície e interior da amostra, independentemente do seu tamanho e estrutura. Pode afirmar-se que o aumento de pressão ao sistema é adiabático, ocorrendo algum aumento de temperatura que é negligenciável na maioria dos casos, sendo este facto uma grande vantagem a nível de scale-up^[22].

Para aumentar a pressão numa amostra, o modo mais frequente é através de um líquido como água, estando a amostra devidamente protegida do contacto directo com o líquido com uma embalagem selada e flexível. A pressão é gerada através de uma bomba, e o líquido pressurizado é mantido num cilindro de aço resistente e espessura adequada. É viável nos dias de hoje atingir uma pressão na gama dos gigapascal e mantê-la constante durante um elevado intervalo de tempo. Uma das principais vantagens desta tecnologia é que manter a amostra sob pressão durante um período prolongado de tempo não requer energia adicional^[21].

Para muitas reacções químicas orgânicas e inorgânicas simples a dependência da constante de equilíbrio da reacção, K , relativamente à temperatura e pressão, é conhecida e em algumas situações também é conhecido o impacto da alteração destas variáveis na cinética da reacção. A expressão quantitativa do efeito da pressão na constante de equilíbrio de uma reacção é dada pela equação de Van't Hoff (equação 2) que relaciona a

dependência da constante de equilíbrio com a pressão. ΔV^* é a variação de volume do sistema reaccional que se verifica quando ocorre reacção (cm^3/mol).

$$\frac{\partial \ln K}{\partial p} = - \frac{\Delta V^*}{RT} \quad (2)$$

ΔV^* é útil para estimar o impacto da pressão no equilíbrio químico. Uma variação negativa de volume do sistema reaccional indica que a formação de produtos é favorecida pelo aumento de pressão. Por exemplo, as reacções de dissociação normalmente apresentam um ΔV^* negativo, como é o caso das moléculas de água ($-22,2 \text{ cm}^3/\text{mol}$). Relativamente a outras ligações, como a formação de pontes de hidrogénio, interacções hidrofóbicas ou forças de Van der Waals, espera-se um deslocamento do equilíbrio para a formação de produtos quando sujeitas a pressões elevadas.

A velocidade das reacções químicas sob pressão depende das moléculas e do mecanismo da reacção em questão. Foi derivada uma relação da teoria do estado de transição que relaciona a constante cinética k com a pressão, semelhante à lei de Arrhenius, que por sua vez quantifica a dependência de k com a temperatura à qual decorre a reacção (equação 3).

$$\frac{\partial \ln k}{\partial p} = - \frac{V_a}{RT} \quad (3)$$

O termo V_a representa o volume de activação da reacção (cm^3/mol). Um V_a negativo leva a uma maior velocidade de reacção, enquanto que um V_a positivo indica que a reacção é retardada. Exemplos de reacções aceleradas podem ser as reacções de polimerização. Para estruturas químicas complexas, como é o caso de proteínas, as informações disponíveis sobre os parâmetros V_a e ΔV^* são limitadas. No entanto, está relatado que a estrutura terciária/quaternária e a estrutura secundária das proteínas são perdidas por pressões elevadas, a 200 e 400 MPa, respectivamente^[23].

Resumindo, a tecnologia por alta pressão apresenta-se como uma tecnologia em desenvolvimento contínuo, e foi proposta como solução para melhorar a variável tempo numa diálise. Nesta tese, foram realizados vários ensaios no sentido de perceber se se ao

aumentar a pressão hidrostática a difusão de sal numa diálise de uma solução com proteína e sal sofria algum efeito e se conseguia acelerar este processo de separação.

1.3.1. Aplicação de alta pressão na área alimentar

A utilização de alta pressão na indústria alimentar tem vindo a crescer de forma constante nos últimos dez anos, e actualmente existem cerca de 82 instalações industriais com uma produção anual de 100 000 toneladas que aplicam esta tecnologia^[23]. Os produtos alimentares são um ambiente propício para o crescimento de microrganismos que podem provocar doenças quando os alimentos estão contaminados e são ingeridos. Apesar da introdução de regras e normas nos países da União Europeia relativamente à qualidade de alimentos, os epidemiologistas acreditam que 75% das doenças causadas por ingestão de produtos alimentares é devido a bactérias. Por este motivo, o controlo de microrganismos é um aspecto importante na qualidade e segurança de produtos alimentares^[19, 22, 24].

São aplicados muitos métodos na preservação de alimentos de modo a controlar as culturas bacterianas, entre os quais se destaca o processamento por alta pressão. Esta tecnologia, que é uma alternativa ao processamento térmico, é usada com o intuito de prolongar a validade de alguns alimentos e eliminar microrganismos patogénicos, alterando a estrutura da membrana celular destes ou inactivando as enzimas responsáveis pelo controlo de acções metabólicas^[22-23, 25-26]. A resistência de microrganismos à pressão varia consideravelmente e depende de factores como a pressão aplicada, temperatura e duração do tratamento aplicado, assim como o tipo de microrganismos em questão. Relativamente à pressão aplicada, esta varia entre 100 a 800 MPa, dependendo do objectivo pretendido^[22].

A desidratação osmótica é um dos processos em que o aumento de pressão hidrostática tem sido aplicado para conservação de alimentos, sem alterar a integridade e qualidade do alimento. Consiste na remoção de água de tecidos de alimentos por imersão do alimento numa solução hipertónica, ou seja, uma solução com elevada concentração de açúcares e/ou sais. A força motriz para a difusão da água do tecido para a solução é a pressão osmótica superior do meio hipertónico. Simultaneamente à difusão de água, ocorre difusão de solutos em sentido contrário para o tecido, provenientes da solução osmótica. Ao reduzir a água nos alimentos, o crescimento microbiano é inibido, o que aumenta o

tempo de conservação dos produtos. Alguns exemplos deste tipo de pré-tratamento são: antes do congelamento, secagem a seco, vácuo ou ao ar dos produtos alimentares. A desidratação osmótica pode aumentar a textura e estabilidade de pigmentos que existam nos produtos alimentares^[19-20, 26-27].

Existem diversos alimentos em que foi aplicada a tecnologia de alta pressão, tais como batata, peru, maçãs, bacalhau, entre outros^[27-30]. Nos ensaios realizados com estes alimentos ficou provado que, quando sujeitos a determinadas pressões e sob determinadas condições de temperatura e de composição de solução, que se consegue acelerar o processo de difusão de sal, que é o aspecto mais relevante para o processo em questão nesta tese. Foi com este intuito, e fazendo um paralelismo, que se tentou aplicar esta tecnologia no processo de diálise de modo a tentar, como já referido anteriormente, diminuir o tempo deste processo de separação.

1.3.2. Equipamento de alta-pressão

Tecnologicamente, os equipamentos de alta pressão são sistemas com uma componente mecânica muito forte, não sendo necessários técnicos altamente qualificados para o seu manuseamento.

O modo de compressão pode ser feito de duas maneiras: o método de compressão directa (menos usado) e o método de compressão indirecta. No caso do sistema de compressão directa, o vaso é preenchido com o meio pressurizante, sendo depois comprimido por um pistão de grande diâmetro e movido por bomba de baixa pressão. Este método está a cair em desuso devido à elevada força de atrito que se exerce nas paredes do vaso e que evita que haja perdas de pressão, mas que por outro lado diminui drasticamente o tempo de vida dos aparelhos. Relativamente ao sistema de compressão indirecta, este contém um intensificador de alta pressão que é utilizado para bombear o meio de pressurização do reservatório para o vaso até que se alcance o nível de pressão desejado.

O sistema de pressurização contém um vaso de pressão, gerador de pressão, fluido de pressurização, dispositivo de controlo de temperatura e recipiente para o acondicionamento do produto. O vaso de pressão é habitualmente um cilindro, construído em aço inoxidável de alta resistência à pressão, contendo o fluido de pressurização que é constituído por água ou óleos minerais ou vegetais ou mesmo misturas, normalmente

propilenoglicol – água. Esta composição tem como intuito aumentar a lubrificação, ter efeito anticorrosivo e anticongelante. Industrialmente, dado que os processamentos são feitos à temperatura ambiente, a água é o meio mais utilizado, já que é mais barato e evita possíveis contaminações do produto. A câmara de pressurização é o mais selada possível de modo a evitar ao máximo perdas de pressão, e de modo a que esteja estável ao máximo ao longo do tempo. A temperatura também é um factor controlável nestes aparelhos, podendo ser um controle externo ou interno, isto é, usando um permutador de calor interno (com camisas de arrefecimento ou aquecimento) no vaso de pressurização ou por recirculação do meio de aquecimento/refrigeração externamente. Na figura 5 está representada a máquina de alta pressão que existe no departamento de química da Universidade de Aveiro e que foi usada para realizar os ensaios experimentais^[30].



Figura 5: Dispositivo de Alta Pressão que existe na Universidade de Aveiro, e que foi utilizada nos ensaios experimentais

1.4. Transferência de massa – Teoria

1.4.1. Determinação de coeficientes de difusividade a partir da 2ª Lei de Fick

No processo de transferência de massa que ocorre numa diálise de uma proteína numa solução salina, a força motriz é a pressão osmótica provocada pela diferença de concentrações entre o retentato e o dialisado, e que leva a que o sal se difunda do retentato para o dialisado, e que em sentido contrário ao do sal a água se difunda por osmose.

Existem métodos reportados na literatura para calcular os coeficientes de difusão efectivos do soluto, usando soluções da segunda lei de Fick para diferentes geometrias tanto para estado estacionário como para estado não estacionário. A transferência de massa é função de muitas variáveis, destacando-se a temperatura, concentração e composição da solução osmótica, tempo de processamento, geometria da amostra e nível de vácuo. Fazendo um paralelismo com a difusão de sal que ocorre no processo de desidratação osmótica, pode-se aplicar 2ª Lei de Fick, que por sua vez depende da geometria do material, assumindo as seguintes aproximações: i) Distribuição uniforme dos compostos que se encontram presentes na solução a dialisar; ii) Podem-se desprezar as resistências internas à transferência de massa; iii) Não ocorreu nenhum tipo de contracção da membrana durante o processo. No caso desta tese, considerou-se que a membrana era aproximadamente um cilindro finito de dimensões $2r$ e $2l$, e foi esta a solução utilizada para determinar a difusividade efectiva do NaCl neste processo^[24,27-29].

1.4.2. Solução da 2ª Lei de Fick para o caso de um cilindro finito

A segunda lei de Fick para a difusão numa configuração geométrica de um cilindro finito de diâmetro $2r$ e altura $2l$ pode ser resolvida por sobreposição da solução para um cilindro infinito e uma placa semi-infinita (Crank, 1975, Rastogi, Eshtiaghi & Knorr, 1999).

A equação 5 apresenta a resolução relativamente a um soluto.

$$S_r = \frac{(S_t - S_\infty)}{(S_0 - S_\infty)} = \sum_{n=1}^{\infty} C_{pn} C_{cn} \exp \left[-D_{es} t \left(\frac{q_{pn}^2}{l^2} + \frac{q_{cn}^2}{r^2} \right) \right] = \sum_{n=1}^{\infty} C_{pn} C_{cn} \exp \left(-D_{es} t \frac{q_{cn}^2}{A^2} \right) \quad (5)$$

Na equação 5, o termo S_r está relacionado com a proporção de soluto difundido num determinado tempo e representa o rácio de soluto difundido. Os índices 0, t e ∞ representam as concentrações relevantes no momento inicial, para qualquer tempo e no equilíbrio, respectivamente. S_t representa o conteúdo de soluto difundido para qualquer tempo. D_{es} corresponde ao coeficiente de difusão efectivo para o soluto. O termo C_{pn} e o termo C_{cn} estão representados nas equações 6 e 7.

$$C_{pn} = \frac{2\alpha(1+\alpha)}{(1+\alpha+\alpha^2+\alpha^2q_{pn}^2)} \quad (6)$$

$$C_{cn} = \frac{4\alpha(1+\alpha)}{(4+4\alpha+\alpha^2q_{cn}^2)} \quad (7)$$

O termo α representa o rácio de volume de retentato e volume de dialisado utilizado nos ensaios experimentais. O termo q_{pn} , presente na equação 8, corresponde às raízes positivas não nulas da equação 6.

$$\tan q_{pn} = -\alpha q_{pn} \quad (8)$$

Relativamente ao termo q_{cn} que é um dos constituintes da equação 7, corresponde às raízes positivas não nulas da equação 9.

$$\alpha q_{cn} J_0(q_{cn}) + 2J_1(q_{cn}) = 0 \quad (9)$$

Os termos $J_0(q_{cn})$ e $J_1(q_{cn})$, presentes na equação 9, são dados pelas raízes da função de Bessel de ordem 0 e ordem 1, respectivamente, onde o termo A é definido como está descrito pela equação 10.

$$\frac{1}{A^2} = \frac{1}{r^2} \left[1 + \left(\frac{r}{l} \right)^2 \left(\frac{q_{pn}}{q_{cn}} \right)^2 \right] \quad (10)$$

O coeficiente de difusão efectivo e o S_{∞} foram determinados por regressão linear, usando a equação 5 e o primeiro termo do somatório. Verifica-se que o segundo termo do somatório pode ser desprezado, por representar apenas 3% do primeiro termo.

Capítulo II Materiais e Métodos

2.1. Preparação da solução a dialisar

A solução a dialisar foi preparada com cloreto de sódio RPE ACS adquirido a José M. Vaz Pereira S.A Lote 7M122258F, e com proteína albumina sérica bovina, que é denominada como BSA (Fisher Scientific, UK code A/1278/48). A amostra, ou seja, a solução que foi colocada dentro da membrana, continha uma concentração de 7,05 % de NaCl e uma concentração de 1 mg/ml de BSA.

2.2. Esquema experimental

2.2.1. Membrana utilizada

Nos ensaios experimentais utilizou-se uma membrana da marca *Visking*, de tamanho 2, de diâmetro 14.3 mm e com o MWCO de 12000 a 14000 Daltons. Esta membrana foi formada a partir de celulose natural, que foi dissolvida em solventes especiais inorgânicos e refeita num novo polímero. Esta membrana encontra-se na forma de folhas planas e foi preparada segundo o método 2 apresentado pela marca *Visking*, e que é descrito na secção 2.1.2.

2.2.2. Método de lavagem da membrana

A membrana foi aquecida numa solução com 2% de bicarbonato de sódio e 1 milimolar de EDTA a 80°C durante 30 minutos, sendo de seguida lavada com água destilada. Foi guardada em água destilada a 4°C.

