

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE COLUNA
CROMATOGRÁFICA POR AFINIDADE PARA PURIFICAÇÃO
Parcer DE PROTEÍNA**

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Eliana Setsuko Kamimura e aprovada pela Comissão Julgadora em 18.12.95.

ELIANA SETSUKO KAMIMURA
Engenheira Química

Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre em Engenharia de Alimentos.

CAMPINAS-SP
1995

C.M. 00024575-0

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	K128m
V.	Ex.
TRABO BD	26.887
PROG.	667/96
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/03/96
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

K15m	Kamimura, Eliana Setsuko Modelagem e simulação de coluna cromatográfica por afinidade para purificação de proteína / Eliana Setsuko Kamimura. -- Campinas, SP: [s.n.], 1995. Orientador: Francisco Maugeri Filho Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos. <i>Proteínas - Purificação.</i> 1. Métodos de simulação. 2. Cromatografia de afinidade. 3. <i>OK!</i> *Purificação de proteínas. 4. *Colunas cromatográficas. 5. *Modelagem. I. Maugeri Filho, Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.
------	---

***À* minha mãe pelo carinho e
incentivo.**

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Francisco Maugeri Filho pela orientação e apoio neste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora, pela atenção, correção e contribuição na realização deste trabalho.

Em especial à família do meu tio Toro Kamimura, pelo carinho e solidariedade.

À minha família, pelo grande incentivo e carinho em todos os momentos.

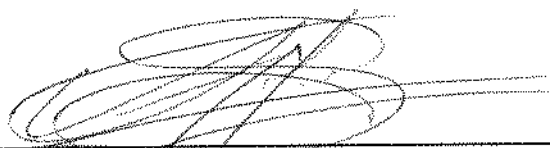
À todos os amigos que muito contribuíram na execução deste trabalho, em especial Marco Antonio, Maria de Jesus, Maria Ines, Marlei, Roger e Simone pela preciosa ajuda e companheirismo.

À Fifa pela amizade e apoio constante.

Ao Arnaldo e Nivaldo, do núcleo setorial de informática, pelo constante auxílio.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

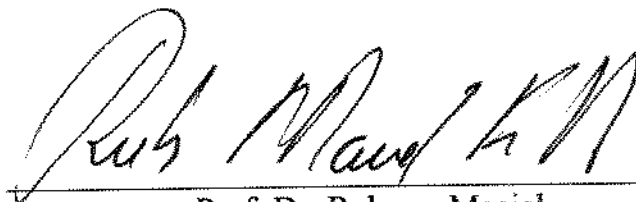
Banca Examinadora



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
ORIENTADOR
(FEA-DEA - UNICAMP)



Prof. Dr. Milton Mori
MEMBRO
(FEQ - UNICAMP)



Prof. Dr. Rubens Maciel
MEMBRO
(FEQ - UNICAMP)



Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
MEMBRO
(FEA - DEA - UNICAMP)

Campinas, 18 de dezembro de 1995.

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	vii
Nomenclatura	viii
Resumo.....	x
Summary.....	xi
I - Introdução.....	01
II - Revisão Bibliográfica	03
II.1 - Aspectos Gerais da Cromatografia.....	03
II.1.2 - Classificação dos Métodos Cromatográficos	04
II.1.3 - Cromatografia por afinidade.....	07
II.1.3.1 - Princípio do Método.....	08
II.1.3.2 - Seleção do Suporte ou Matriz	10
II.1.3.3 - A seleção do Ligante	13
II.1.3.4 - Preparação de Fases Estacionárias Seletivas.....	13
II.1.3.5 - Eluição.....	15
II.1.3.6 - Aplicações.....	16
II.2 - Teorias de Adsorção do Leito Empacotado e suas Aplicações na Cromatografia por Afinidade	17
II.2.1 - Introdução	17

