

novas técnicas cromatográficas

Manuel Mota, José Teixeira, Alexander Yelshin, Susana Cortez
Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho
Campus de Gualtar, Braga, Portugal
E-mail: mmota@reitoria.uminho.pt



Resumo

A cromatografia é um processo de separação muito especial, na medida em que permite separar compostos de misturas complexas com grande precisão. Mesmo elementos muito similares, como as proteínas que podem variar apenas num aminoácido, podem ser separados por cromatografia. Na verdade, a cromatografia pode purificar praticamente qualquer substância solúvel ou volátil, desde que a fase sólida, a fase móvel e as condições de operação empregues sejam as correctas. A cromatografia tem ainda a vantagem de poder ser utilizada para separar produtos lábeis, desde que as condições de operação aplicadas não sejam muito severas. Por estas razões a cromatografia tem uma variedade de usos no campo da biotecnologia existindo numerosas técnicas cromatográficas, como a cromatografia de exclusão molecular, de troca iónica e de afinidade, cujos fundamentos experimentais e teóricos estão bem estabelecidos. No que se refere ao fraccionamento de macromoléculas, nanopartículas, colóides e/ou microorganismos em meios porosos permanecem ainda muitas dúvidas. Neste artigo apresenta-se uma breve descrição de dois novos tipos de cromatografia que podem constituir novas e interessantes alternativas de separação: a cromatografia hidrodinâmica e a cromatografia *slalom*.

1. INTRODUÇÃO

O estudo do transporte de fluidos em meios heterogéneos tem aplicação em distintos campos da ciência e engenharia tais como a reologia, geofísica, física e química, física dos polímeros, física estatística, ciência dos colóides, tecnologia do petróleo, agricultura e biotecnologia [1].

Uma subclasse particularmente notável dos materiais heterogéneos é a área dos meios porosos. Mesmo o termo "meios porosos" engloba uma variedade profunda de processos e dispositivos como torres empacotadas, leitos de areia e substâncias como pedra calcária, filtros de papel e partículas catalíticas. Para meios porosos a predição do fluxo do fluido entre fases continua a ser alvo de vários estudos, apesar de já se terem passado muitos anos de pesquisa. As soluções a este problema são de grande importância para muitas aplicações. Por exemplo prever o fluxo e o transporte de contaminantes nos

Abstract

Chromatography is a very special separation process since it can separate complex mixtures with great precision. Even very similar components, such as proteins that may only vary by a single amino acid, can be separated with chromatography. Chromatography can purify basically any soluble or volatile substance if the right solid phase, carrier fluid, and operating conditions are employed. Furthermore, chromatography can be used to separate labile products since the conditions under which it is performed are not severe. Therefore, chromatography is quite well suited to a variety of uses in the field of biotechnology and numerous chromatographic techniques exist, as the molecular exclusion, the ionic change and affinity chromatography, whose experimental and theoretical foundations are very well established. Despite the numerous advantages of chromatography, in what concerns the separation of macromolecules, nanoparticles, colloids and/or microorganisms in porous media many doubts still remain. This article presents a brief description of two new types of chromatography that might offer new exciting opportunities: the hydrodynamic and the slalom chromatography.

aquíferos e nos movimentos na zona insaturada, do óleo e do gás em reservatórios de petróleo, em movimentações do solvente e na recuperação assistida de petróleo, na transferência de massa e de calor em reactores de leito fixo em engenharia química, em reservatórios geotérmicos e em materiais de construção, na dispersão de poluentes dos depósitos de desperdícios radioactivos, em processos de filtração, e em transporte dos líquidos e de produtos químicos nos pulmões e noutros órgãos [1].

O movimento de colóides e de microrganismos em meios porosos é um fenómeno muito frequente na natureza e indústria: no movimento das partículas no interior do solo, em filtros de purificação de águas, na separação cromatográfica, etc. [2,3,4]. É importante saber como o tamanho e a forma dessas partículas influenciam o fluxo durante a sua passagem por meios porosos e cromatográficos, em particular.

A cromatografia é definida como um processo de separação de componentes de uma amostra pela sua distribuição entre um fluido corrente (fase móvel) e um adsorvente (fase estacionária) [5]. A fase estacionária pode ser sólida, um líquido adsorvido a um sólido ou um gel; pode ser empacotada numa coluna ou espalhada por uma superfície, formando uma camada fina. A fase móvel pode ser um líquido ou um gás.