2.2.3. Dispositivo experimental

O dispositivo experimental consistia num frasco que continha a membrana de diálise e o volume de dialisado, como é representado na figura 6. Relativamente à membrana de diálise, deu-se um nó numa das extremidades e colocou-se dentro desta 5 ml da solução a dialisar (retentato). Fechou-se, usando fio de sapateiro, a membrana com um nó, colocando-a de seguida dentro do frasco de diálise. As membranas ficaram com um diâmetro de 1,5 cm e um comprimento de 4,5 cm (figura 7). Preencheu-se o máximo de volume do frasco de diálise com água destilada, registando o volume desta. Para os ensaios realizados na pressão, colocaram-se os frascos de diálise num saco para que fosse selado a quente, para evitar saída para o fluido de pressurização de dialisado, no caso de deficiente vedação do frasco.



Figura 6: Frasco do dispositivo experimental de diálise.



Figura 7: Membrana de diálise, antes de ser colocada no dispositivo de diálise.

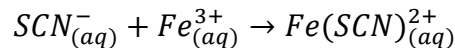
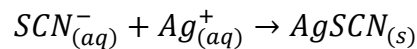
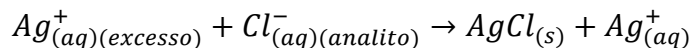
2.3. Estimativa da quantidade de NaCl pelo método condutivimétrico

A medição da condutividade foi utilizada para estimar o conteúdo em NaCl tanto no retentato como no dialisado após cada ensaio experimental. O NaCl presente foi determinado baseando-se numa recta de calibração entre 0 e 7 % de NaCl, que foi previamente determinada e que relaciona a condutividade em função da % de NaCl. Deste modo, obtinha-se uma estimativa rápida da quantidade de NaCl, o que permitia verificar e controlar como estava a evoluir a difusão de sal do retentato para o dialisado.

2.4. Determinação do conteúdo de NaCl pelo método químico

A quantificação do NaCl, após a estimativa obtida pela medição de condutividade, foi realizada pelo método de Volhard^[31]. A 5-10 ml de amostra, adicionou-se AgNO_3 0,10 M em excesso (5-10 ml), que levou à precipitação dos iões cloreto na forma de $\text{AgCl}(s)$. Com uma solução de KSCN 0,1 M titulou-se com uma microbureta, *Crison micro Bu 2031*, os iões Ag^+ que estavam em excesso e que não precipitaram, determinando-se assim os iões Cl^- presentes na amostra.

As reacções envolvidas neste método são:



Foi usado o indicador alúmen férrico, $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ num meio acidificado com ácido nítrico diluído que, na presença de iões SCN^- , forma $Fe(SCN)^{+2}$ que tem tonalidade laranja. Assim quando todos os iões prata são titulados, a solução fica com uma tonalidade laranja, sendo esse o ponto final da titulação. O conteúdo em sal foi expresso em %NaCl, utilizando-se duas réplicas para determinação do NaCl.

2.5. Determinação da quantidade de proteína BSA - Método de Biureto

Este método baseia-se na medição, por espectrofotometria de visível (VIS), do complexo proteína-cobre que se forma em soluções fortemente alcalinas. Pensa-se que a reacção de Biureto entre o ião cobre e a proteína ocorre por coordenação de um ião cobre a 4 átomos de azoto das ligações peptídicas. Forma-se um complexo púrpura que pode ser quantificado espectrofotometricamente a 540 nm. A desvantagem deste método é o seu elevado limite de quantificação (gama de linearidade: 1-6 mg/ml). No entanto, o limite de quantificação pode ser diminuído, com algumas alterações ao procedimento descrito. Para este método, foi previamente determinada uma recta de calibração, para se poder determinar posteriormente a concentração de proteína, a partir de soluções padrão de BSA com concentrações no intervalo de 1 a 5 mg/ml.

Para fazer a análise das amostras, seguiu-se o seguinte protocolo:

- 1- A 1.0 ml da amostra a analisar, branco (água destilada) e amostra (preparou-se a amostra em duplicado) adicionou-se, em tubos de ensaio previamente rotulados, 5.0 ml de reagente de Biureto. O reagente de biureto é preparado previamente.
- 2- Agitaram-se bem os tubos de ensaio.
- 3- Deixou-se reagir as amostras e o branco, em repouso, durante 30 minutos.
- 4- Mediu-se a absorvância a 540 nm, contra o branco.

- 5- Quantificou-se a presença de proteína em todos os ensaios, a partir de uma recta de calibração determinada previamente.

2.6. Tratamentos de alta pressão

Os tratamentos de alta pressão foram feitos num aparelho da Universidade de Aveiro (Unipress Equipment, Modelo U33, Polónia). Este aparelho tem um vaso com capacidade para 100 ml tendo 35 mm de diâmetro e 100 mm de altura. O vaso tem uma camisa de termostatização externa ligada a um banho de termostatização para controlo de temperatura. O aparelho tem capacidade para atingir pressões de 700 MPa, ou seja, aproximadamente 7000 atm.

Os ensaios de diálise foram iniciados à pressão atmosférica. Seguidamente, os sacos contendo os dispositivos de diálise foram colocados num aparelho de vácuo, *Albipack Packaging Solutions, Portugal*, onde ar foi retirado, com vácuo de 80% e selados a quente. Imediatamente após a selagem, colocou-se a amostra no vaso de pressão e pressurizou-se à pressão desejada, com uma taxa de compressão de 450 MPa/min, utilizando uma mistura de propilenoglicol água (60:40), como fluido de pressurização.

As experiências foram realizadas a 100, 200 e 300 MPa sob pressão. Após o tempo de pressurização, despressurizou-se sendo esta descompressão quase imediata (menos de 5 segundos) até cerca de 20 MPa e depois mais 15 segundos até à descompressão total. Posteriormente, retirou-se o saco do vaso de pressurização e recolheu-se o dispositivo de diálise, retirando a membrana do dialisado. Mediu-se o volume de retentato e dialisado, e efectuou-se a medição da condutividade de ambas as soluções, de modo a se poder ter uma ideia da quantidade de sal presente em cada uma pelo método condutivimétrico. Posteriormente, determinou-se a quantidade de sal no retentato e dialisado pelo método de Volhard, e a quantificação de BSA através do teste de Biureto.

Capítulo III Análise e Discussão de Resultados

De modo a facilitar os ensaios experimentais realizados, testou-se a viabilidade de utilizar um método rápido de quantificação do NaCl, tanto no retentato como no dialisado, o condutivimétrico. Posteriormente, para confirmar e obter resultados mais exactos, quantificou-se a quantidade de NaCl pelo método de Volhard.

3.1. Ensaio preliminares

3.1.1. Quantificação de NaCl mediante o método condutivimétrico e método de Volhard

Inicialmente, preparam-se diversas soluções a partir de uma solução de NaCl de concentração 12,5% (m/m). No gráfico representado na figura 8 apresentam-se os resultados das medições efectuadas para a temperatura ambiente (25°C), onde se verifica que existe uma relação linear entre a concentração de NaCl até 7% e a condutividade. Foi traçada a recta que relaciona os pontos na gama linear ($y = 15,9x + 0,480$ com um coeficiente de correlação de 0.994), que também se encontra representada na figura 8. A partir da recta determinada, é possível quantificar a concentração de NaCl presente nas soluções. A concentração de NaCl utilizada para os ensaios experimentais foi de 7,05 % de sal, o que se encontra dentro da gama linear referida. Em todas as figuras da tese os pontos representam os valores médios de dois ensaios realizados e as barras de erro os respectivos desvios padrões.

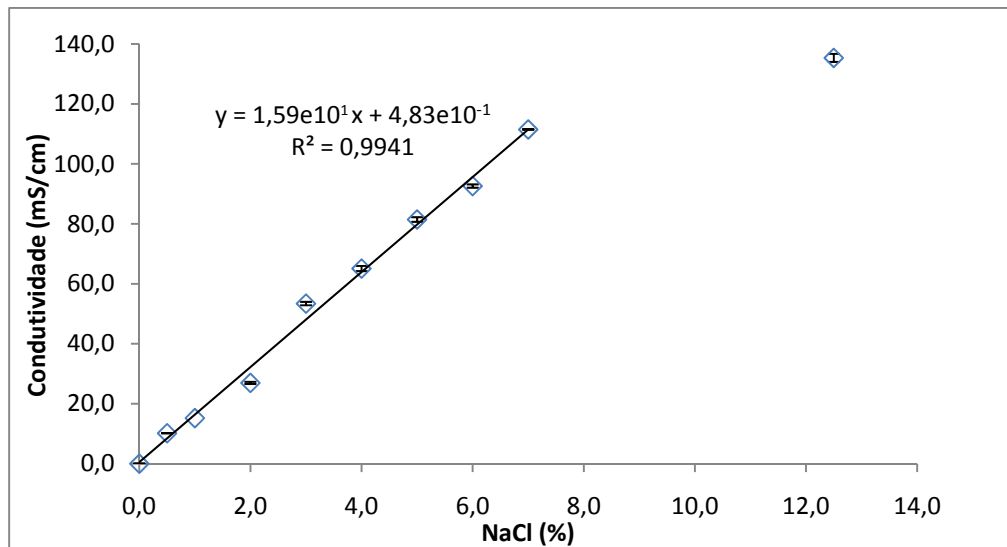


Figura 8: Condutividade (mS/cm) em função da concentração de NaCl (%) à temperatura ambiente, juntamente com a representação da recta que relaciona os valores experimentais na gama linear.

Para verificar a viabilidade do método anteriormente referido, realizou-se um ensaio experimental de determinação da concentração de NaCl pelo método de Volhard, também denominado método químico, e relacionou-se com a concentração determinada anteriormente por condutividade para algumas soluções na gama linear (figura 9).

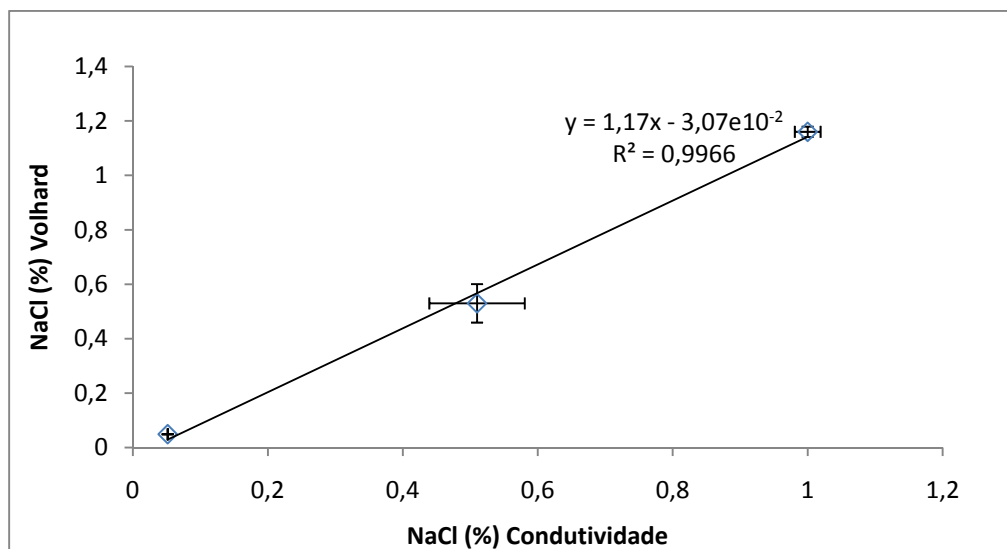


Figura 9: Representação gráfica da relação linear existente entre o método condutivimétrico e o químico.

Observando a boa correlação que existe entre os dois métodos (coeficiente de correlação de 0.997), conclui-se que o método condutivimétrico pode ser utilizado como

método rápido para se ter uma ideia da concentração de NaCl, que é depois confirmado pelo método de Volhard.

3.1.2. Quantificação da proteína BSA pelo método de Biureto

Em relação à determinação da concentração de BSA, prepararam-se soluções com diferentes concentrações a partir de uma solução com concentração de 25 mg/ml de proteína. Foram sujeitas ao teste de Biureto, medindo-se a sua absorvância a 540 nm. Representaram-se graficamente os resultados, que mostram um comportamento linear (figura 10), e determinou-se a recta que relaciona a absorvância a 540 nm e a concentração da proteína.

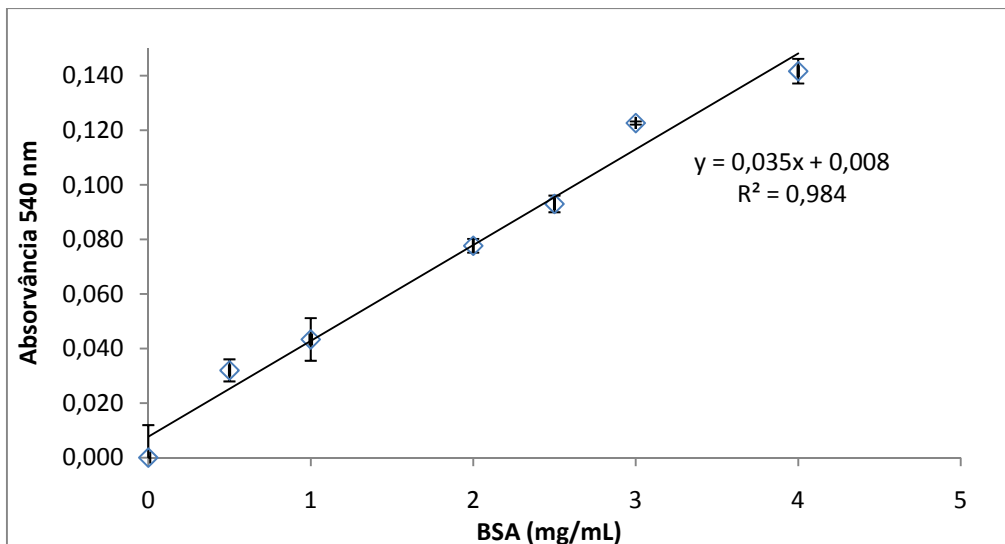


Figura 10: Representação da linearidade existente entre a concentração da proteína e a sua absorvância a 540 nm relativamente ao teste de Biureto.

A recta obtida para esta relação linear foi $y=0.035x+0.008$, que permite quantificar a concentração de proteína da solução. A concentração de BSA usada nos ensaios experimentais foi de 1 mg/ml, que se encontra na gama linear.

Como a solução inicial nos ensaios experimentais possuía na sua constituição BSA e NaCl, foi realizado um ensaio experimental no sentido de confirmar se a presença de sal afectava o teste de biureto, de modo a provar que este é um teste viável para a determinação da concentração da proteína (figura 11).