II.2.2 - As Teorias da Cromatografia por Afinidade	20
II.2.3 - A Teoria da Taxa de Adsorção da Análise Degrau	23
II.2.3.1 - Taxa de Adsorção na Superfície como Etapa Limitante	23
II.2.3.2 - Difusão no Filme Líquido como Etapa Limitante	23
II.2.3.3 - Difusão Intrapartícula como Etapa Limitante.....	24
II.3 - Modelagem Matemática	27
II.3.1 - Fatores que Determinam o Formato das Curvas de Saída	29
III - Modelagem Matemática	31
III.1 - Modelo Cinético	31
III.2 - Modelo Matemático	33
IV - Resultados e Discussão.....	43
IV.1 Primeira Etapa : Ajuste do Modelo.....	44
IV.2 - Segunda Etapa: Análise Paramétrica	49
IV.2.1 - Cálculo da Eficiência da Coluna.....	54
IV.2.2 - Fator Sensibilidade dos Parâmetros.....	56
IV.2.3- Análise dos Resultados	57
IV.3 - Terceira Etapa: Predição da Ampliação de Escala da Coluna de Adsorção	61
IV.3.1 - Análise Paramétrica da Predição da Ampliação de Escala.....	63

IV3.1.1 - Cálculo da eficiência da Coluna e Cálculo do Fator Sensibilidade.....	64
IV.3.2 - Análise dos Resultados Obtidos.....	67
V- Conclusões	69
VI - Sugestões para Trabalhos Futuros	71
VII - Referências Bibliográficas.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - Esquema dos mecanismos de adsorção, partição, troca iônica, bioafinidade e exclusão.....	06
FIGURA 2.2 - Esquema do mecanismo do princípio da cromatografia por afinidade	09
FIGURA 2.3 - Princípio dos braços no processo de adsorção por bioafinidade.....	14
FIGURA 2.4 - Tipos de isotermas de adsorção.....	19
FIGURA 2.5 - A natureza física e a localização dos passos da transferência de massa de um soluto a partir de um fluido para uma partícula sólida	22
FIGURA 2.6 - A influência do formato da curva de "breakthrough" no desempenho de colunas de leitos fixos	30
FIGURA 3.1 - Esquema de uma coluna de cromatografia.....	33
FIGURA 4.1 - Comparação da curva de "breakthrough" simulada da coluna de adsorção de comprimento 14 mm e porosidade 0,4 com os dados experimentais.....	44
FIGURA 4.2 - Comparação da curva de "breakthrough" simulada da coluna de adsorção de comprimento 41 mm e porosidade 0,4 com os dados experimentais	45
FIGURA 4.3 - Comparação da curva de "breakthrough" simulada da coluna de adsorção de comprimento 66 mm e porosidade 0,4 com os dados experimentais	45
FIGURA 4.4 - Comparação da curva de "breakthrough" simulada da coluna de adsorção de comprimento 104 mm e porosidade 0,4 com os dados experimentais.....	46

FIGURA 4.5 - Comparação da curva de "breakthrough" simulada da coluna de adsorção de comprimento 161 mm e porosidade 0,4 com os dados experimentais.....	46
FIGURA 4.6 - Curvas de "breakthrough" das colunas de comprimentos 14, 41, 66, 104 e 161 mm e porosidade 0,5 comparadas com as curvas dos dados experimentais.....	48
FIGURA 4.7 - Comparação das curvas obtidas pelo modelo proposto, pelo método proposto por COWAN (1986) e dos dados experimentais para coluna de adsorção de comprimento 66 mm	48
FIGURA 4.8 - Comparação entre as curvas do modelo proposto, dados experimentais e do modelo com uma variação de 25 %, superior, na concentração inicial	50
FIGURA 4.9 - Comparação entre as curvas do modelo proposto, dados experimentais e do modelo com uma variação de 25 %, superior, no comprimento da coluna	50
FIGURA 4.10 - Comparação entre as curvas do modelo proposto, dados experimentais e do modelo com uma variação de 25 %, superior, na porosidade da coluna	51
FIGURA 4.11 - Comparação entre as curvas do modelo proposto, dados experimentais e do modelo com uma variação de 25 %, superior, na constante cinética k_1 da coluna	51
FIGURA 4.12 - Comparação entre as curvas do modelo proposto, dados experimentais e do modelo com uma variação de 25 %, superior, na constante cinética k_2 da coluna	52
FIGURA 4.13 - Comparação entre as curvas do modelo proposto, dados experimentais e do modelo com uma variação de 25 %, superior, na quantidade máxima de enzima a ser adsorvida pela coluna.....	52