Os numerosos métodos cromatográficos existentes são poderosos meios de separação de partículas e moléculas e têm uma base experimental e teórica bem estabelecida. Por exemplo a cromatografia de exclusão molecular (SEC, do inglês, *size exclusion chromatography*), que consiste numa separação em solução por efeito crivo é um dos métodos padrão com mais vasta aplicação. É frequentemente, usado como o primeiro passo dum esquema de purificação para separar as moléculas de interesse das que têm características (de tamanho) radicalmente diferentes. Também pode ser empregue para mudar o ambiente do tampão, para retirar o sal de uma amostra de biopolímeros ou pode ser usada para determinar parâmetros moleculares como o raio hidrodinâmico e a massa molecular. No entanto, até agora, o movimento de macromoléculas e nanopartículas em meios porosos continua a ser objecto de investigação [6,7,8].

Os métodos cromatográficos baseiam-se no equilíbrio que se estabelece entre a fase móvel e a fase estacionária. Há pouco tempo surgiram técnicas de cromatografia fundamentadas na separação em situações de não equilíbrio, durante o fluxo de uma solução numa coluna com poros intra - partículas. Estas técnicas, designadas por cromatografia hidrodinâmica (HDC, do inglês, *hydrodynamic chromatography*) e cromatografia *slalom* (SC, do inglês, *slalom chromatography*), baseiam-se no uso de fluxo laminar que ocorre nos espaços intersticiais existentes entre as partículas na coluna. Estes processos dependem da taxa de eluição e do tamanho das partículas no empacotamento e não do tamanho dos poros ou da sua natureza química [9].

A HDC foi desenvolvida e aplicada até hoje, sobretudo, na separação de polímeros sintéticos como, por exemplo, poliestirenos. A ordem de eluição na HDC é a mesma que na SEC. Por outro lado, o uso da SC tem sido reportado mais para moléculas de cadeia dupla de ADN e a sua ordem de eluição é oposta à verificada na cromatografia de exclusão molecular e na cromatografia hidrodinâmica [9].

Este artigo tenta dar a conhecer ao leitor as características de cada uma destas técnicas de não equilíbrio que constituem algumas das recentes soluções propostas para a separação de macromoléculas e nanopartículas em meios porosos.

2. CROMATOGRAFIA HIDRODINÂMICA DE PARTÍCULAS RÍGIDAS

De acordo com Venema [10] a introdução da cromatografia hidrodinâmica (HDC) como técnica de separação por tamanho deu-se nos anos setenta, onde esta foi experimentada dentro de pequenos vasos capilares cilíndricos lineares e em colunas empacotadas com partículas esféricas.

Durante o fluxo de uma solução de polímeros num capilar, sob a influência do movimento browniano (movimento, neste caso, dos polímeros devido ao movimento das moléculas da fase móvel), cada molécula alcançará todas as regiões acessíveis do espaço capilar durante o seu transporte. Contudo, a região acessível a cada polímero depende do seu tamanho molecular. Devido à sua conformação, o polímero pode não atingir a região perto da parede do capilar. Por causa do perfil de velocidades do fluxo (perfil parabólico)

surtem regiões inacessíveis onde a velocidade do fluido é baixa e o gradiente de velocidade é alto (próximo da parede do capilar). Desde que a densidade da "camada de exclusão" dependa do tamanho molecular, é desenvolvida uma separação: polímeros maiores deslocam-se mais rapidamente pelo vaso capilar do que os menores. É neste fenómeno que se baseia a cromatografia hidrodinâmica (HDC), de acordo com Hoagland [11].

A cromatografia hidrodinâmica oferece um método para a separação de polímeros em solução ou de partículas em suspensão com base no seu tamanho. No leito de uma coluna, a separação ocorre nos canais inter - partículas e a ordem de eluição é das partículas grandes para as mais pequenas, análoga à cromatografia de exclusão molecular [12].