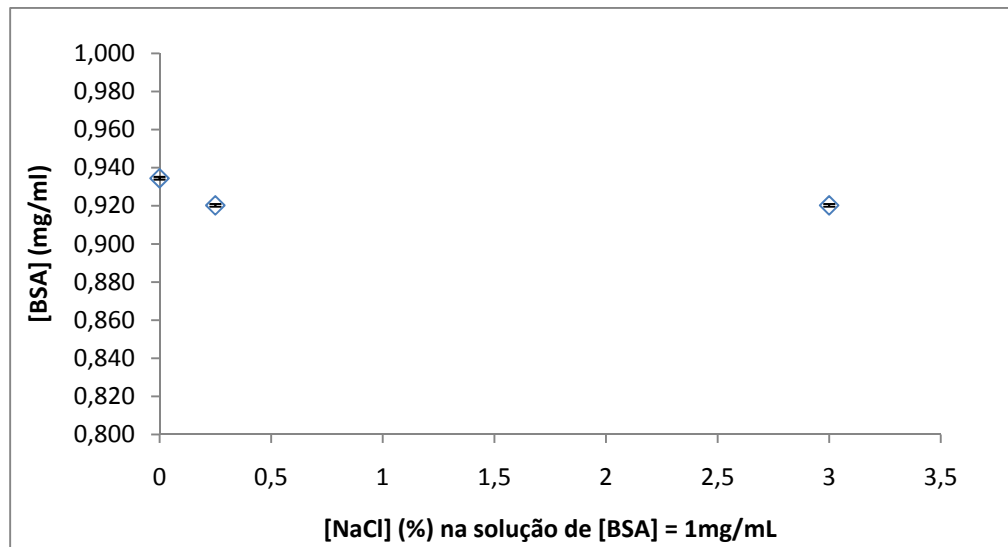


Figura 11:Ensaio experimental para testar a validade do método de Biureto quando existe presença de NaCl na solução de BSA (1mg/mL).

Os resultados apresentados pela figura 4 mostram o que o sal presente na solução da proteína não apresenta efeito no teste do biureto, sendo por isso viável a sua aplicação neste trabalho. O teste de biureto é um dos mais utilizados para quantificar a presença de proteínas.

3.2. Ensaios experimentais

3.2.1. Ensaio realizado à pressão atmosférica

Com o intuito de poder perceber e estudar o processo de diálise, a primeira experiência foi efectuada à pressão atmosférica (0,1 MPa). Efectuaram-se vários ensaios a diversos tempos, e determinou-se a quantidade de sal em cada solução, ou seja, no retentado e no dialisado. Como já referido, para cada ensaio e experiência efectuados, realizaram-se duas réplicas e os resultados que se apresentam são a média dos resultados dessas réplicas, juntamente com as barras de erro do desvio padrão. Na figura 12 apresentam-se os resultados tanto por determinação química como pelo método condutivimétrico.

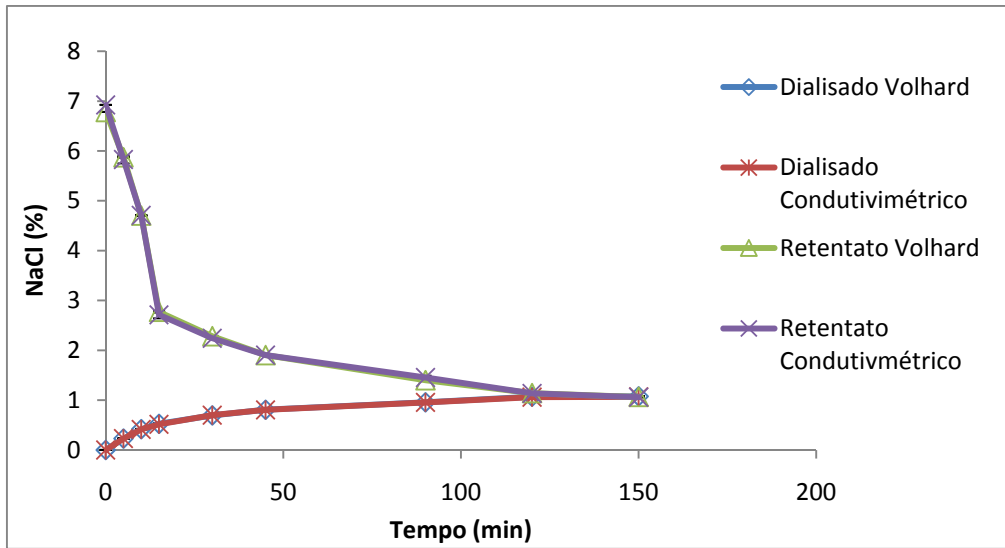


Figura 12: Resultados obtidos para a transferência de sal do retentato para o dialisado para o ensaio realizado à pressão atmosférica, em % de NaCl.

Pela análise do gráfico presente na figura 12, constata-se que o sal se difundiu do retentato para o dialisado, ou seja ao longo do tempo a concentração de sal foi aumentando fora da membrana de diálise e diminuindo dentro desta até se atingir um equilíbrio. Este equilíbrio deve-se ao facto da força motriz (diferença de pressão osmótica) que leva à transferência de NaCl ter atingido um valor perto do nulo, ou seja, a pressão osmótica atingiu um valor idêntico no dialisado e no retentato. Para este ensaio, ocorreu a 1,09% de NaCl (média dos últimos dois valores), e foi atingido por volta dos 120 minutos de diálise. É de realçar o facto de que os resultados determinados pelos dois métodos (condutivimétrico e Volhard) são idênticos, o que prova a validade de ambos.

Foi determinado o rácio de NaCl, que se representa pelo parâmetro S_r (figura 13), permitindo ver que atinge um valor muito próximo de zero, o que comprova que a diálise atingiu o equilíbrio.

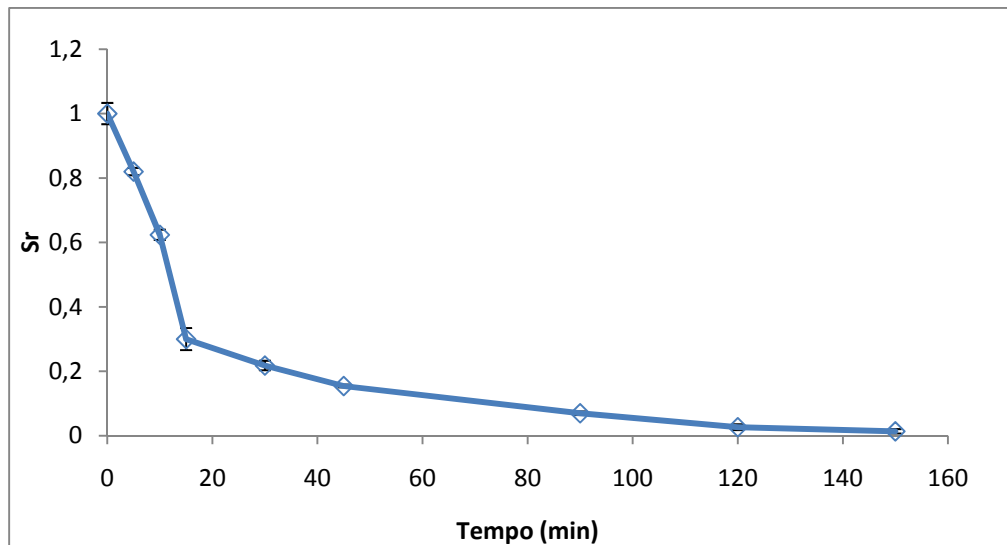


Figura 13: Representação da variável Sr em função dos tempos realizados nos ensaios experimentais.

No início de cada ensaio, assim como no final, foram medidos os volumes do dialisado e retentato, uma vez que também ocorre osmose, ou seja, difusão de água. Na figura 14 apresenta-se a variação dos volumes dentro e fora da membrana.

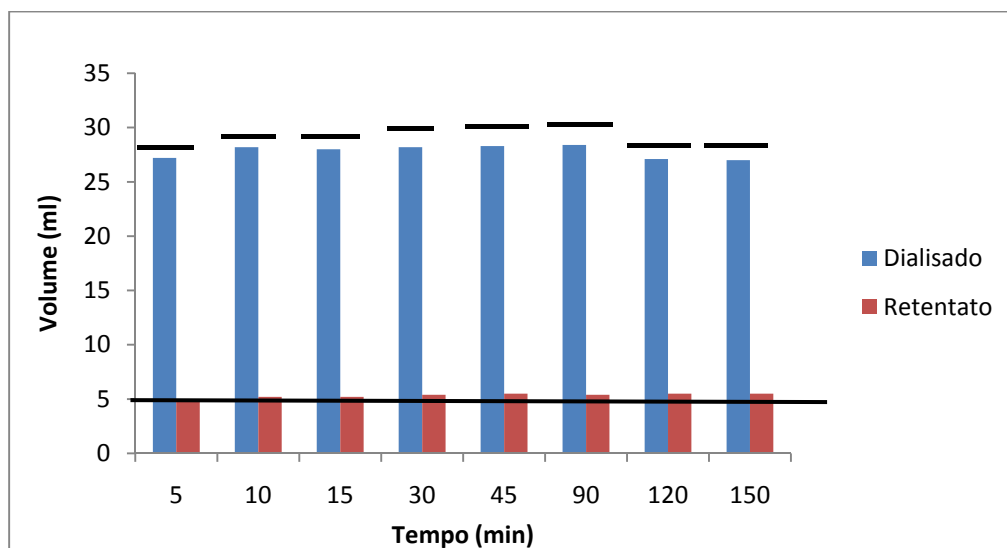


Figura 14: Variação de volume no retentato e dialisado no ensaio realizado a pressão atmosférica.

Estes gráficos traduzem o movimento que ocorreu de água da solução exterior para o interior da membrana ao longo do tempo. A linha preta em cada figura corresponde ao valor do volume inicial para cada ensaio. Na tabela 2 apresenta-se a perda de volume que ocorreu em cada ensaio, assim como a variação de volume que ocorreu no retentato e dialisado em cada ensaio. Na experiência esta diminuição pode ser devida à perda ao apertar a membrana no início da experiência, pois esta era muito justa para o frasco.

Tabela 2: Perda e variação de volume entre dialisado e retentato, em ml.

Tempo (min)	Perda de volume (ml)	Δ Volume dialisado (ml)	Δ Volume retentato (ml)
5	0,8	0,8	0
10	0,1	0,3	0,2
15	0,3	0,5	0,2
30	0,4	0,8	0,4
45	0,2	0,7	0,5
90	0,2	0,6	0,4
120	0,4	0,9	0,5
150	0,5	1	0,5

O fluxo de água que ocorreu do dialisado para o retentato é visível na figura 15, onde se verifica claramente que a membrana ficou com mais volume do que no início da actividade experimental.



Figura 15: Membrana com a solução inicial de proteína e sal utilizada nos ensaios (imagem à esquerda) e membrana no fim do ensaio, quando se retirava do dispositivo experimental (imagem à direita).

Determinou-se a massa total de NaCl através do balanço de massa e a sua variação ao longo do tempo nas amostras, assim como a variação da massa total para cada experiência efectuada (figura 16).

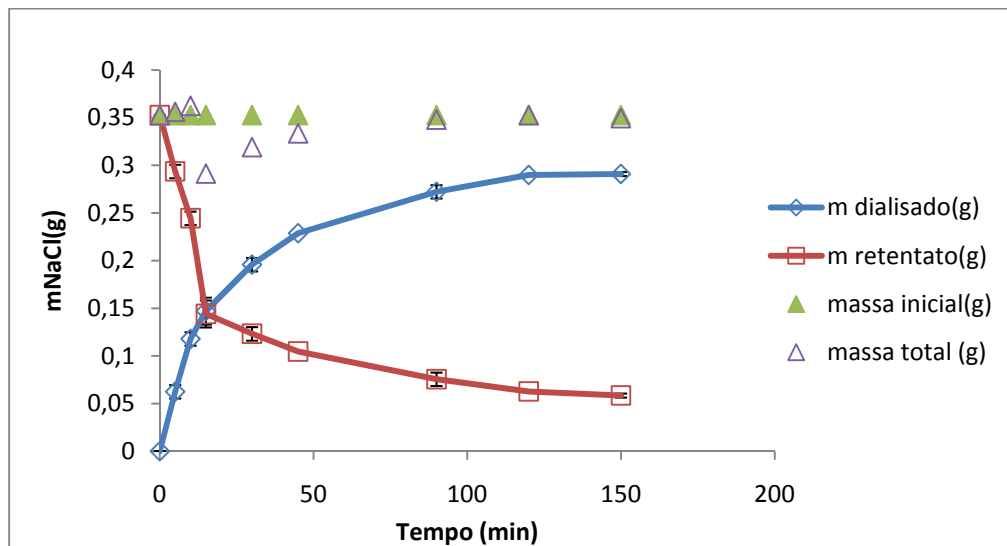


Figura 16: Variação da massa de NaCl (em g) ao longo do tempo, assim como da massa total das amostras.

Esta figura mostra que a massa de sal segue a tendência já anteriormente verificada, ou seja ocorre a saída de sal do retentato e a sua entrada no dialisado. Relativamente à massa total de NaCl verifica-se que esta diminuiu ligeiramente em alguns ensaios, e este facto deverá estar relacionado com a perda de volume de solução de retentato ao fechar a membrana, como foi referido anteriormente.

De modo a se poder confirmar que a proteína não se difundiu para fora da membrana, submeteram-se algumas amostras da solução de retentato ao teste de biureto (figura 17).

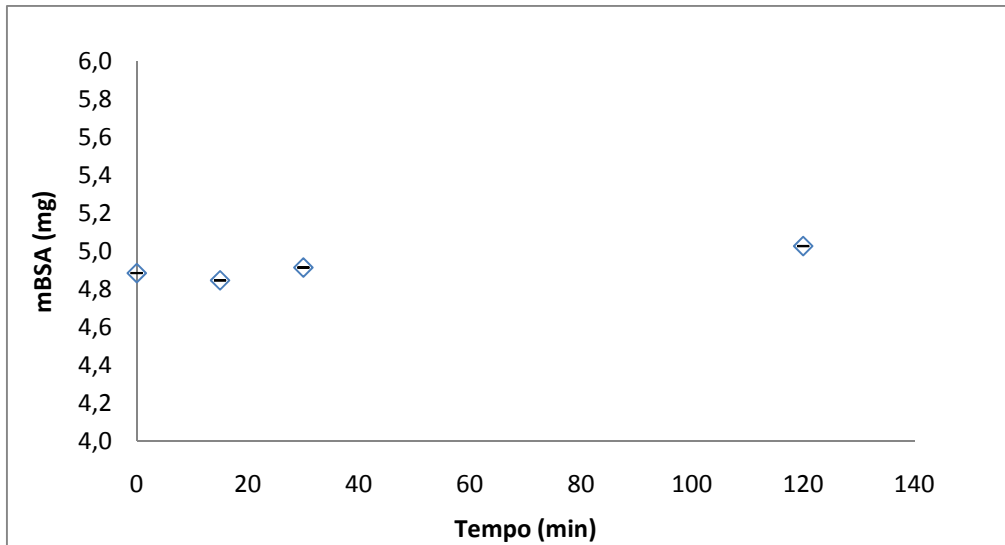


Figura 17: Resultados do teste de biureto efectuado a algumas amostras de retentato.