FIGURA 4.14 - Comparação entre as curvas do modelo proposto, dados experimentais e do modelo com uma variação de 25 %, superior, na velocidade superficial da coluna	53
FIGURA 4.15 - Comparação entre as curvas do modelo proposto, dados experimentais e do modelo com uma variação de 25 %, superior, no diâmetro da coluna e a vazão volumétrica de $4,97 \times 10^{-5} \text{ m}^3/\text{h}$	53
FIGURA 4.16 - Predição das curvas de "breakthrough" através das simulações para os três diferentes comprimentos de colunas	62
FIGURA 4.17 - Comparação da predição das curvas do modelo proposto e modelo com variação de 25%, superior, nos parâmetros C_0 e ϵ	65
FIGURA 4.18 - Comparação da predição das curvas do modelo proposto e modelo com variação de 25%, superior, nos parâmetros k_1 e k_2	65
FIGURA 4.19 - Comparação da predição das curvas do modelo proposto e modelo com variação de 25 %, superior, nos parâmetros velocidade e comprimento.....	66
FIGURA 4.20 - Comparação da predição das curvas do modelo proposto e modelo com variação de 25%, superior, nos parâmetros Q_m e diâmetro da coluna	66

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 2.1 - Resultados obtidos nas análises das duas proteínas em relação ao tamanho das partículas, segundo HORSTMANN et alii (1986).	26
TABELA 4.1 - Valores dos parâmetros utilizados nas simulações do modelo proposto.....	43
TABELA 4.2 - Valores dos parâmetros com uma alteração de 25 % , superior aos parâmetros de referência, utilizados para a análise paramétrica da coluna de adsorção	49
TABELA 4.3 - Valores da eficiência do modelo proposto com parâmetro alterado com o respectivo tempo de processo, o fator de sensibilidade e produtividade para cada parâmetro do processo, comparado com o modelo proposto para a coluna de comprimento 104 mm	60
TABELA 4.4 - Os valores dos parâmetros para uma escala de produção industrial segundo Pharmacia (b)	62
TABELA 4.5 - Valores da quantidade adsorvida, quando ocorre a saturação da coluna de adsorção, para os três diferentes comprimentos de colunas para a produção industrial com os respectivos tempo, diâmetro, eficiência e produtividade	63
TABELA 4.6 - Valores dos parâmetros utilizados, nas simulações do modelo proposto, para uma predição de ampliação de escala.	64
TABELA 4.7 - Valores da eficiência do modelo proposto com parâmetro alterado com o respectivo tempo de processo, o fator de sensibilidade e produtividade para cada parâmetro do processo comparado com o modelo proposto para a coluna de comprimento 75 cm	68

NOMENCLATURA

- A = Área da secção transversal da coluna, (m^2)
- C = Concentração de enzima em solução, ($\text{mol enzima} / m^3 \text{ solução}$)
- C_o = Concentração de enzima (a ser purificada) na alimentação, ($\text{mol de enzima} / m^3 \text{ solução}$)
- C_s = Concentração na superfície, ($\text{mol de enzima} / m^3 \text{ solução}$)
- D = Difusividade molecular da enzima em solução, (m^2/h)
- D_a = Número de Damköhler, adimensional
- D_e = Difusividade efetiva, (m^2/h)
- D_p = Difusividade da fase sólida (partícula), (m^2/h)
- d_p = Diâmetro da resina, (m)
- E = Coeficiente de dispersão axial, (m^2/h)
- j = Fluxo de massa por unidade área de partícula, (m^2/h)
- K = Coeficiente global de transferência de massa, (m/h)
- k₁ = Constante cinética de adsorção, ($m^3/\text{mol.h}$)
- k₂ = Constante cinética de dessorção, (1/h)
- L = Comprimento da coluna, (m)
- M = Peso molecular da enzima
- N_{Re} = Número de Reynolds, adimensional
- N_{Sc} = Número de Schmidt, adimensional
- N_{Sh} = Número de Sherwood, adimensional
- P = Produtividade do processo, (mol de enzima/h)
- Q = Concentração de enzima adsorvida na resina, ($\text{mol de enzima} / m^3 \text{ resina}$)
- Q_{ads} = Quantidade de enzima adsorvida na resina, (mol de enzima)

Q_m = Quantidade máxima de enzima que pode ser adsorvida na resina, (mol de enzima/m³ resina)

R = Raio da coluna tubular, (m)

R_p = Raio da partícula, (m)