A aplicação de HDC num capilar para classificação e separação de fibras com partículas de tamanho da ordem do micrometro é descrita por Pascale [13]. Numa experiência com um tubo de diâmetro de 15 mm e comprimento de 12 m (fluxo laminar) foram separadas suspensões de fibras de polpa de papel, e partículas micrométricas usadas na produção de papel como aditivo. As fibras de celulose usadas tinham um comprimento de 0,2 mm a 4 mm e as micropartículas (CaCO_3) um tamanho à volta dos 3 μm . Obtiveram-se os seguintes resultados para uma velocidade da fase móvel de 0,112 m/s ($\text{Re} \sim 1650$): para as fibras, a dispersão axial e o tempo médio de passagem, foram, respectivamente: $18 \pm 4 \text{ cm}^2/\text{s}$ e $91 \pm 4 \text{ s}$; para os aditivos, foram $160 \pm 80 \text{ cm}^2/\text{s}$ e 107 s ; o tempo médio de passagem do fluido eluente foi também de 107 s. A diferença de tempo entre o pico dos aditivos e o das fibras foi de 8 s.

A HDC tem sido aplicada, com sucesso, para medição e análise da distribuição do tamanho molecular de polímeros com peso molecular elevado, solúveis em água [11]. A extensão do método tem sido testada através de experiências com xantano e poliácridamida hidrolisada. O xantano é um polissacárido bastante rígido, considerando aqui a macromolécula do polis-

sacárido xantano tipo — $MW = 1,6E + 06$ [14], a uma concentração de 400 ppm numa solução de 5 g/L de NaCl, e $\text{pH} = 7$, como tendo a forma de bastonetes rígidos com comprimento 1 μm , e largura 2 nm. A separação ocorre durante a convecção do polímero dissolvido através do volume intersticial da coluna de cromatografia empacotada com esferas não porosas. Configurações em não-equilíbrio do polímero são espontaneamente geradas pelo fluxo complexo por entre as esferas. Essas alterações de configuração afectam, fortemente, as medidas do tamanho molecular. Para maximizar a resolução, a tensão hidrodinâmica deve ser reduzida pelo emprego de caudais extremamente baixos.

Supondo que os canais intersticiais numa coluna empacotada podem ser representados por um conjunto de tubos capilares, foi desenvolvido um modelo para a taxa de migração de macromoléculas que em seguida foi comparado com dados de eluição experimentais. Foram investigadas a influência do tamanho e do tipo de macromolécula, a eficácia do solvente e a velocidade da fase móvel na eluição na HDC. O comportamento da eluição em colunas empacotadas parece obedecer, basicamente, a teorias de migração simples desenvolvidas para tubos abertos. As posições relativas do pico na HDC dependem, parcialmente, da velocidade do eluente [15].

A gama dinâmica da separação depende do tamanho das partículas do leito de empacotamento da coluna. De acordo com dados de Gramain e Myard [16] é possível estimar uma razão entre o tamanho da molécula e o tamanho do poro λ e uma razão entre o tamanho da molécula e o tamanho da partícula do empacotamento λ_p . Para um poliestireno de peso molecular $10E + 06$ o tamanho da molécula é cerca de 100 nm. Assumindo uma porosidade do empacotamento de 0,36, para um leito de partículas com tamanhos no intervalo de 1,4 μm a 2,7 μm , e sabendo que o tamanho (ou diâmetro) dos poros é dado por

$$d_{pav} = \frac{2}{3} \cdot \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \cdot d_{av}$$

(onde d_{pav} é o tamanho médio dos poros, ε é a porosidade do leito e d_{av} o tamanho das partículas) tem-se, respectivamente, λ de 0,19 a 0,1 e λ_p de 0,07 a 0,037: Isto significa a presença de uma região de difusão não acessível ao trajecto molecular. A estimativa correcta de λ e de λ_p é importante dada a flexibilidade e a morfologia que as macromoléculas podem assumir.