Os resultados experimentais obtidos provam que a quantidade total de proteína no retentato não se alterou, sendo igual ao valor da solução inicial. Conclui-se que a proteína não se difundiu para fora da membrana.

Resumindo, este ensaio realizado à temperatura ambiente serviu como base de comparação para os ensaios seguintes, a pressões mais elevadas e também como comparação para o ensaio realizado a 4°C, para se perceber qual o efeito que a pressão e a temperatura poderá trazer ao processo de separação em questão. Constatou-se o que já era esperado neste ensaio: ocorreu difusão de sal do retentato para o dialisado, e transferência de água em sentido contrário, ou seja, para a solução inicial. O equilíbrio foi atingido por volta dos 100-120 minutos.

3.2.2. Ensaio realizado à temperatura de 4°C

A maior parte das diálises que envolvem proteínas a nível laboratorial realizam-se à temperatura de 4°C, de modo a que as proteínas não sofram desnaturação, o que torna a diálise mais lenta. De modo a comprovar o efeito da temperatura neste processo de separação, efectuou-se um ensaio a 4°C e compararam-se os resultados com os obtidos à pressão atmosférica e temperatura ambiente (figura 18).

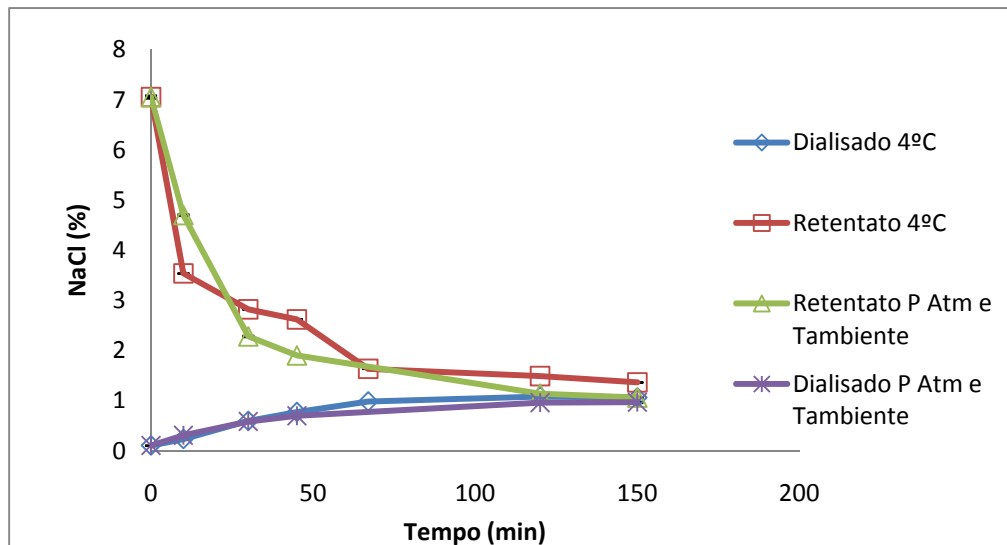


Figura 18: Comparação dos resultados obtidos para a difusão de sal do retentato para o dialisado dos ensaios realizados a 4°C e à pressão atmosférica, em % de NaCl.

A quantidade de NaCl determinada nestes ensaios experimentais foi feita através do método condutivimétrico, que anteriormente se provou ser válido por ter resultados muito semelhantes ao método químico. Por análise da figura 18, conclui-se que a difusão de sal no ensaio de 4°C ocorre do retentato para o dialisado como no ensaio realizado à temperatura ambiente, sendo no entanto uma difusão um pouco mais lenta, mas que não difere muito da que acontece à temperatura ambiente. Para os tempos de diálise testados para este ensaio, ao contrário do ensaio realizado à temperatura ambiente, o ensaio a 4°C não atingiu o equilíbrio, devido ao facto de a diálise ser lenta.

Determinaram-se os volumes no início e final de cada amostra para o retentato e para o dialisado, cujos resultados se apresentam na figura 19.

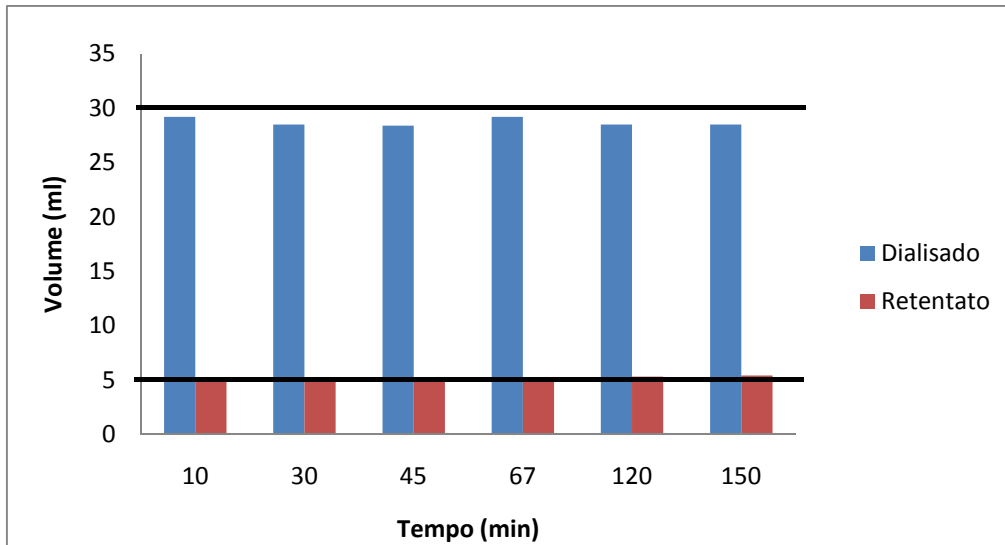


Figura 19: Variação de volume no retentato e dialisado no ensaio realizado à temperatura de 4°C.

Ao analisar a figura 19, verifica-se que a 4°C ocorreu diminuição de volume do dialisado, como já se tinha verificado à temperatura ambiente. A linha preta no gráfico representa o valor inicial de volume para todos os ensaios. A tabela 3 apresenta os resultados da perda de volume deste ensaio experimental e variação de volume do retentato e dialisado.

Tabela 3: Perda de volume (em ml) e variação de volume do retentato e dialisado (em ml) no ensaio realizado à temperatura de 4°C

Tempo (min)	Perda de volume (ml)	Δ Volume dialisado (ml)	Δ Volume retentato (ml)
10	0,9	0,8	-0,1
30	1,5	1,5	0
45	1,5	1,6	0,1
67	0,6	0,8	0,2
120	1,2	1,5	0,3
150	1,1	1,5	0,4

Comparando com o ensaio realizado à temperatura ambiente, neste ensaio a perda de volume foi muito maior, e este facto pode estar associado à perda de volume ao fechar a membrana. De realçar que a diálise a 4°C foi o segundo ensaio realizado, tendo ocorrido mais perda de volume, nos ensaios posteriores teve-se mais cuidado a fechar a membrana.

O ensaio realizado à temperatura ambiente apresentado anteriormente foi repetido e já se teve também mais cuidado ao fechar a membrana.

Procedeu-se à determinação da massa de NaCl, como se apresenta na figura 20.

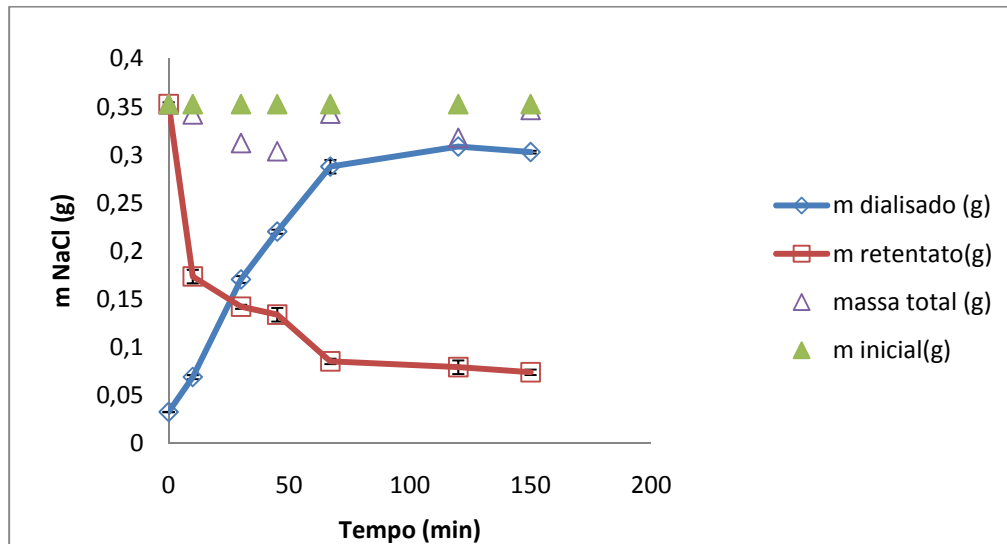


Figura 20: Variação da massa de NaCl (em g) no retentato e dialisado, e da massa total no ensaio realizado a 4°C.

Este figura traduz a variação da massa de sal durante a experiência, ou seja, que ocorre difusão de sal do retentato para o dialisado. É de realçar o facto de que a massa total média é um pouco menor do que a massa no início de cada actividade experimental, o que pode ser devido às perdas de volume de amostra no decorrer da actividade experimental.

Fazendo um resumo geral do ensaio realizado à temperatura 4°C, que como já dito anteriormente é a temperatura à qual se realizam as diálises que envolvem proteínas, verificou-se que ocorreu um comportamento semelhante ao do ensaio realizado à temperatura ambiente, sendo um pouco mais lenta a difusão do sal. Devido a este facto, neste ensaio não se conseguiu atingir o equilíbrio osmótico para o tempo mais longo da experiência.

3.2.3. Ensaio realizado à pressão de 100 MPa

Tendo em vista o objectivo de estudar e perceber se é possível acelerar este processo de separação, procedeu-se à execução de um ensaio à pressão de 100 MPa. (figura 21).

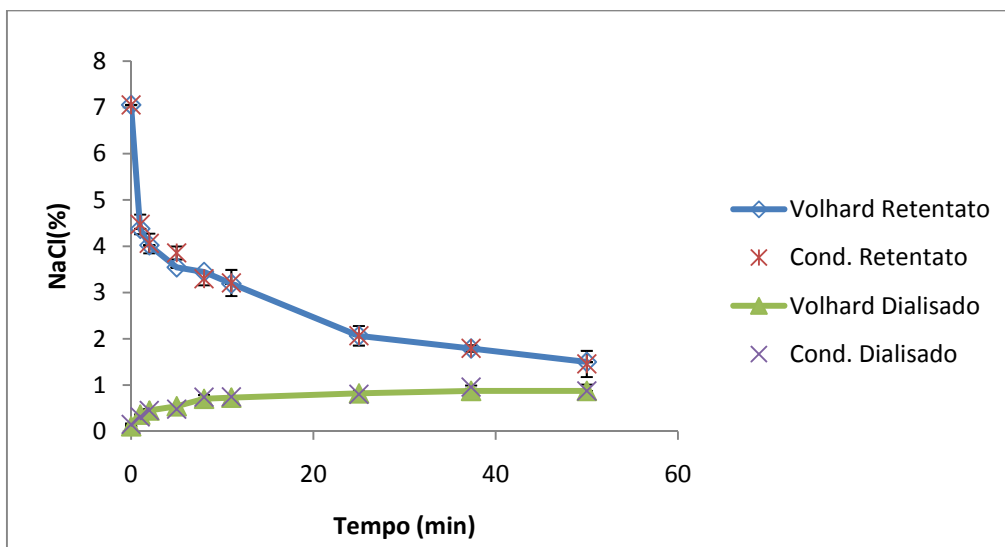


Figura 21: Resultados obtidos para a transferência de sal do retentato para o dialisado para o ensaio realizado a 100 MP, em % de NaCl.

Para este ensaio, não foi atingido o equilíbrio (devido ao tempo curto), mas verifica-se a tendência para tal, e para um valor aproximado (1,5 % de NaCl). Não se fizeram experiências a tempos mais longos, pois o equipamento de alta pressão usado é muito caro e é bastante utilizado para outros estudos, pelo que está muito ocupado, sendo necessário gerir a sua utilização. Os valores obtidos tanto pelo método condutivimétrico como pelo químico são coincidentes, como já verificado anteriormente no ensaio realizado à pressão atmosférica (figura 12). Constatou-se igualmente uma variação de volume do retentato e dialisado, o que correspondeu a uma diminuição de volume de dialisado e um aumento no retentato, sendo os resultados apresentados no gráfico da figura 22.

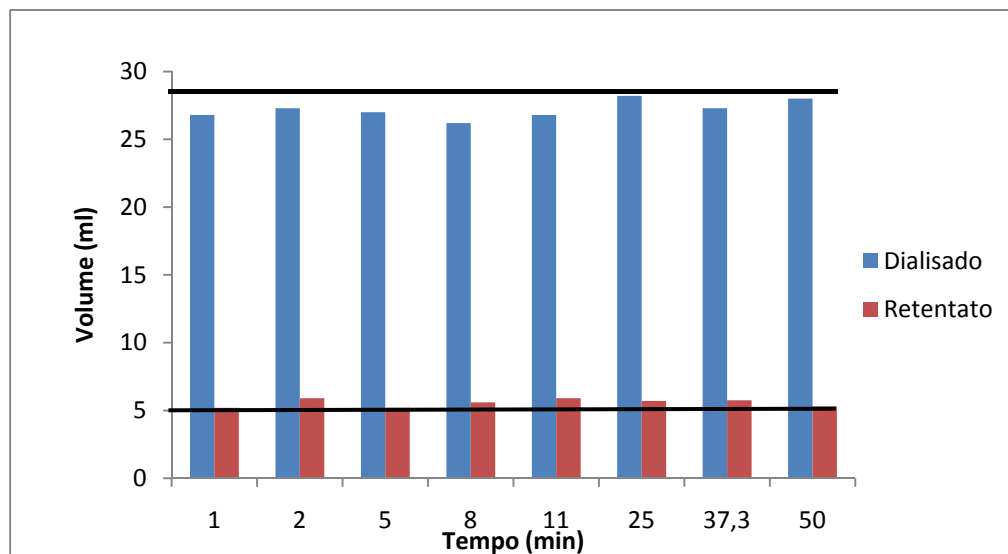


Figura 22: Variação de volume no dialisado e no retentato, em ml.

A variação de volume neste ensaio experimental apresenta-se mais irregular, mas confirma a transferência de água do dialisado para o retentato. A linha preta em cada figura representa o valor inicial de volume para todos os ensaios. Na tabela 4 apresenta-se a perda de volume dos ensaios a 100 MPa.