R_s = Taxa de adsorção de enzima pela resina, (mol de enzima/m³ h)

S = Fator sensibilidade, (adimensional)

t = Tempo, (horas)

T = Temperatura, (K)

v = Velocidade superficial, (m/h)

V_z = Vazão volumétrica, (m³/hora)

x = Distância, (m)

Z = Distância, (m)

Termos gregos:

ε = Porosidade (volume líquido/volume total), (adimensional)

ρ = Densidade, (Kg/m³)

μ = Viscosidade, (Kg/m h)

ϕ = Eficiência da coluna

θ = Diâmetro da coluna, (m)

RESUMO

Neste trabalho foi proposto um modelo matemático para descrever o comportamento de coluna cromatográfica por afinidade. O processo foi modelado a partir dos balanços de massa de uma coluna de leito fixo e equações cinéticas de adsorção levando consideração também a resistência à transferência de massa externa e a dispersão axial. Obteve-se um sistema de equações diferenciais. A resolução numérica deste sistema foi obtida utilizando-se, simultaneamente, os métodos de Crank-Nicholson e Runge-Kutta de quarta ordem. A validade do modelo foi verificada a partir de dados experimentais obtidos da literatura, sendo que o parâmetro de ajuste do modelo proposto foi a porosidade do leito. Com o intuito de verificar as influências dos parâmetros cinéticos e condições de operação na eficiência de colunas de adsorção, foi realizado um estudo paramétrico. Em ambas escalas estudadas (de laboratório e de produção industrial), foi observado que a porosidade, velocidade superficial e diâmetro da coluna são os parâmetros de maior sensibilidade. No entanto, foi demonstrado que a operação de uma coluna de adsorção por afinidade apresenta considerável estabilidade, haja vista que nenhum parâmetro afeta significativamente a operação da coluna. Por outro lado, parâmetros como Q_m (capacidade máxima de adsorção), k_1 e k_2 (constantes cinéticas de adsorção) devem ser otimizados antecipadamente, através da escolha do adsorvente e condições de adsorção desejáveis. E ainda, com relação aos problemas de limitações do processo de adsorção dentro da coluna, foi observado que o processo é limitado pela taxa de reação, podendo ser negligenciados os problemas de transferência de massa. Para diferentes valores do coeficiente de dispersão, foi possível verificar que a coluna opera aproximadamente como um reator tubular ideal. As conclusões de que se pode desprezar tanto os problemas de transferência de massa como os de dispersão, podem simplificar significativamente a modelagem e simulação de colunas de adsorção por afinidade.

SUMMARY

In this work a mathematical model was proposed to describe the behavior of affinity chromatographic column. The process was modelled from mass balance and affinity adsorption kinetics equations in a fixed-bed column. By considering the external mass transfer resistance and axial dispersion a set of differential equations was obtained. A combination of the Crank-Nicholson and Runge-Kutta fourth order numerical methods was used in the simulation procedure. The model validity was verified using experimental data from the literature. The adjustment parameter was the void column. This same model was used to predict the behavior of large scale adsorption columns. A parametric study was performed in order to study the influence of both kinetics and operating conditions in the adsorption column efficiency. The more sensitive parameters were showed to be the porosity, superficial velocity and column diameter for both scales analysed. It was showed, however, that an affinity adsorption column operation is very stable since no parameters significantly affects the column operation. On the other hand, parameters like Q_m (the maximum adsorption parameter), k_1 (the forward kinetic constant) and k_2 (the backward kinetic constant) must be optimized previously by choosing the suitable adsorption conditions and adsorbent. Also, looking into the limitation problems of the adsorption process inside the column, it was showed that the process is rate reaction limited, so that mass transfer problems can be neglected. By changing the dispersion coefficient it was also showed that the column operate nearly of an ideal plug flow reactor. Both findings no mass transfer problems and no dispersion problems can simplify the modelling and simulation of affinity adsorption columns.

I - INTRODUÇÃO

Recentes avanços nas áreas de microbiologia, biologia molecular, imunologia, genética e engenharia bioquímica tem fornecido uma vasta gama de produtos bioquímicos que são ou poderão tornar-se de grande valor comercial. Proteínas e substâncias relacionadas são frequentemente o principal constituinte em muitos destes produtos, os quais podem ser utilizados como insumos industriais ou reagentes farmacêuticos e medicinais. Muitos destes componentes são produzidos em reatores bioquímicos, e frequentemente a solução no reator é uma mistura complexa, com a substância de interesse presente em concentrações pequenas.