Hoagland e Prud'homme [11], usando um enchimento de partículas não porosas numa coluna, demonstraram que a HDC de macromoléculas flexíveis e rígidas fornece medidas do tamanho molecular que dependem fortemente do caudal. Esta dependência do caudal é explicada por modelos macromoleculares simples em termos de deformação e orientação num alongamento uniaxial fixo. Numa experiência de HDC, uma pequena quantidade de solução de polímero diluído foi injectada numa coluna empacotada com esferas de 10 μm a 40 μm . A coluna proporciona uma rede de poros com passagens por interstícios um pouco maiores do que as dimensões de cada molécula (tamanho de poro $\sim 3,5 \mu\text{m}$ a $15 \mu\text{m}$, raio do polímero $\sim 0,05 \mu\text{m}$ a $0,5 \mu\text{m}$). A técnica de cromatografia hidrodinâmica acompanha as mudanças da conformação molecular pelas variações de caudal, podendo as moléculas sofrer extensão e orientação de acordo com a tensão hidrodinâmica. A indução do alongamento pelo fluxo num polímero flexível, acontece quando a cadeia é sujeita a forças hidrodinâmicas superiores às forças de relaxamento da cadeia, que surgem do movimento browniano. A importância do fluxo pode ser, correlacionada através do n° de Deborah De : a razão das forças hidrodinâmicas com as forças brownianas.

Só se verifica um significativo alongamento molecular em fluxos estacionários para valores de De elevados, normalmente a partir de $De > 0,5$. Por outro lado, verifica-se uma enorme deformação molecular quando De é maior do que a unidade [11]. Estas deformações manifestam-se, sobretudo, em situações de quedas de pressão elevadas, para

soluções de concentração baixa de polímeros bombeadas através de meios porosos. No fluxo de soluções de polímeros não esféricos através de meios porosos não são encontradas quedas de pressão excessivamente elevadas. Contudo, as macromoléculas poliméricas rígidas com a forma de bastonete podem ser capazes de se orientar num fluxo elevado seguindo grosseiramente as linhas de fluxo [11]. Embora esta situação não provoque efeitos reológicos tão dramáticos como no caso de polímeros flexíveis, a orientação de polímeros com forma de bastonete durante o fluxo através de passagens estreitas da coluna pode também ter um efeito na eluição.

Estudos muito recentes têm tentado descrever melhor o movimento de polímeros ao longo de uma coluna em que se verifica um mecanismo de cromatografia hidrodinâmica. A maioria das teorias de HDC derivou do modelo chamado de retenção, usado para descrever a migração de polímeros em vasos capilares abertos, [17], onde não se considera a existência de tortuosidade, (Figura 1).

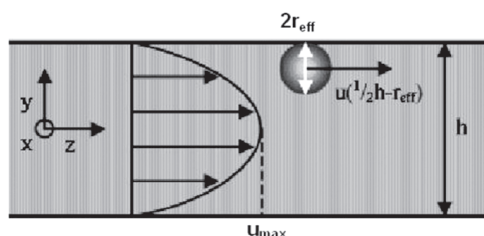


Figura 1 Princípio de separação da HDC, onde uma partícula com raio efectivo r_{eff} é excluída da parede num canal com diâmetro h no qual existe um perfil de velocidade parabólico $u(y)$ [17].

No modelo de retenção, a migração do polímero é descrita pelo valor de retenção τ como função da razão λ [10, 18].

$$\tau = t_m / t_0 = 1 / (1 + 2\lambda - C\lambda^2) \quad (1)$$

onde t_m é o tempo de migração do polímero, t_0 é o tempo de retenção correspondente fracção de vazios da coluna. λ é o tamanho relativo da molécula, neste caso definido como:

$$\lambda = r_{eff} / (h/2) \quad (2)$$

em que r_{eff} é o raio efectivo da macromolécula e h é o raio do capilar (ver Figura 1).

O coeficiente C é considerado constante [10, 17] e varia entre 0,5 e 5. Para uma exclusão simples num perfil de fluxo parabólico $C = 0,5$ [18]. Num leito empacotado numa coluna de cromatografia hidrodinâmica são recomendados os seguintes valores de C : 2,698 [19], 2,7 [16], 2,8 [20].

Muitas vezes, na HDC nota-se a presença de um pico achatado. Este fenómeno pode dever-se à dispersão causada pela coluna ou pela diversidade dos polímeros na amostra. Pode também ser provocado por factores externos tais como o volume de injeção e detecção, ou perturbações nas tubagens de ligação à coluna.

A importância relativa da HDC pode aumentar em sistemas onde há fracturas ou canais preferenciais com caudais de passagem mais elevados. Pode aumentar ainda em sistemas de meios porosos com partículas menores, como, por exemplo, no caso da areia fina.