Tabela 4: Perda de volume (em ml) e variação de volume do retentato e dialisado (em ml) no ensaio realizado à pressão de 100 MPa

Tempo	Perda de volume (ml)	Δ Volume dialisado (ml)	Δ Volume retentato (ml)
1	1,5	1,7	0,2
2	0,3	1,2	0,9
5	1,3	1,5	0,2
8	1,7	2,3	0,6
11	0,8	1,7	0,9
25	0,4	0,3	0,7
37,3	0,5	1,2	0,7
50	0,2	0,5	0,3

Neste ensaio, a perda de volume aumentou relativamente ao ensaio realizado à pressão atmosférica. Poderá estar relacionado com uma execução experimental menos

cuidada ao fechar a membrana, o que se traduziu numa maior perda de volume de amostras.

Após a determinação dos volumes, foram efectuados os cálculos para determinar a massa de NaCl em ambas as soluções (figura 23).

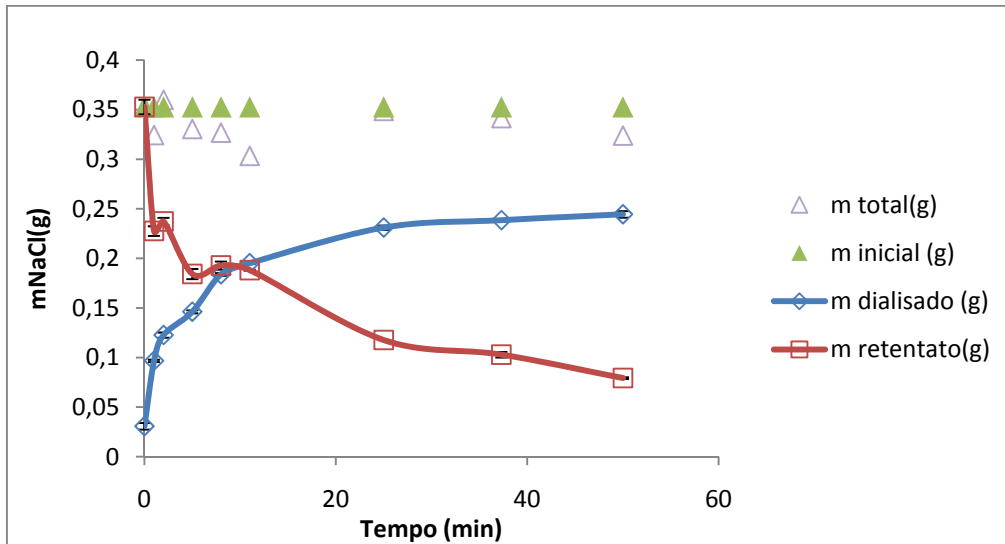


Figura 23: Variação da massa de NaCl (em g) tanto no retentato como no dialisado, assim como a variação de massa total deste sal no ensaio realizado a 100 MPa.

Verifica-se que, como já demonstrado anteriormente, a massa de NaCl no retentato vai diminuindo e no dialisado aumentando ao longo do tempo. Ao analisar a variação total da massa média de NaCl, observa-se que esta encontra-se abaixo da massa inicial de sal na amostra, o que pode estar relacionado com a perda de volume das soluções na execução experimental e leva a que a massa obtida no final seja menor que a inicial.

3.2.4. Ensaio realizado à pressão de 200 MPa

Realizou-se um ensaio à pressão de 200 MPa, igualmente para se perceber se a taxa de diálise aumenta se se aumentar a pressão hidrostática. Na figura 24 apresentam-se os resultados obtidos neste ensaio experimental.

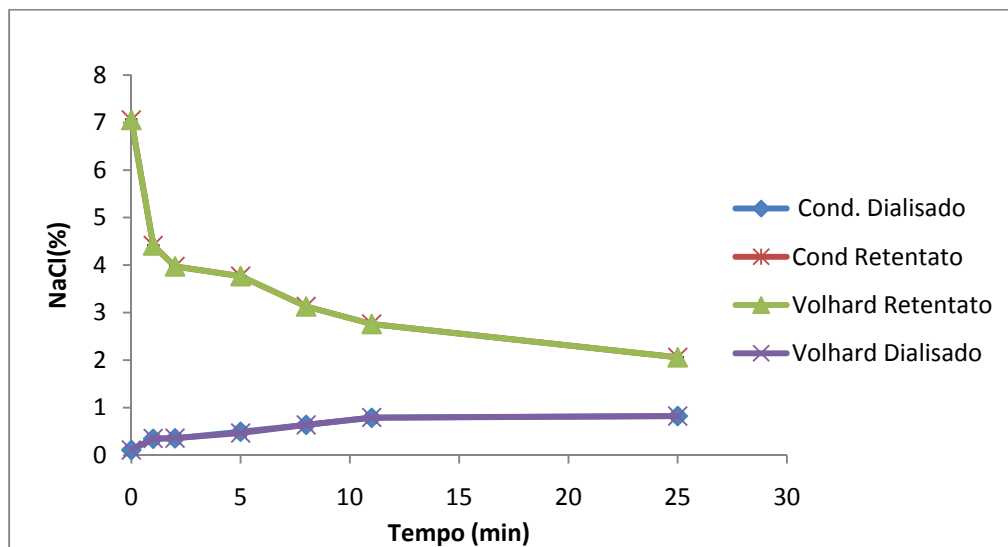


Figura 24: Resultados obtidos para a transferência de sal do retentato para o dialisado para o ensaio realizado a 200 MP, em % de NaCl.

O equilíbrio osmótico não foi atingido para os tempos realizados nesta actividade experimental, devido a não se ter efectuado ensaios a tempos suficientemente longos. Constata-se novamente que não existe diferença significativa entre os valores obtidos por condutividade ou pelo método de Volhard.

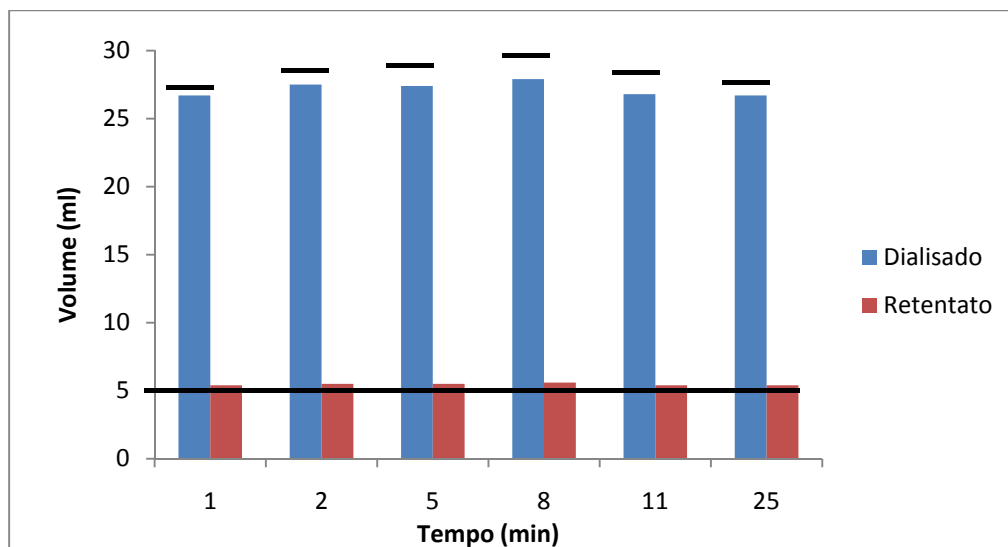


Figura 25: Variação de volume no retentato e dialisado para o ensaio realizado a 200 MPa.

Relativamente aos volumes de retentato e dialisado, verifica-se que houve um aumento de volume do retentato, com uma conseqüente diminuição do volume de dialisado, o que prova o fluxo de água do dialisado para o retentato (figura 25). As linhas a preto representam o volume inicial das amostras. Na tabela 5 apresenta-se a perda de volume, em ml, entre as duas soluções da actividade experimental.

Tabela 5: Perda de volumes (em ml) e variação de volume do retentato e dialisado (em ml) no ensaio realizado a 200 MPa

Tempo	Perda de volume (ml)	Δ Volume dialisado (ml)	Δ Volume retentato (ml)
1	0,1	0,5	0,4
2	0	0,5	0,5
5	0,3	0,8	0,5
8	0	0,6	0,6
11	0,3	0,7	0,4
25	0,2	0,6	0,4

Uma nota importante que se pode referir relativamente à perda de volumes neste ensaio é que, comparativamente aos outros casos, a perda de volume de solução é menor. Este facto está relacionado possivelmente com uma optimização da execução experimental, o que levou a uma minimização de perdas de solução.

Após a determinação dos volumes, à semelhança do que se executou nos outros ensaios, procedeu-se ao cálculo da massa de sal que saiu do retentato e entrou no dialisado, e da variação da massa total (figura 26).

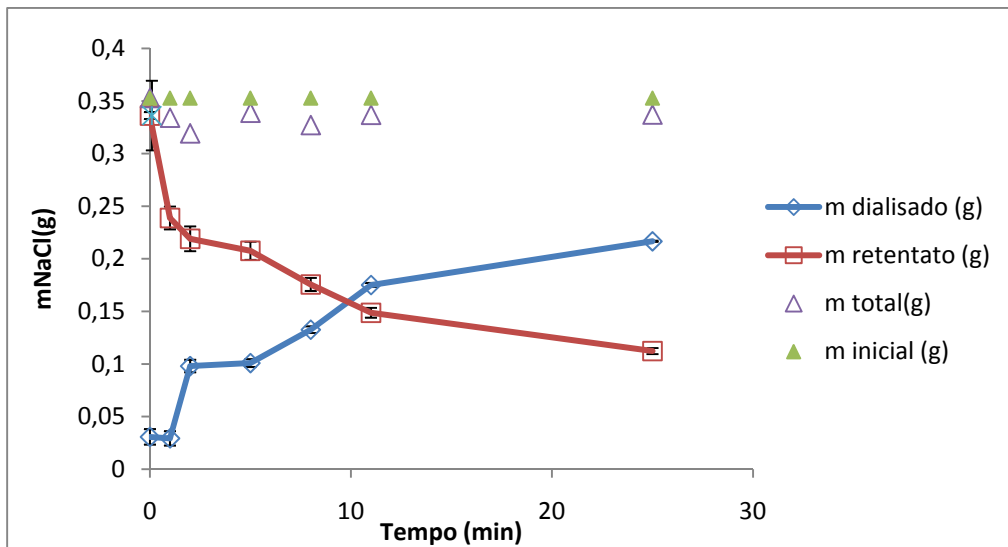


Figura 26: Variação da massa de NaCl (g) no dialisado, retentato e massa total do sal, no ensaio realizado a 200 MPa.

O sal NaCl no retentato é transferido para o dialisado, o que é demonstrado e confirmado pelo gráfico da figura 26. A massa total do sal é semelhante à massa inicial, o que comprova que neste ensaio a perda de volume de amostra foi mínima, até comparada com ensaios anteriores.

3.2.5. Ensaio realizado à pressão de 300 MPa

De modo a se poderem comparar resultados e entender qual é a pressão à qual se obtêm melhores resultados, foi efectuado um ensaio a uma pressão mais elevada, 300 MPa. Na figura 27 apresentam-se os resultados, em % de NaCl, obtidos nesta experiência.

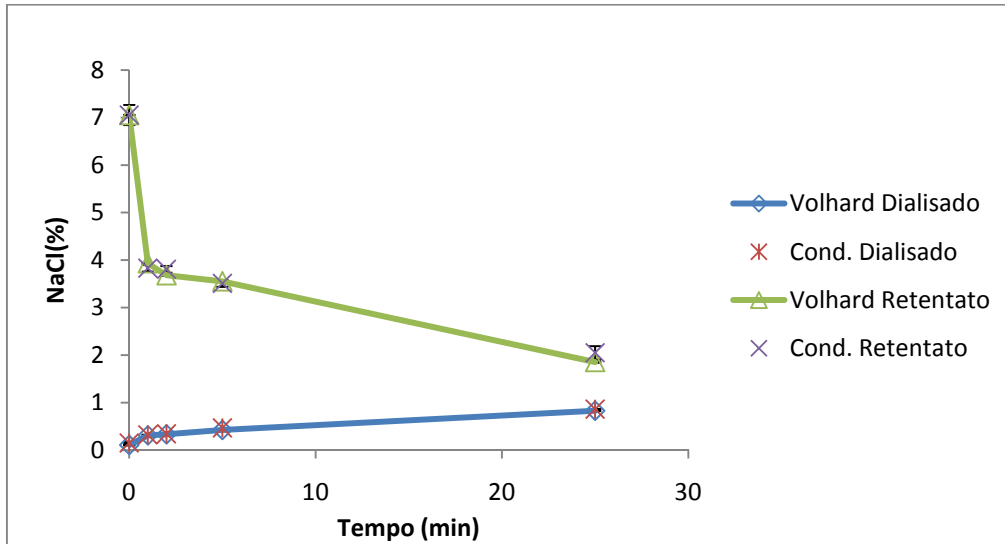


Figura 27: Resultados obtidos para a transferência de sal do retentato para o dialisado para o ensaio realizado a 300 MP, em % de NaCl.

O sal movimenta-se do retentato, onde consequentemente a sua concentração vai diminuindo ao longo do tempo, para o dialisado. Neste ensaio o equilíbrio também não foi atingido, mas os resultados mostram que a tendência ao longo do tempo é que a concentração de sal no dialisado e no retentato se igualem.

Os volumes também apresentam o mesmo comportamento visto anteriormente e estão representados na figura 28.

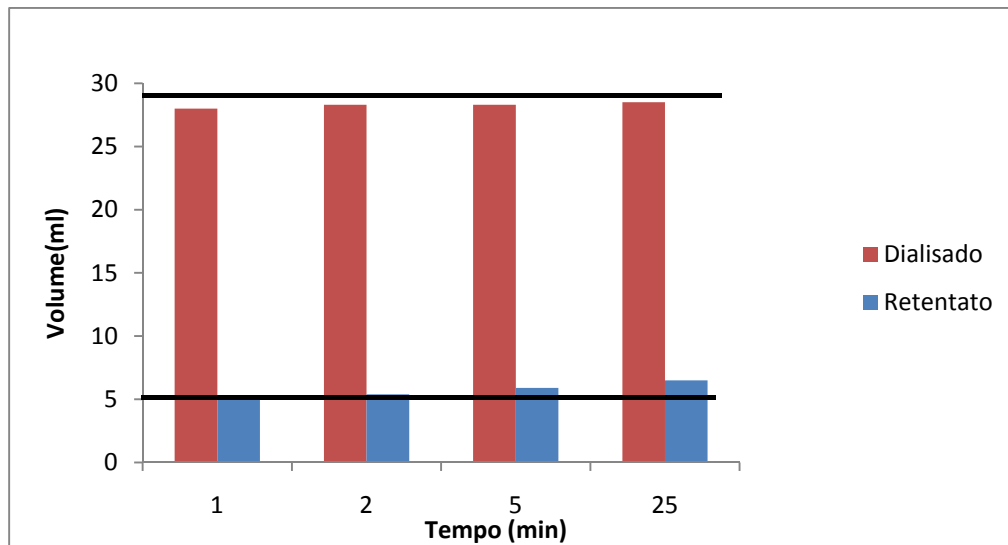


Figura 28: Variação do volume de retentato e dialisado para cada ensaio, em ml.