A purificação de substâncias da mistura biológicas complexa tem sido feito, tradicionalmente, pela combinação de técnicas de separação de substâncias de acordo com suas diferenças nas propriedades físico-químicas. Com o avanço da ciência da purificação, progressos significativos tem sido feito no uso de técnicas por afinidade para a separação de proteínas em escala analítica e industrial.

Dentre os processos de purificação a cromatografia por afinidade é considerada uma técnica potente de separação de macromoléculas biológicas. A principal vantagem é o alto grau de purificação da espécie desejada, que pode ser obtida numa única etapa do processo global de purificação.

Existe um considerável interesse industrial na ampliação de escala de processos de adsorção e técnicas cromatográficas para recuperação, separação e purificação de componentes bioquímicos à partir de misturas biológicas complexas.

Para simplificar a técnica de ampliação de escala é de grande importância o desenvolvimento de um modelo matemático para descrever o processo cromatográfico, que por meio de simulações em computador possa prever o desempenho do processo, em diferentes escalas. Na prática, estas ampliações de escala, em escala industrial, são feitas no sentido do aumento do diâmetro da coluna, mantendo a altura inalterada, em razão, principalmente às limitações impostas pelas resinas.

Um dos objetivos da simulação de um processo químico ou bioquímico é apresentar uma compreensão do comportamento do sistema para uma determinada condição de operação e características de interações físico-químicas que podem ocorrer durante a operação. Particularmente no caso de um processo de cromatografia por afinidade a importância da simulação está no fato de se poder compreender melhor as características deste sistema para um dado produto sem que se utilize de ensaios experimentais dispendiosos e muitas vezes com alto custo, além de permitir que se altere variáveis de processo, podendo até mesmo induzir à uma otimização do caso. A escolha do método numérico também é muito importante no que se refere ao tempo de simulação e precisão dos resultados.

Neste trabalho, o objetivo principal foi o de desenvolver um aplicativo que contenha em sua estrutura os diversos parâmetros de transferência de massa e de cinética do processo, servindo como instrumento para avaliar diferentes casos de cromatografia por afinidade em colunas de leito fixo, assim como avaliar estudos de ampliação de escala do processo.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

A adoção da cromatografia por afinidade, como uma unidade de operação da engenharia bioquímica, para separação e purificação de componentes biológicos em escala industrial tem despertado o interesse de muitos pesquisadores. Entretanto, a elucidação do processo de cromatografia por afinidade e das teorias da adsorção para uma coluna empacotada são pré-requisitos essenciais para que estes sistemas possam ser comparados ou modelados.

Deste modo, a revisão bibliográfica foi dividida em três partes sendo a primeira parte sobre a cromatografia por afinidade, a segunda parte sobre as teorias de adsorção em leito empacotado e suas aplicações na cromatografia por afinidade e a terceira parte sobre a modelagem matemática.

II.1 - Aspectos Gerais da Cromatografia

Métodos cromatográficos tem ocupado uma posição única no campo de métodos de separações e tem sido uma técnica de separação analítica, investigatória e preparativa muito importante e indispensável em diversas áreas como química, biologia e engenharia.

O rápido crescimento do conhecimento dos métodos cromatográficos nas últimas décadas tem fornecido ferramentas novas e comparativamente simples para solucionar problemas de separação e purificação, que antes eram considerados estarem além das possibilidades de solução.

Os termos "cromatografia", "cromatograma" e "método cromatográfico" são atribuídos ao botânico russo MIKHAEL SEMENOVICH TSWETT, que, em 1906, utilizou estes termos em dois trabalhos descrevendo suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas e gema de ovo, onde utilizou colunas de vidro recheadas com vários sólidos, finamente divididos, e arrastou os componentes com éter de petróleo. O nome deriva-se das palavras gregas "chrom" (cor) e "graphe" (escrever), embora o processo não dependa da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados. Atualmente a maioria das separações cromatográficas são realizadas em misturas de substâncias incolores, incluindo gases.