Recentemente, para macromoléculas rígidas e semi-flexíveis foi mostrado que a HDC se converte na SC - *slalom chromatography*, que discutiremos a seguir.

3. CROMATOGRAFIA SLALOM

Hoje em dia são utilizados oligonucleótidos sintéticos em muitos processos biológicos moleculares. Algumas aplicações, como os ensaios de caracterização do genótipo, dependem fortemente da pureza dos oligonucleótidos. A metodologia de purificação dos oligonucleótidos continua a estar dependente de técnicas tradicionais de separação tais como a electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), ou a HPLC. No entanto, é possível utilizar outro processo [21].

A cromatografia *slalom* (SC) foi descoberta independentemente em 1988 por dois grupos como um novo método de fracçãoamento do tamanho de moléculas relativamente grandes de ADN (> 5000 pares de bases). Uma característica particular desta cromatografia é que a separação ocorre por um fenómeno hidrodinâmico em vez de se verificar um equilíbrio de partição entre as fases sólida e líquida. Quer isto dizer que na SC, as grandes moléculas de ADN são eluídas muito depois das pequenas (exactamente ao contrário do que se passa na cromatografia de exclusão), e que o grau de retardamento de ADN é afectado, de modo significativo, por vários factores hidrodinâmicos, tais como o tamanho das partículas do empacotamento, o caudal, a viscosidade e a temperatura do solvente. Por outro lado, factores químicos tais como a natureza e o tamanho dos poros do empacotamento, assim como a hidrofobicidade do solvente, não têm um efeito crítico [22].

A principal vantagem da SC é a rapidez e simplicidade do procedimento experimental. Pode ser executada pela introdução de soluções de ADN num sistema convencional de HPLC (por exemplo), onde uma separação de ADN rápida, sensível e reproduzível pode ser automatizada, não sendo necessária a extracção de ADN do gel [22]. A separação baseia-se no facto de que as moléculas longas de ADN (5000 a 50000 pares de bases) têm de adaptar o seu percurso ao atravessamento dos canais estreitos e tortuosos entre as partículas do empacotamento, (Figura 2).

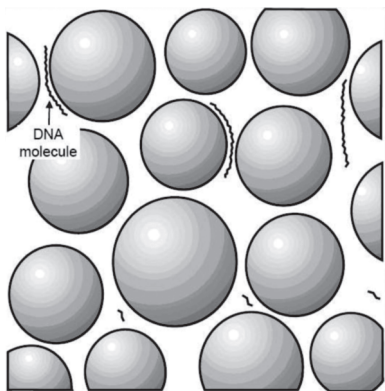


Figura 2 Princípio da cromatografia *slalom* [23].

Quanto mais longa é a molécula de ADN mais lenta e difícil é a sua passagem pelos interstícios [23].

Para modelar o movimento de uma molécula de ADN no interior de uma coluna SC André e Guillaume [21] definiram o parâmetro, τ , denominado tempo de retenção relativo. Esse parâmetro é dado pela equação:

$$\tau = \Psi (e^{Eu} + Eu - 1) + \tau' \quad (3)$$

onde Ψ é uma constante empírica que depende de algumas características geométricas do fragmento de ADN. τ' é o valor de τ para o valor de velocidade mais baixo da fase móvel (para este valor a fracção de estiramento do fragmento de ADN $\rightarrow 0$). Neste caso, u é a velocidade da fase móvel e E é uma constante dependente do número de poros ocupados por moléculas de ADN:

André e Guillaume [21], confirmaram que, para um valor elevado de caudal volumétrico, F , ou u , a estrutura da proteína começa a perder a sua rigidez e migra através do empacotamento seguindo um percurso mais ou menos sinuoso e adoptando uma forma alongada (distinta de uma partícula esférica) tendo os autores referidos baptizado este comportamento de modo cromatográfico de *slalom*. Nesta gama de caudais, para um valor constante de F , o valor de E aumenta com o aumento da viscosidade da fase móvel. Isto confirma que a viscosidade actua na estrutura da proteína através de um aumento da sua extensão quando a viscosidade da fase móvel aumenta. Há uma grande dependência do alongamento

da molécula com a velocidade da fase móvel para os valores mais elevados de viscosidade da fase móvel.