Nesta figura, as linhas pretas representam o valor de volume inicial das amostras. Confirma-se a diminuição de volume de dialisado, e conseqüente aumento de volume de retentato, o que confirma a transferência de água para o interior da membrana de diálise.

O aumento do volume de retentato apresenta um comportamento interessante para este ensaio de 300 MPa, uma relação linear para os primeiros ensaios, que se apresenta no gráfico da figura 29.

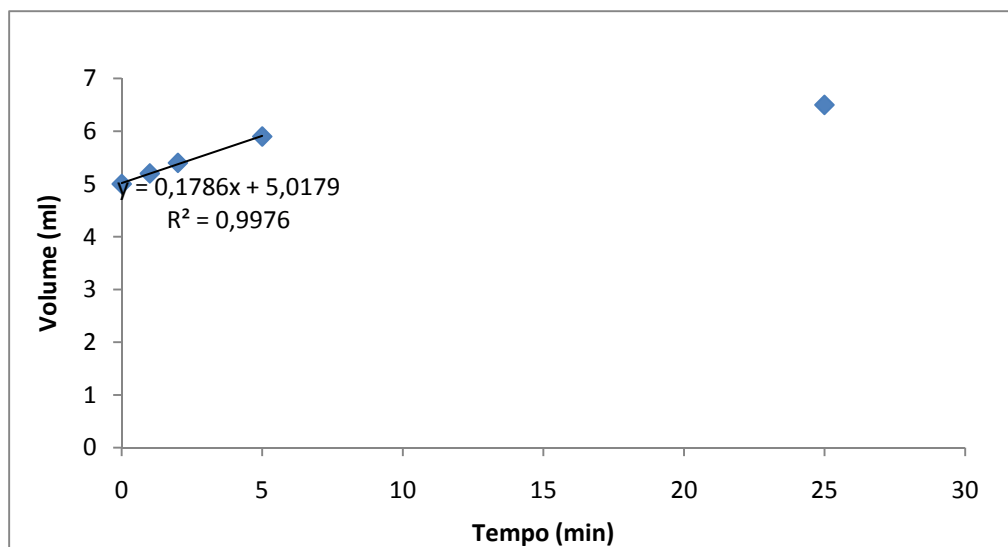


Figura 29: Representação da gama linear para as primeiras experiências a 300 MPa.

Este comportamento linear de aumento de volume no retentato e que se verificou neste ensaio a 300 MPa também seria expectável nos restantes ensaios realizados a 100 e 200 MPa. Este facto não se verificou provavelmente devido a erros experimentais,

nomeadamente relacionados com a perda de volume da solução inicial na execução experimental, o que leva a que não se tenha verificado esta tendência linear do aumento de volumes do retentato nos outros ensaios.

A tabela 6 apresenta os valores de perda de volume neste ensaio de 300 MPa.

Tabela 6: Diferença de volumes entre retentato e dialisado (em ml) e variação do volume do retentato e dialisado (em ml) para o ensaio de 300 MPa.

Tempo(min)	Perda de Volume (ml)	Δ Volume dialisado (ml)	Δ Volume retentato (ml)
1	1,3	1,5	0,2
2	0,8	1,2	0,4
5	0,3	1,2	0,9
25	0,9	2,4	1,5

Para esta experiência, verifica-se que a perda de volume se encontra dentro dos valores anteriormente registados. Apenas um ensaio ultrapassa a perda de 1 ml.

Com os volumes determinados, e seguindo o mesmo tratamento de dados dos outros ensaios, determinou-se a massa de NaCl do retentato e do dialisado, e calculou-se a variação da massa total ao longo do tempo (figura 30).

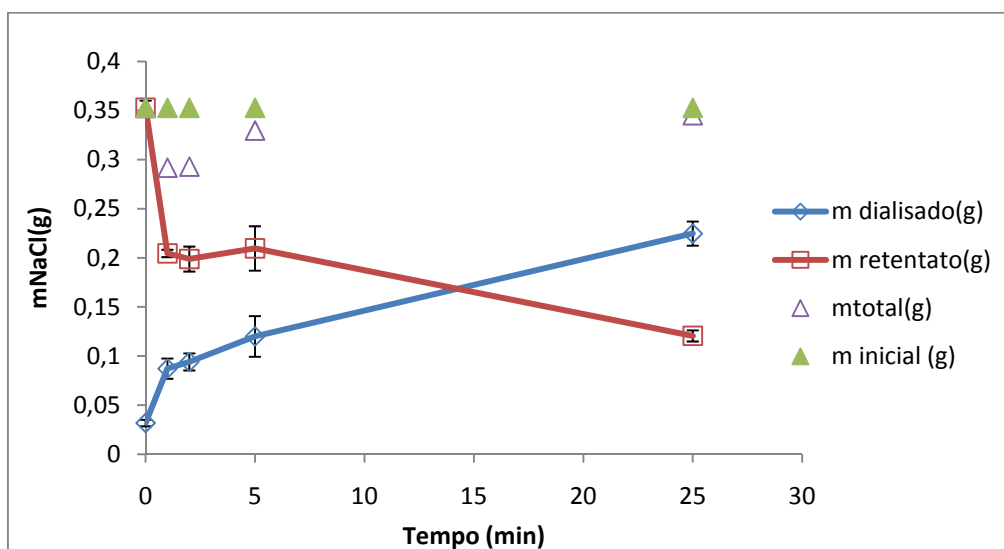


Figura 30: Variação da massa de NaCl do retentato, dialisado e massa total deste sal, em g, para cada experiência realizado a 300 MPa.

O NaCl é transferido do retentato para o dialisado, o que já tinha sido mostrado anteriormente. O valor da massa total de sal é mais baixo, pois o volume perdido no dialisado e retentato na execução experimental, em média, já foi maior, levando a uma consequente perda de massa deste sal.

De forma a se verificar se a proteína se difundiu para o dialisado, calculou-se a quantidade total de BSA presente no dialisado e retentato para algumas amostras (figura 31).

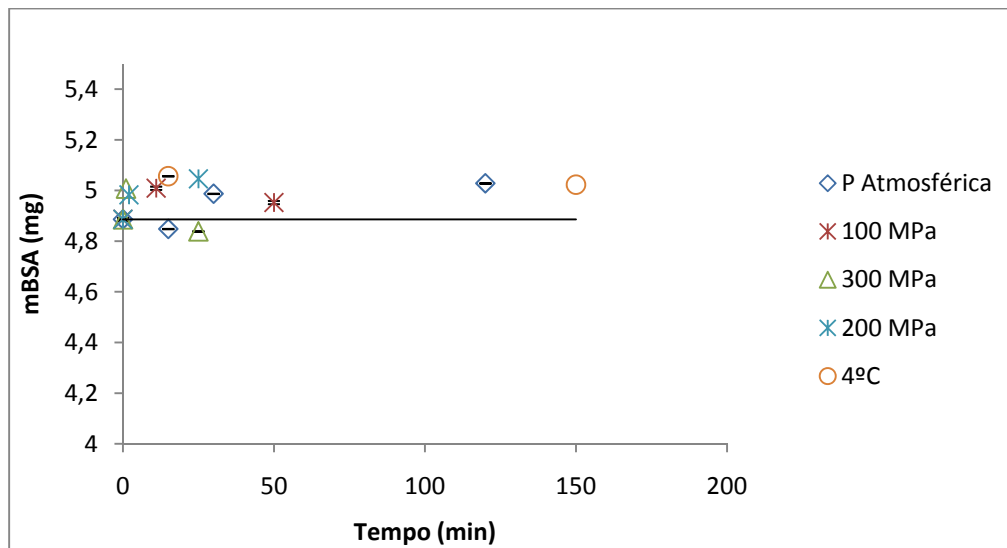


Figura 31: Massa de proteína BSA presente nas amostras realizadas a pressão atmosférica, 4°C, e 100, 200 e 300 MPa.

Analisando os resultados deste teste que estão representados na figura 32, concluiu-se que a quantidade total de proteína é semelhante ao valor inicial da solução de proteína, o que comprova que em todos os ensaios não ocorreu transferência de BSA para o dialisado.

3.2.6. Comparação entre os ensaios realizados: Pressão atmosférica, 100, 200 e 300 MPa

Para se compreender qual o efeito que o aumento de pressão provocou no processo de separação em estudo, procedeu-se à comparação da difusão do sal do retentato e dialisado (figuras 32 e 33). Como se pode verificar, a difusão do sal é mais rápida quando a diálise é efectuada sob alta pressão.

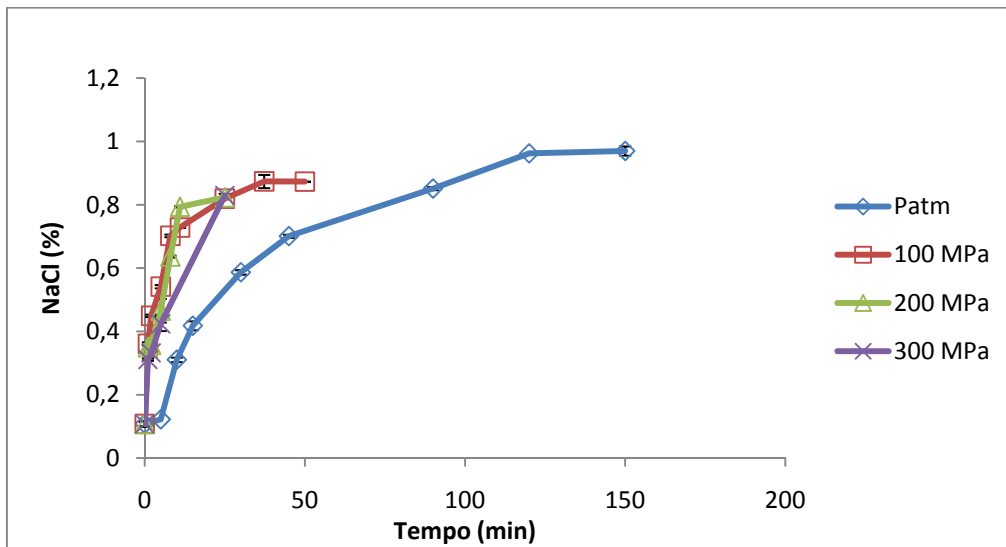


Figura 32: Representação gráfica da entrada de NaCl (%) para o dialisado dos ensaios à pressão atmosférica, 100 MPa, 200 MPa e 300 MPa.

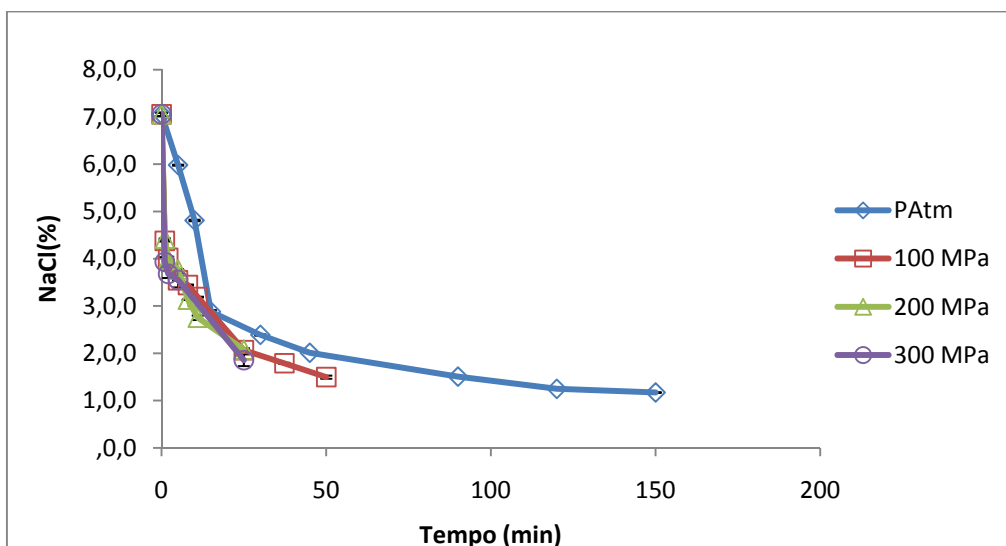


Figura 33: Representação gráfica da saída de NaCl (%) do retentado dos ensaios à pressão atmosférica, 100 MPa, 200 MPa e 300 MPa.

De modo a ser possível uma melhor comparação qualitativa do efeito da pressão na diálise, escolheu-se um intervalo de tempo (de 0 a 30 minutos) antes de se atingir o equilíbrio (figuras 34 e 35).

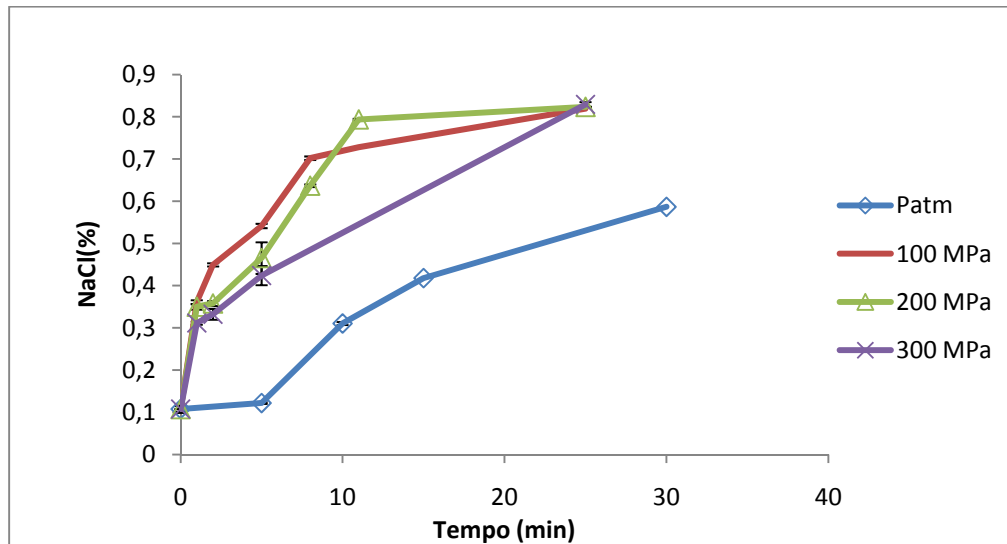


Figura 34: Representação gráfica da entrada de NaCl (%) para o dialisado dos ensaios à pressão atmosférica, 100 MPa, 200 MPa e 300 MPa num intervalo de tempo inicial, até 30 minutos.