A União Internacional de Química Pura e Aplicada definiu a cromatografia como: " Um método usado principalmente para a separação de componentes de uma amostra, na qual seus componentes estão distribuídos entre duas fases, uma estacionária e a outra móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido sustentado em um sólido ou em um gel. A fase estacionária pode ser empacotada em uma coluna, difundida em um leito ou distribuída como um filme, etc; nestas definições "leito cromatográfico" é usado como um termo geral para denotar uma das diferentes formas nas quais a fase estacionária pode ser usada. A fase móvel pode ser líquida ou gasosa." (BRAITHWHAITE, 1985 citado por SOUZA, E. S., 1993).

II.1.2 - Classificação dos métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos são classificados de acordo com a técnica empregada, ao mecanismo de separação envolvido e aos diferentes tipos de fases utilizados. Entretanto, considera-se que a classificação mais importante em cromatografia baseia-se no mecanismo de separação, que pode ser processos físicos, químicos ou mecânicos, segundo COLLINS & BRAGA (1990).

Os processos físicos são de sorção - adsorção ou absorção (partição) - e são baseados principalmente em atrações eletrostáticas ou dipolares (forças de van der Waals), incluindo a formação de pontes de hidrogênio.

Quando se trata de um sólido, como sílica ou alumina, como fase estacionária, a adsorção do soluto ocorre na interface entre o sólido e a fase móvel, devido a presença de grupos ativos nas suas superfícies (Figura 2.1-a). A dessorção do soluto implica na volta deste à fase móvel. Este mecanismo mais comumente encontrado em cromatografia em camada delgada, em cromatografia gás-sólido, cromatografia líquido-sólido e cromatografia supercrítica com fase estacionária sólida.

Quando a fase estacionária é um líquido, espalhado na superfície de um suporte sólido e inerte, ou nas paredes do tubo cromatográfico, o processo é intrafacial; ocorrendo por absorção, ou partição, que se baseia nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária (Figura 2.1-b). A volta dos componentes à fase móvel depende de sua volatilidade (fase móvel gasosa) ou de sua solubilidade

nesta fase (fase móvel líquida). A cromatografia em papel, cromatografia gás-líquido e a cromatografia líquido-líquido estão envolvidas neste mecanismo.

Para o processo químico de troca iônica, a fase estacionária é constituída de uma matriz onde são adicionados grupos funcionais ionizáveis. Assim são obtidos os trocadores aniônicos que têm sítios ativos carregados positivamente, retendo ânions, e os trocadores catiônicos, que têm sítios carregados negativamente que retêm cátions.

A fase móvel é, geralmente, uma solução iônica com propriedades tamponantes, escolhidas de forma a ser compatível com o tipo de trocador usado. Desta maneira, se a fase estacionária retém cátions, a fase móvel deve conter cátions capazes de substituí-los preferencialmente. A Figura (2.1-c) indica uma representação do mecanismo de cromatografia por troca iônica.

Outro processo químico encontrado em cromatografia utiliza grupos com especificidade biológica quimicamente ligado às matrizes. Estes grupos, que podem ser, por exemplo, antígenos, enzimas ou lecitinas, retiram da fase móvel somente os componentes complementares, os anticorpos, proteína ou açúcares, respectivamente, deixando passar todas as outras espécies da amostra, como nos mostra a Figura (2.1 - d). Na cromatografia por bioafinidade, que será detalhada posteriormente, a eluição dos componentes retidos pode ocorrer com mudança das propriedades da fase móvel, por exemplo, a sua acidez, que modifica as propriedades ou do grupo ligado ou do seu complementar, ou por métodos de deslocamento usando outro fortemente atraído.

A cromatografia por exclusão baseia-se em um processo puramente mecânico. A fase estacionária é uma matriz de composição inerte, com partículas de forma, tamanho e porosidades uniformes. As moléculas da amostra são separadas porque as menores são capazes de penetrar facilmente em todos os poros da fase estacionária, equilibrando-se com a fase móvel intrasticial e intersticial, enquanto as maiores são excluídas de todos, passando entre os grânulos acompanhando a fase móvel intersticial, isto é, a fase móvel que fica fora dos poros Figura (2.1-e). As moléculas com tamanho efetivo intermediário migram com velocidades variáveis entre estes dois extremos, sendo que possuem penetração seletiva nos poros, entrando em alguns, mas não em todos, e saindo da coluna em ordem relacionada com seu tamanho efetivo.