André e Guillaume [21], testaram também as possibilidades de fraccionamento da cromatografia *slalom*. Foram separadas moléculas de ADN de dois tipos: fragmentos lineares e plasmídeos, que são fragmentos circulares de ADN. Fez-se variar a composição da fase móvel, pela adição, em separado, de três agentes de compactação a várias concentrações. As moléculas a separar foram ainda sujeitas a diferentes velocidades da fase móvel. Nessas condições observou-se uma diferença no comportamento do ADN circular e linear que é, potencialmente, muito útil, por exemplo, pelo facto do ADN genómico linear ser uma contaminação quase inevitável na preparação de plasmídeos. Infere-se, então, que o movimento das moléculas de ADN na SC é extremamente dependente do alongamento das mesmas.

Peyrin et al. [24] consideraram a hipótese dos mecanismos de SC e HDC poderem ser relacionados e coexistirem, em simultâneo, no mesmo sistema cromatográfico, tendo em atenção as propriedades elásticas de polímeros flexíveis. Em geral, especularam que o princípio de fraccionamento da cromatografia hidrodinâmica fosse preponderante se o polímero estivesse na forma esférica, enquanto o fenómeno *slalom* governasse a separação quando ocorresse a deformação de macromoléculas por alongação da sua forma.

A teoria destes autores adquire mais sentido quando se sabe que a forma circular de uma molécula de ADN tem uma estrutura mais compacta do que o correspondente fragmento linear (por exemplo, o plasmídeo super - enrolado pGem 1 (3,73 kbp) tem um raio de giração r_g igual a 82 nm enquanto que o raio de giração da forma linear é de 145 nm). Por outro lado, uma cadeia dupla de ADN pode apresentar uma grande variedade de formas e de enrolamentos.

Para fragmentos entre 20 a 1000 pares de bases, a forma da molécula de ADN é aproximada à de um bacilo e conseqüentemente, o mecanismo HDC não pode ser aplicado. Por outro lado, fragmentos superiores a 2 kbp podem ser tratados como uma estrutura aleatória enrolada em esfera. Note-se, contudo, que as propriedades elásticas de moléculas de dupla cadeia de ADN são diferentes das dos polímeros sintéticos como os poliestirenos, classicamente separados por HDC. Assim, para demonstrarem a esperada transição SC \leftrightarrow HDC, os autores acima referidos testaram o comportamento cromatográfico de ácidos nucleicos que possuem uma forma aleatória com um certo grau de consolidação, como uma molécula "super - enrolada" circular de cadeia dupla de ADN.

Os resultados alcançados por Peyrin et al. [24] vieram confirmar a hipótese formulada, de que pode haver transição entre os regimes de migração HDC e SC. A preponderância relativa de um ou outro dos mecanismos é dependente tanto do caudal do eluente como da flexibilidade do polímero, ou seja, da forma assumida pela macromolécula em diferentes situações.

4. CONCLUSÃO

Uma melhor compreensão dos fenómenos que ocorrem na transferência de massa em meios porosos, pode permitir melhorar, em termos de eficiência e em termos económicos, importantes operações unitárias em vários processos industriais. As áreas abrangidas são tão diferentes como o processamento alimentar, a difusão de poluentes, a libertação de agro-químicos em solos, a catálise heterogénea, a quimioterapia e a genética.

A morfologia das células, que é quantificada pela sua largura, comprimento e esfericidade, afecta o seu transporte através de meios porosos [25]. Um grande número de factores físicos (tal como o tamanho dos constituintes do leito, o tamanho dos poros, a diversidade e a proporção de cada tipo de partículas), químicos (a superfície do meio poroso, a força iónica do poro com água), e biológicos (a morfologia e o tamanho da célula, a sua carga superficial, a hidrofobicidade da superfície celular) afectam fortemente, por exemplo, o transporte de bactérias em aquíferos. Permanece um mistério o isolamento e a presença

inequívoca de bactérias no subsolo a profundidades muito elevadas [26]. Mesmo que em formações geológicas tenham sido encontradas bactérias com forma distinta, que vão desde formas filamentosas a espirais, bacilos, elipsóides, ovóides e cocos, o tamanho das bactérias tem sido analisado num grande número de estudos, e não tem sido prestada a devida atenção ao efeito da morfologia celular no transporte de células através de meios porosos naturais [27].