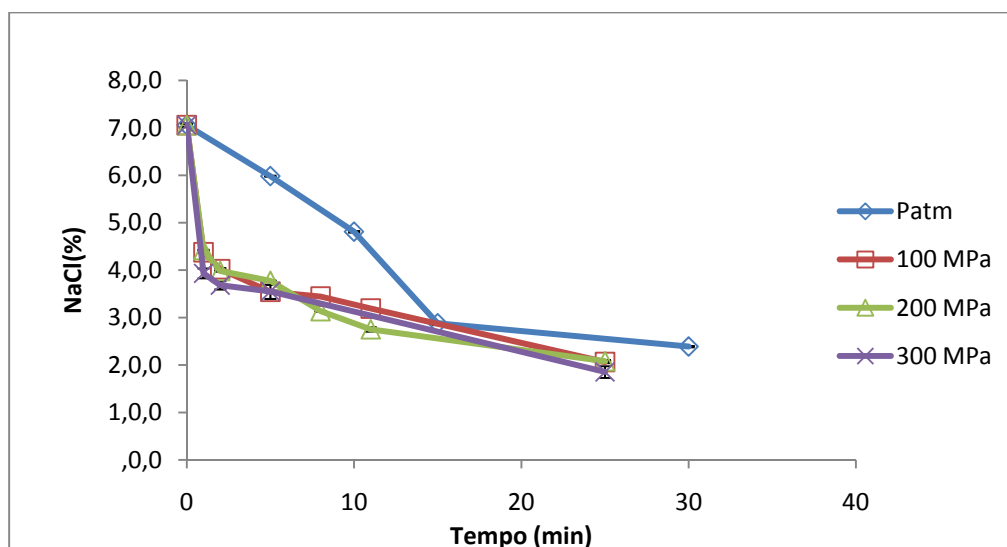


Figura 35: Representação gráfica de saída de NaCl (%) do retentado dos ensaios à pressão atmosférica, 100 MPa, 200 MPa e 300 MPa num intervalo de tempo inicial, até 30 minutos.

Verifica-se que para todos os ensaios realizados sob pressão a velocidade da diálise aumentou significativamente. Por exemplo, é visível que a difusão de sal do retentado é bastante mais rápida sob pressão. Aos 5 minutos sob pressão a concentração de sal é semelhante ao valor de 15 minutos a pressão atmosférica. Estes resultados indicam que a

realização da diálise sob pressão acelera a diálise, como se comprova pelos resultados apresentados pela tabela 7 onde se compara os resultados para o tempo de 5 minutos.

Tabela 7: Comparação da quantidade de NaCl (%) presente no retentato e dialisado, para o tempo de 5 minutos do ensaio realizado à pressão atmosférica e dos ensaios realizados na alta pressão (100,200 e 300 MPa).

Ensaio	Pressão atmosférica	100 MPa	200 MPa	300 MPa
% NaCl presente no retentato	5,98	3,54	3,98	3,55
%NaCl presente no dialisado	0,122	0,542	0,465	0,424

Analisando os resultados apresentados na tabela 7, torna-se evidente que existe uma aceleração da difusão de sal do retentato para o dialisado através da aplicação de pressão hidrostática, pois no ensaio realizado à pressão atmosférica a presença de sal no retentato é de cerca de 5,98%, enquanto que nos restantes ensaios a quantidade de sal possui valores na ordem dos 3,5%, o que significa uma diminuição de cerca de 40% de sal no retentato. Este tipo de comparação comprova que a utilização de alta pressão pode ser eficiente para diminuir o tempo de diálise.

Pelos gráficos representados nas figuras 34 e 35, conclui-se também que o valor de equilíbrio da diálise não deverá ser afectado pela pressão. Esta conclusão baseia-se principalmente nos resultados a 100 MPa, onde isso é visível, dado que para 200 e 300 MPa os tempos foram demasiado curtos para se poder verificar um valor quantitativo para o equilíbrio. O que os resultados a 100 MPa permitem concluir é que o tempo a que se atinge o equilíbrio seria menor, em virtude do efeito de aceleração que a pressão causa na diálise.

Nas figuras 36 e 37 apresenta-se a comparação da variação da massa de sal no retentato e dialisado, em quantidade total (g).

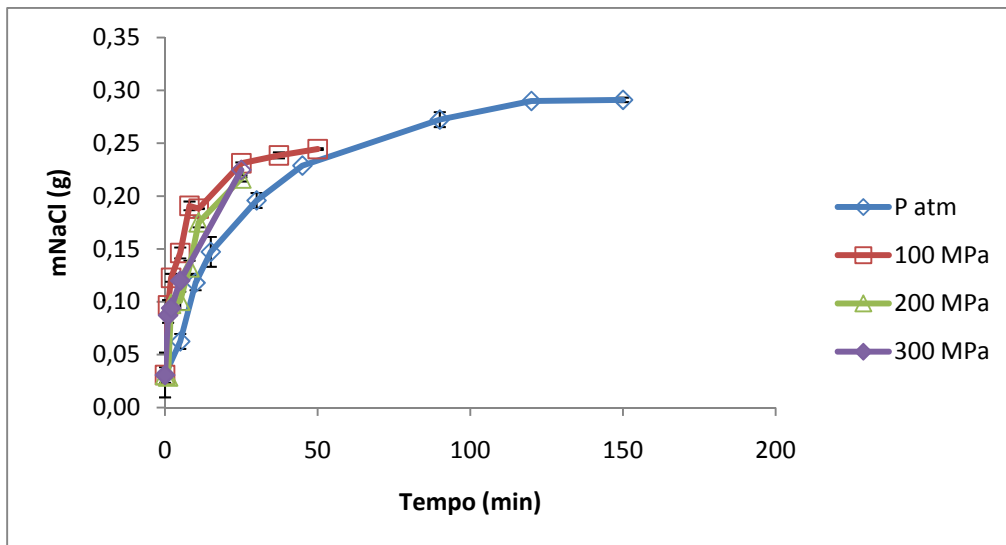


Figura 36: Comparação da variação da massa de NaCl (g) no dialisado dos ensaios realizados à pressão atmosférica, 100, 200 e 300 MPa.

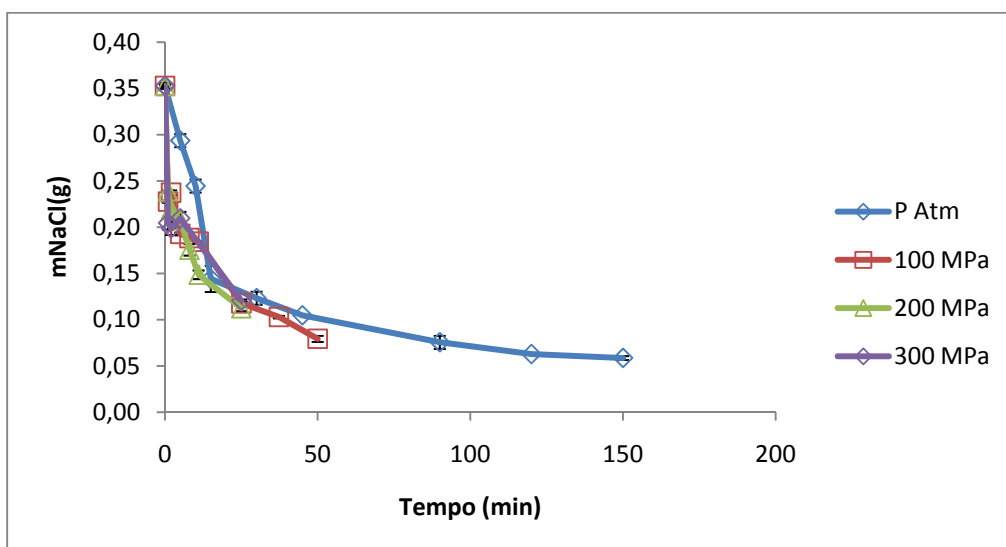


Figura 37: Comparação da variação da massa de NaCl (g) no retentado dos ensaios realizados à pressão atmosférica, 100, 200 e 300 MPa.

Comprova-se com estes gráficos o mesmo comportamento verificado anteriormente. O NaCl é transferido do retentado para o dialisado, e observando a figura conclui-se, de forma qualitativa, que a alta pressão beneficia a difusão do sal do retentado para o dialisado. Este facto pode ser comprovado comparando a massa total de sal para o tempo de 5 minutos (tabela 8).

Tabela 8: Comparação da massa de NaCl (g) presente no retentato e dialisado, para o tempo de 5 minutos do ensaio realizado à pressão atmosférica e dos ensaios realizados na alta pressão (100, 200 e 300 MPa).

Ensaio	Pressão atmosférica	100 MPa	200 MPa	300 MPa
Massa NaCl (g) presente no retentato	0,294	0,193	0,208	0,210
Massa NaCl (g) presente no dialisado	0,063	0,146	0,101	0,120

Observando os resultados, confirma-se o que já se tinha verificado para a quantidade de NaCl em %. Nos ensaios realizados a elevada pressão hidrostática verifica-se maior conteúdo de sal no dialisado comparativamente à massa de sal presente no dialisado do ensaio de pressão atmosférica, de onde se pode concluir mais uma vez que a difusão de sal do retentato para o dialisado foi mais rápida nos ensaios sob pressão.

3.2.7. Determinação da velocidade de transferência de sal/Coefficientes de difusão efectiva de NaCl

No gráfico apresentado na figura 39 apresenta-se a taxa de saída de sal por minuto no ensaio efectuado à pressão atmosférica.

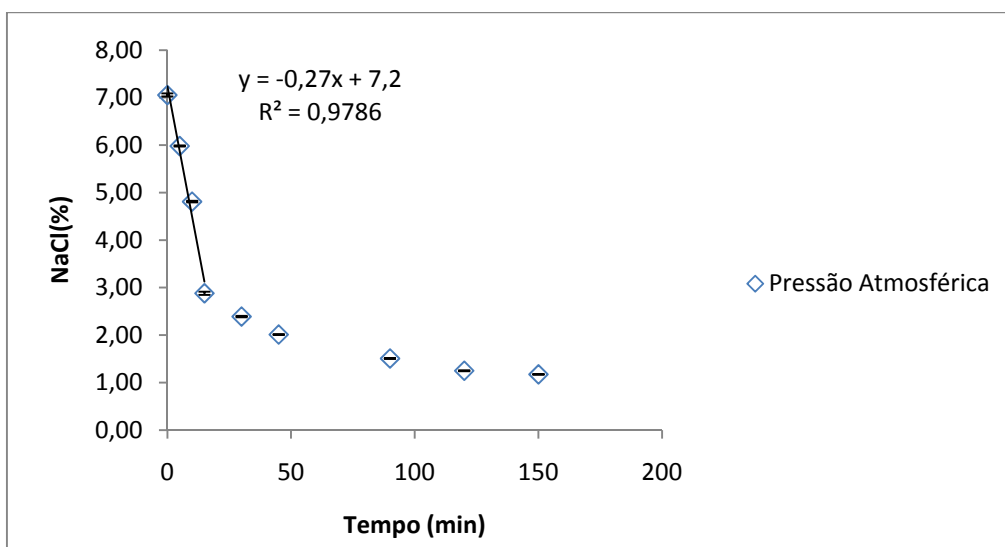


Figura 38: Determinação de velocidade de saída de sal para o ensaio realizado à pressão atmosférica.

Pelo declive da recta dos pontos iniciais ($y = -0,27x + 7,2$) concluiu-se que por cada minuto ocorre uma diminuição de cerca de 0,27% de sal para o dialisado, ou seja, o declive da recta representa a taxa de transferência de sal do retentato para o dialisado. Nos restantes ensaios realizados a pressão elevada não foi possível determinar esta taxa de saída de sal devido ao facto da transferência de sal ser muito rápida nos primeiros instantes do processo e sendo assim não foi possível determinar uma tendência linear. No ensaio realizado a 4°C também não se possuem pontos iniciais suficientes para determinar a taxa de transferência de sal do retentato para o dialisado, pois o primeiro ponto determinado foi aos 10 minutos, não se conseguindo também determinar uma recta para os pontos iniciais.

Foram determinados os coeficientes de difusão do sal do retentato para o dialisado, através da aplicação do modelo da solução da 2ª Lei de Fick para o caso de um cilindro finito. Considerou-se que a geometria da membrana utilizada nos ensaios experimentais podia ser aproximada à de um cilindro. Os resultados dos coeficientes de difusão efectivos obtidos e do parâmetro S_∞ estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Coeficientes de difusão efectivos e S_∞ para os ensaios realizados.

Ensaio	Pressão atmosférica	4°C	100 MPa	200 MPa	300 MPa
Des (m^2/s)	$1,12 \times 10^{-8}$	$1,28 \times 10^{-8}$	$3,16 \times 10^{-8}$	$8,29 \times 10^{-8}$	$4,42 \times 10^{-8}$
S_∞	1,968	1,979	2,206	2,944	2,085

Pela análise dos resultados obtidos, verifica-se que os coeficientes de difusão obtidos para os ensaios realizados a alta pressão, apesar de se encontrarem todos na mesma ordem de grandeza, apresentam um valor maior do que nos ensaios à pressão atmosférica, o que comprova os resultados anteriormente verificados qualitativamente. Comparando o ensaio à pressão atmosférica com os ensaios realizados sob pressão, verifica-se que para 100 MPa o valor do coeficiente de difusão é cerca de três vezes superior, para 200 MPa cerca de 7 vezes e para 300 MPa cerca de 4 vezes superior.

Estes resultados obtidos poderão vir afectados de erro, pois devido a limitações experimentais alguns destes ensaios não possuem muitos pontos experimentais, o que limita a obtenção dos coeficientes de difusão efectivos para a difusão de sal neste processo.

Relativamente a S_{∞} , verifica-se uma tendência para valores superiores quando a diálise é realizada sob alta pressão.

Capítulo IV Conclusão

O objectivo proposto a atingir nesta tese foi tentar perceber se a aplicação da tecnologia de alta pressão traria algum benefício na diálise de uma solução de NaCl e uma proteína (BSA).

Concluiu-se que, sob o efeito de alta pressão, a difusão do sal sofre uma aceleração, o que permite concluir que sob alta pressão a diálise é mais rápida. Relativamente à difusão de água, observou-se um aumento do volume do retentato em todos os ensaios, o que demonstra que se verificou difusão de água para dentro da membrana, em sentido contrário à transferência de NaCl. Verificou-se uma diminuição do volume final em alguns ensaios devido à execução experimental não ter sido a mais eficiente, o que levou a uma perda de volume de solução. Este facto está também relacionado com as limitações dos frascos usados nas experiências, que são ditadas pelo tamanho do vaso de alta pressão do equipamento usado.