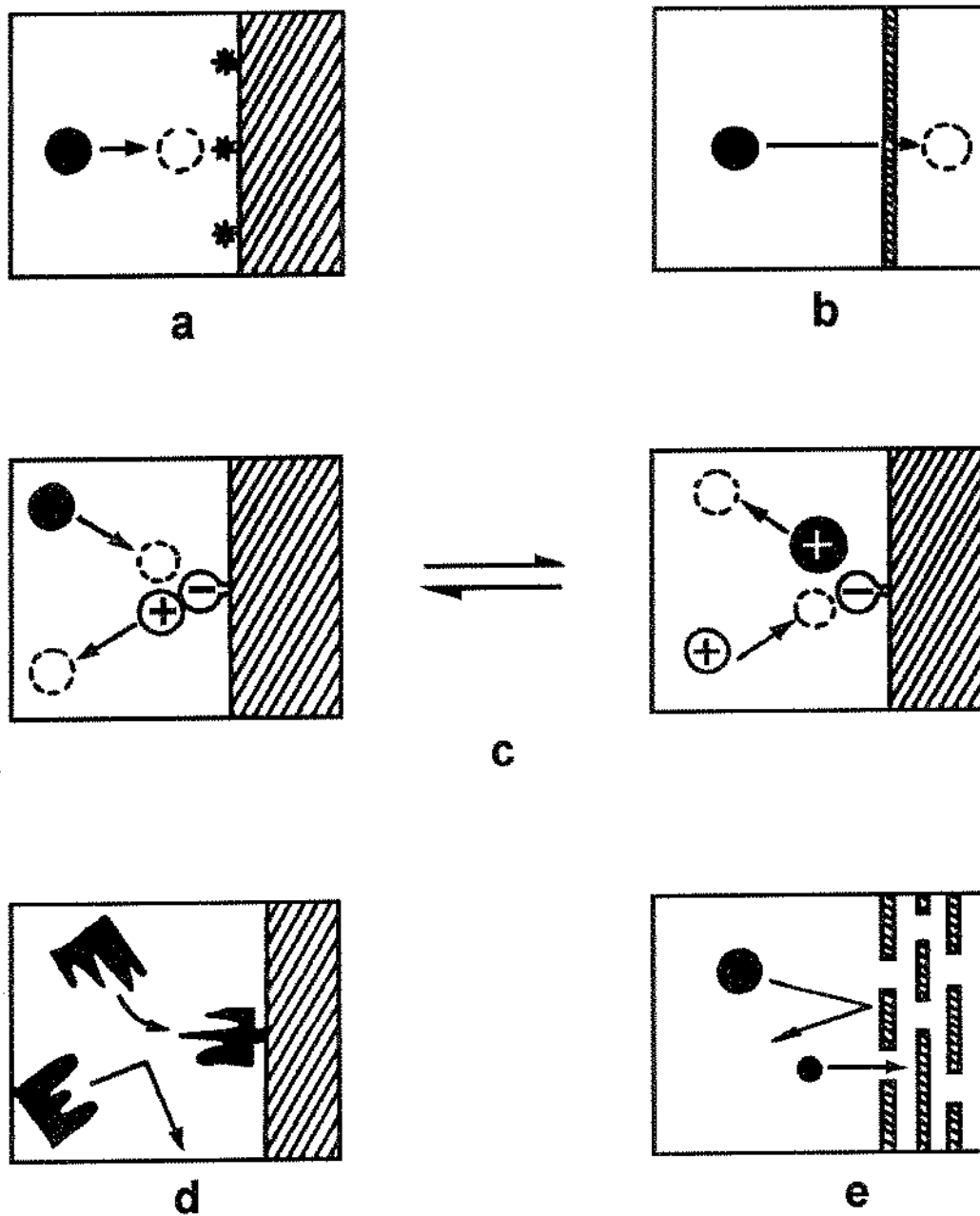


FIGURA 2.1: Esquema dos mecanismos de a: adsorção; b: partição; c: troca iônica; d: bioafinidade e e: exclusão. (COLLINS & BRAGA, 1990)

II.1.3 - Cromatografia por afinidade

A cromatografia por bioafinidade distingue-se dos outros métodos cromatográficos por basear-se, principalmente, nas propriedades biológicas ou funcionais das espécies que interagem: a substância a ser separada e a fase estacionária.