É necessária mais investigação para clarificar aquilo que realmente acontece durante o movimento de micropartículas em meios porosos. A cromatografia hidrodinâmica e a cromatografia *slalom* estão ainda a dar os primeiros passos no mundo da separação e purificação de substâncias. Os resultados obtidos até hoje são animadores e sugerem que estes métodos poderão vir a ser aplicáveis na separação, com elevada resolução, de macromoléculas e nanopartículas.

Nos anos vindouros é provável que ambas as técnicas se tornem ainda mais

importantes assim que os operadores desta área se tornem mais familiarizados com estas técnicas e com a informação que delas pode ser obtida, passando assim a constituir uma alternativa atraente aos tradicionais métodos de fraccionamento cromatográfico.

AUTORES

Manuel Mota é Engenheiro Químico da FEUP desde 1972, tem o Mestrado em Microbiologia do INSA de Toulouse e doutorou-se no INSA em Eng. Bioquímica. Foi Prof. Auxiliar e Associado na FEUP, tendo-se transferido para a Universidade do Minho em 1991. É Prof. Catedrático da Universidade do Minho desde 1994. Tem cerca de 150 publicações científicas em revistas internacionais. Tem o Prémio Estímulo à Excelência da FCT.

José António Teixeira é Engenheiro Químico da FEUP desde 1980 e doutorou-se em Eng. Química pela FEUP em 1988. Foi Prof. Auxiliar e Associado na FEUP, tendo-se transferido para a Universidade do Minho em 93. É Prof. Catedrático da Universidade do Minho desde 2001. Tem cerca de 120 publicações científicas em revistas internacionais.

Alexander Yelshin Alexander Yelshin tirou o Mestrado em Eng. Química de Instituto Politécnico em Polotzk (URSS) em 1975 e doutorou-se em Instituto Tecnológico em Minsk (URSS) em Eng. Química. Foi Prof. na Universidade de Polotzk (Rep. Bielorrússia), tendo-se transferido para a Universidade do Minho em 1996 na qualidade de cientista-investigador (FCT). Tem cerca de 150 publicações científicas e 40 patentes na URSS e Bielorrússia.

Susana Cortez licenciou-se em Engenharia Biológica - ramo Controlo da Poluição, no ano de 2002, no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho. Desde então desempenha actividades de investigação no mesmo departamento. Em 2005 concluiu o Mestrado em Biotecnologia - Engenharia de Bioprocessos na área dos Meios Porosos e Separação de Macromoléculas. Em 2006 iniciou o doutoramento sobre o estudo da tratabilidade de lixiviados.