Conseguiu-se determinar os coeficientes de difusão efectivos através do modelo da solução da 2ª Lei de Fick para os ensaios experimentais, e comprovou-se que a aplicação de alta pressão aumenta a taxa de difusão de saída de sal do retentato para o dialisado. Os coeficientes de difusão efectiva encontram-se todos dentro da mesma ordem de grandeza, mas os coeficientes dos ensaios realizados sob alta pressão apresentam um valor maior do que os ensaios realizados à pressão atmosférica. A determinação destes coeficientes pode ter sido afectada de erros devido a poucos pontos experimentais obtidos, o que limita a aplicação do modelo de transferência de massa escolhido.

Os resultados permitem assim concluir o potencial de realizar diálises mais rapidamente sob alta pressão.

Capítulo V Trabalho Futuro

Seria interessante efectuar os mesmos testes a pressões mais baixas (por exemplo 50 MPa) principalmente do ponto de vista de tornar esta aplicação economicamente mais viável, uma vez que não se obtiveram diferenças relevantes nos ensaios realizados a 100, 200 e 300 MPa. Testar esta metodologia em diálises efectuadas para outro tipo de amostras biológicas, para além de proteínas, poderá também vir a ser relevante.

Outros ensaios que se podem realizar é no sentido de fazer o *scale-up*, ou seja, efectuar os mesmos testes com volumes maiores de dialisado e retentato e membranas de maior diâmetro, de modo a provar a viabilidade de aplicação da tecnologia de alta pressão para este processo. Para tal ser possível, será necessário utilizar um equipamento de alta pressão com maior capacidade volumétrica.

Bibliografia

1. E.L.Cussler, *Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems*, Cambridge University Press (USA), (3rd edition): 427-466, 1997
2. Ho, W. and Sirkar, K., *Membrane handbook*: Chapman & Hall, 163-215, 1992
3. Seader, J., Henley, E., and Roper, D., *Separation Process Principles*: John Wiley & Sons, 2010
4. Rousseau, R.W., *Handbook of Separation Process Technology*, John Wiley & Sons: 954-968, 1987
5. Rasteiro, M.d.G., "*Portal Laboratórios Virtuais de Processos Químicos*", FCTUC Departamento de Engenharia Química, 2007
6. De Castro, M.D.L., Capote, F.P., and Ávila, N.S., *Is dialysis alive as a membrane-based separation technique?*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(4): 315-326, 2008
7. Luo, J., Wu, C., Xu, T., and Wu, Y., *Diffusion dialysis-concept, principle and applications*, *Journal of Membrane Science*, 366(1-2): 1-16, 2011
8. Scopes, R., *Protein purification: principles and practice*, 3 ed: Springer-Verlag, 375, 1994
9. Hagiya, K., Ito, M., Setsu, I., and Deguchi, K., *High pressure ultrafilter in carbohydrate synthesizing apparatus, has spring arranged inside filter paper that holds filter paper with respect to sintered filter provided between filter paper and cylinder*, 2005
10. Anonymous, T.F., *Thermo Scientific Pierce High-Performance Dialysis, Desalting and Detergent Removal Technical Handbook*, 2009
11. Marshak, D., *Strategies for protein purification and characterization: a laboratory course manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996
12. Divya, M.P. and Rajput, Y.S., *A multipurpose device for protein concentration, dialysis and buffer exchange*, *Current Science*, 93(4): 454-456, 2007
13. Sodhi, R. and Rajput, Y.S., *Method for dialysis of samples in microliter volumes*, *Analytical Biochemistry*, 315(1): 141-142, 2003

14. Torto, N.,Laurell, T.,Gorton, L., and Marko-Varga, G., *Recent trends in the application of microdialysis in bioprocesses*, Analytica Chimica Acta, 379(3): 281-305, 1999
15. Wenzel, K.D.,Vrana, B.,Hubert, A., and Schuurmann, G., *Dialysis of persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons from semipermeable membranes. A procedure using an accelerated solvent extraction device*, Analytical Chemistry, 76(18): 5503-5509, 2004
16. Shukla, A.K.,Shukla, K.M., and Shukla, M.M., *Microdialysis device comprises spherical chamber containing cavity, membrane, and cap having through hole, where chamber always tilt in favor for dialysis when placed in sample solution containing different molecular weight molecules*,2009
17. Bertucco, A.V., G., *High Pressure Technology: Fundamentals and Applications*, Elsevier Science, 2001
18. Rastogi, N.K.,Raghavarao, K.S.M.S.,Balasubramaniam, V.M.,Niranjan, K., and Knorr, D., *Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47(1): 69 - 112, 2007
19. Raoultwack, A.L., *Recent Advances in the Osmotic Dehydration of Foods*, Trends in Food Science & Technology, 5(8): 255-260, 1994
20. Cheftel, J.C. and Culioli, J., *Effects of high pressure on meat: A review*, Meat Science, 46(3): 211-236, 1997
21. Rendueles, E.,Omer, M.K.,Alvseike, O.,Alonso-Calleja, C.,Capita, R., and Prieto, M., *Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review*, LWT - Food Science and Technology,2010
22. Knorr, D.,Heinz, V., and Buckow, R., *High pressure application for food biopolymers*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, 1764(3): 619-631, 2006
23. Fonberg-Broczek, M.,Windyga, B.,Szcawinski, J.,Szcawinska, M.,Pietrzak, D., and Prestamo, G., *High pressure processing for food safety*, Acta Biochimica Polonica, 52(3): 721-724, 2005
24. Knorr, S.T.A.M.V.H.D., *Review: Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing*, Food Reviews International Dairy Journal, 405 -423, 2006

25. Rastogi, N.K., Raghavarao, K., Balasubramaniam, V.M., Niranjana, K., and Knorr, D., *Opportunities and challenges in high pressure processing of foods*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1): 69-112, 2007
26. Derossi, A., De Pilli, T., Severini, C., and McCarthy, M.J., *Mass transfer during osmotic dehydration of apples*, *Journal of Food Engineering*, 86(4): 519-528, 2008
27. Villacís, M.F., Rastogi, N.K., and Balasubramaniam, V.M., *Effect of high pressure on moisture and NaCl diffusion into turkey breast*, *LWT - Food Science and Technology*, 41(5): 836-844, 2008
28. Sopanangkul, A., Ledward, D.A., and Niranjana, K., *Mass transfer during sucrose infusion into potatoes under high pressure*, *Journal of Food Science*, 67(6): 2217-2220, 2002
29. Salvador, Â.M.C., *Efeito de alta pressão no processo de demolha de bacalhau*, Universidade de Aveiro, 2009
30. Haouet, M.N., Altissimi, M.S., Framboas, M., and Galarini, R., *Validation of the Volhard method for chloride determination in food*, *Accreditation and Quality Assurance*, 11(1-2): 23-28, 2006

Anexo A: Tabelas Auxiliares

Tabela A1: Valores obtidos para a quantidade de NaCl(%) pelo método condutivimétrico e de Volhard para o dialisado para o ensaio realizado à pressão atmosférica.

Tempo(min)	V ₁ Volhard (ml±0,001)	V ₂ Volhard (ml±0,001)	Média NaCl(%) Volhard	Desv.Pad Volhard	Média NaCl (%) Cond.	Desv. Pad. Cond.
5	4,423	4,412	0,2297897	0,00E+00	0,230	6,56E-02
10	4,345	4,346	0,4182702	7,07E-03	0,413	7,07E-03
15	4,224	4,110	0,5257292	1,41E-02	0,516	8,49E-02
30	4,450	4,454	0,6945249	7,07E-03	0,700	5,66E-02
45	4,404	4,374	0,8085683	4,85E-03	0,805	0,00E+00
90	4,603	4,613	0,9590331	4,98E-03	0,956	7,78E-02
120	2,345	2,465	1,0698654	0,00E+00	1,060	7,07E-03
150	4,644	4,556	1,0777468	1,46E-02	1,068	7,07E-03

Tabela A2: Valores obtidos para a quantidade de NaCl(%) pelo método condutivimétrico e de Volhard para o retentato para o ensaio realizado à pressão atmosférica.

Tempo (min)	V₁ Volhard (ml±0,001)	V₂ Volhard (ml±0,001)	Média NaCl(%) Volhard	Desv. Pad Volhard	Média NaCl(%) Cond.	Desv. Pad. Cond.
5	3,273	3,235	5,87	6,56E-02	5,83	2,33E-04
10	3,340	3,356	4,70	7,07E-03	4,71	7,07E-03
15	3,618	3,621	2,77	8,49E-02	2,71	7,07E-03
30	3,234	3,206	2,28	5,66E-02	2,24	1,41E-02
45	4,002	4,013	1,90	0,00E+00	1,90	7,07E-03
90	4,156	4,124	1,40	7,78E-02	1,45	0,00E+00
120	4,145	4,230	1,14	7,07E-03	1,14	7,07E-03
150	4,242	4,250	1,06	7,07E-03	1,06	0,00E+00

Tabela A3: Valores obtidos para a quantidade de NaCl(%) pelo método condutivimétrico e de Volhard para o dialisado para o ensaio realizado à pressão de 100 MPa.

Tempo(min)	V ₁ Volhard (ml±0,001)	V ₂ Volhard (ml±0,001)	Média NaCl(%) Volhard	Desv.Pad Volhard	Média NaCl (%) Cond.	Desv. Pad. Cond.
1	4,442	4,324	0,361	4,88E-03	0,313	2,12E-02
2	4,227	4,236	0,449	3,72E-03	0,451	3,54E-02
5	4,506	4,568	0,542	5,13E-03	0,477	2,12E-02
8	3,76	3,75	0,702	4,14E-03	0,737	4,95E-02
11	3,799	3,8	0,728	4,14E-04	0,745	7,07E-03
25	3,63	3,599	0,819	0,00E+00	0,799	7,07E-02
37,3	4,27	4,236	0,874	2,81E-03	0,956	3,54E-02
50	4,254	4,253	0,873	8,27E-04	0,871	1,41E-01

Tabela A4: Valores obtidos para a quantidade de NaCl(%) pelo método condutivimétrico e de Volhard para o retentato para o ensaio realizado à pressão de 100 MPa.

Tempo(min)	V ₁ Volhard (ml±0,001)	V ₂ Volhard (ml±0,001)	Média NaCl(%) Volhard.	Desv.Pad Volhard	Média NaCl (%) Cond.	Desv. Pad. Cond.
1	3,125	3,132	4,38	1,16E-03	4,47	2,12E-01
2	3,273	3,289	4,02	2,65E-03	4,06	2,12E-01
5	3,44	3,53	3,54	1,49E-03	3,86	1,41E-01
8	3,532	3,524	3,44	1,32E-03	3,3	1,41E-01
11	3,634	3,639	3,19	8,27E-04	3,21	2,83E-01
25	4,111	4,124	2,06	2,15E-03	2,07	2,12E-01
37,3	4,239	4,231	1,79	1,32E-03	1,79	7,07E-02
50	4,35	4,37	1,5	3,31E-03	1,46	2,83E-01

Tabela A5: Valores obtidos para a quantidade de NaCl(%) pelo método condutivimétrico e de Volhard para o dialisado para o ensaio realizado à pressão de 200 MPa.

Tempo (min)	V ₁ Volhard (ml±0,001)	V ₂ Volhard (ml±0,001)	Média NaCl(%) Volhard.	Desv.Pad Volhard	Média NaCl(%) Cond.	Desv. Pad. Cond.
1	3,273	3,252	0,350	6,85E-03	0,345	7,07E-03
2	4,233	4,352	0,358	5,94E-03	0,354	4,95E-03
5	4,192	4,16	0,465	3,74E-02	0,492	2,12E-03
8	4,222	4,252	0,637	3,16E-03	0,638	5,66E-03
11	4,272	4,291	0,794	1,88E-03	0,785	1,41E-02
25	4,542	4,532	0,823	6,16E-04	0,824	7,07E-03

Tabela A6: Valores obtidos para a quantidade de NaCl(%) pelo método condutivimétrico e de Volhard para o retentato para o ensaio realizado à pressão de 200 MPa.

Tempo (min)	V ₁ Volhard (ml±0,001)	V ₂ Volhard (ml±0,001)	Média NaCl(%)	Desv. Pad Volhard	Média NaCl(%) Cond.	Desv. Pad. Cond.
1	4,349	4,335	4,42	1,08E-02	4,41	7,07E-03
2	4,252	4,262	3,98	1,18E-02	3,97	7,07E-03
5	4,444	4,438	3,77	8,66E-03	3,77	7,07E-03
8	4,573	4,563	3,14	6,19E-03	3,13	1,41E-02
11	4,652	4,692	2,75	4,67E-02	2,76	3,54E-01
25	4,883	4,921	2,08	2,90E-02	2,06	2,12E-02

Tabela A7: Valores obtidos para a quantidade de NaCl(%) pelo método condutivimétrico e de Volhard para o dialisado para o ensaio realizado à pressão de 300 MPa.

Tempo(min)	V ₁ Volhard (ml±0,001)	V ₂ Volhard (ml±0,001)	Média NaCl(%) Volhard	Desv.Pad Volhard	Média NaCl (%) Cond.	Desv. Pad. Cond.
1	3,944	3,926	0,311	3,72E-03	0,322	7,07E-03
2	3,848	3,88	0,332	1,27E-02	0,344	7,07E-03
5	3,554	3,546	0,424	2,26E-02	0,47	0,00E+00
25	3,554	3,61	0,829	5,66E-03	0,863	7,07E-03

Tabela A8: Valores obtidos para a quantidade de NaCl(%) pelo método condutivimétrico e de Volhard para o retentato para o ensaio realizado à pressão de 300 MPa.

Tempo(min)	V ₁ Volhard (ml±0,001)	V ₂ Volhard (ml±0,001)	Média NaCl(%) Volhard	Desv.Pad Volhard	Média NaCl (%) Cond.	Desv. Pad. Cond.
1	3,68	3,63	3,93	1,03E-02	3,83	7,07E-02
2	3,72	3,762	3,68	8,68E-03	3,81	7,07E-02
5	3,761	3,79	3,55	2,07E-02	3,51	7,07E-02
25	3,34	3,489	1,85	1,23E-02	2,05	1,41E-01

Anexo B: Equações Auxiliares

$$m_{NaCl\ total} (g) = m_{NaCl\ dial.f} + m_{NaCl\ ret.f} = \frac{V_{dial.f} \times m_{NaCl\ dial.f}(\%)}{100} + \frac{V_{ret.f} \times m_{NaCl\ ret.}(\%)}{100}$$

Equação B1: Balanço de massa da determinação da quantidade de NaCl em g.