AGRADECIMENTOS

Este artigo foi efectuado no âmbito do projecto POCI/EQU/58337/2004, da Fundação para a Ciência e Tecnologia. Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e Tecnologia a bolsa concedida a Alexander Yelshin.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Mota, M., Teixeira, J.A., Keating, J.B., Yelshin, A. Changes in diffusion through the brain extra cellular space. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 39:2, 223-232, 2004.
- [2] Scholl, M. A., Harvey, R. W. "Laboratory investigations on the role of sediment surface and groundwater chemistry in transport of bacteria through a contaminated sandy aquifer", *Environmental Science Technology*, 26, 1410-1417, 1992.
- [3] Harvey, R. W., Kinner, N. E., MacDonald, D., Metge, D., Bunn, A. "Role of physical heterogeneity in the interpretation of small-scale laboratory and field observations of bacteria, microbial-sized microspheres, and bromide transport through aquifer sediments", *Water Resources Research*, 29, 8, 2713-2721, 1993.
- [4] Rehmann, L. C., Welty, C., Harvey, R. W. "Stochastic analysis of virus transport in aquifers", *Water Resources Research*, 35, 7, 987-2006, 1999.
- [5] Blanch, H. W., Clark, D. S. "Biochemical Engineering", M. Dekker, 1996
- [6] Sewell, P. A., Clarke, B., Kealey, D., "Chromatographic Separations", Wiley & Sons, 1987
- [7] Mikes, O., "High-Performance Liquid Chromatography of Biopolymers and Biopolymers - Part A: Principles, Materials and Techniques", Elsevier, 1988.
- [8] Belter, P. A., Cussler, E. L., Hu, W.S., "Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology", Wiley - InterScience, 1988.
- [9] Stegeman, G., Kraak, J. C., Poppe, H., "Dispersion in packed-column hydrodynamic chromatography", *Journal of Chromatography A*, 634: 2, 149-159, 1993.
- [10] Venema, E., Kraak, J. C., Poppe, H., Tijssen, R., "Packed-column hydrodynamic chromatography using 1- μ m nonporous silica particles", *Journal of Chromatography A*, 740: 2, 159-167, 1996.
- [11] Hoagland, D. A., Prud'homme, R. K. "Hydrodynamic chromatography as a probe of polymer dynamics during flow through porous media", *Macromolecules*, 22: 2, 775-781, 1989.
- [12] Williams, A., Varela, E., Meehan, E., Tribe, K. "Characterisation of nanoparticulate systems by hydrodynamic chromatography", *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 295-299, 2002.
- [13] Pascale, E., Maurice, R. "Application of capillary hydrodynamic chromatography to the classification of fibres and the separation of fibres from micrometer sized particles", *International Chemical Engineering*, 26: 2, 257-262, 1986.
- [14] Chauveteau, G. "Écoulement laminaire en milieu poreux de solutions de macromolécules de taille non négligeable devant les dimensions des pores", *C. R. Acad. Sc. Paris*, 288: 6, B107 - B110, 1979.
- [15] Hamaker, K. H., Ladisch, M. R. "Intraparticle flow and plate height effects in liquid chromatography stationary phases", *Separation and Purification Methods*, 25: 1, 47-83, 1996.
- [16] Gramain, Ph., Myard, Ph. "Elongational deformation by shear flow of flexible polymers adsorbed in porous media", *Macromolecules*, 14: 1, 180-184, 1981.
- [17] Blom, M. T., Chmela, E., Oostervink, R., Tijssen, R. "On-chip hydrodynamic chromatography separation and detection of nanoparticles and biomolecules", *Analytical Chemistry*, 75: 24, 6761-6768, 2003.
- [18] Blom, M. T., Chmela, E., Gardeniers, J. G. E., Tijssen, R. "Design and fabrication of a hydrodynamic chromatography chip", *Sensors and Actuators B*, 82, 111-116, 2002.
- [19] Mes, E. P. C., Kok, W. Th., Poppe, H.; Tijssen, R. "Comparison of methods for the determination of diffusion coefficients of polymers in dilute solutions: the influence of polydispersity", *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 37, 593-603, 1999.
- [20] Venema, E., Leeuw, R., Kraak, J. C., Poppe, H. "Polymer characterization using on-line coupling of thermal field flow fractionation and hydrodynamic chromatography", *Journal of Chromatography A*, 765, 135-144, 1997.
- [21] Guillaume, Y.C., André, C. "Novel strategy in slalom chromatography for studying both the protein reptation mechanism and the compacting agent effect to improve oligonucleotide separation", *Chromatographia*, 59: 7/8, 487 - 491, 2004.
- [22] Hirabayashi, J., Kasai, K. "Applied slalom chromatography, improved DNA separation by the use of columns developed for reversed - phase chromatography", *Journal of Chromatography*, 722, 135 - 142, 1996.
- [23] Huber, C. G. "Encyclopedia of Analytical Chemistry - Biopolymer chromatography", R. A. Meyers, Wiley & Sons, 2000.
- [24] Peyrin, E., Caron, C., Garrel, C., Ravel, A., Villet, A., Grosset, C., Favier, A. "DNA migration regimes in hydrodynamic chromatography and slalom chromatography: evidence for a transition", *Talanta*, 55, 291 - 296, 2001.
- [25] Mota, M., Teixeira, J.A., Yelshin, A., Cortez, S. Utilisation of controlled pore topology for the separation of bioparticles in a mixed-glass beads column. *Journal of Chromatography B* (in press) 2006.
- [26] Kerr, RA (2002) Deep life in the slow, slow lane. *Science* 296:1056.
- [27] Weiss, T.H., Mills, A.L., Hornberger, G.M., Herman, J.S., "Effect of Bacterial Cell Shape on transport of Bacteria in Porous Media", *Environmental Science Technology*, 29: 7, 1737 - 1740, 1995.