A afinidade cromatográfica é uma técnica de separação na qual a substância é adsorvida seletivamente da solução para o adsorvente insolúvel através de interações com seu grupo funcional ou a molécula é completamente imobilizada no adsorvente. Em princípio, esta técnica torna possível separar proteínas de misturas a partir de seus componentes estritamente na base do reconhecimento e do ligamento a estruturas específicas. A base para separação é marcadamente diferente dos métodos convencionais usados para a separação de proteínas, que recaem nas diferenças das propriedades físicas tais como peso molecular, solubilidade e ponto isoelétrico. Por exemplo, a ligação específica entre a enzima e seu substrato, inibidor e cofator, entre um antígeno e seu anticorpo, entre o hormônio e seu receptor são comumente utilizados na prática.

Afinidade cromatográfica foi primeiramente introduzida por CAMPBELL et alii em 1951, citado por YANG & TSAO (1982-b) como um método para separação de anticorpos.

Somente no início da década de 60 que este tipo de cromatografia teve um grande avanço, através de trabalhos de CUATRECASSA, WILCHECK, ANFENSEN e PORATH (citado por COLLINS & BRAGA, 1990), passando a ser amplamente empregada como método de purificação de macromoléculas.

A versatilidade deste método permite seu uso para uma variedade de aplicações tais como purificação de substância biológica, análises de componentes bioquímicos e biomédicinais e elucidação de mecanismo de sistema de interação bioquímica.

II. 1.3.1 - Princípio do método:

O princípio da cromatografia por bioafinidade é o isolamento seletivo de macromoléculas biológicas, através da utilização das propriedades dessas substâncias de unirem-se reversivelmente a ligantes específicos.

O processo de adsorção bioespecífica é caracterizado pela imobilização de um composto químico ou bioquímico selecionado (ligante) na superfície interna de um poro, inerte, presente no suporte sólido (matriz). O ligante tem uma alta especificidade por um composto particular ou uma classe de componentes que são purificados de uma mistura envolvendo várias espécies (ARVES & LIAPIS, 1987). Segundo LIAPIS (1989) nas separações utilizando cromatografia por afinidade são considerados o envolvimento de quatro estágios:

(1) O estágio da adsorção durante o qual a solução contendo o material a ser adsorvido é colocado em contato com o adsorvente para permitir que as interações de adsorção ocorram;

(2) O estágio de lavagem no qual componentes adsorvidos livremente ou não especificamente são removidos:

(3) O estágio de eluição durante o qual a substância adsorvida é liberada do complexo adsorvido-ligante; e

(4) O re-equilíbrio ou estágio de regeneração, no qual prepara-se o adsorvente para a reutilização em outro ciclo de operação.

No estágio de adsorção a mistura bruta contendo a substância de interesse entra em contato com o adsorvente e a proteína desejada se liga reversivelmente ao ligante imobilizado. O material biológico bruto que é utilizado na solução de alimentação do estágio de adsorção na maioria dos casos contém outros componentes não desejados, chamados contaminantes, os quais estão frequentemente presentes em quantidades maiores que as substâncias desejadas. Durante o estágio de adsorção alguns ou todos os contaminantes podem difundir dentro dos poros das partículas, e dependendo do tipo de matriz e ligante, pode ser adsorvido bioespecificamente pelos ligantes ou não especificamente na superfície da matriz (CHASE, 1984a). No estágio de lavagem, a concentração dos contaminantes presentes dentro das partículas porosas do adsorvente são reduzidas para um baixo nível. Em seguida o adsorvido é recuperado através da dissociação do complexo adsorvido-ligante (estágio de eluição), e finalmente o adsorvente é regenerado pelo contato com a solução tampão inicial (estágio de regeneração) (ARVES & LIAPIS, 1987).

A Figura 2.2 mostra o esquema que ilustra o princípio deste método cromatográfico, de acordo com COLLINS & BRAGA, 1990. Na etapa 1 as formas geométricas representam os vários tipos de substância presentes na amostra. Na etapa 2 somente a substância representada pelo triângulo possui afinidade química pelo ligante, o qual se encontra imobilizado covalentemente à matriz.

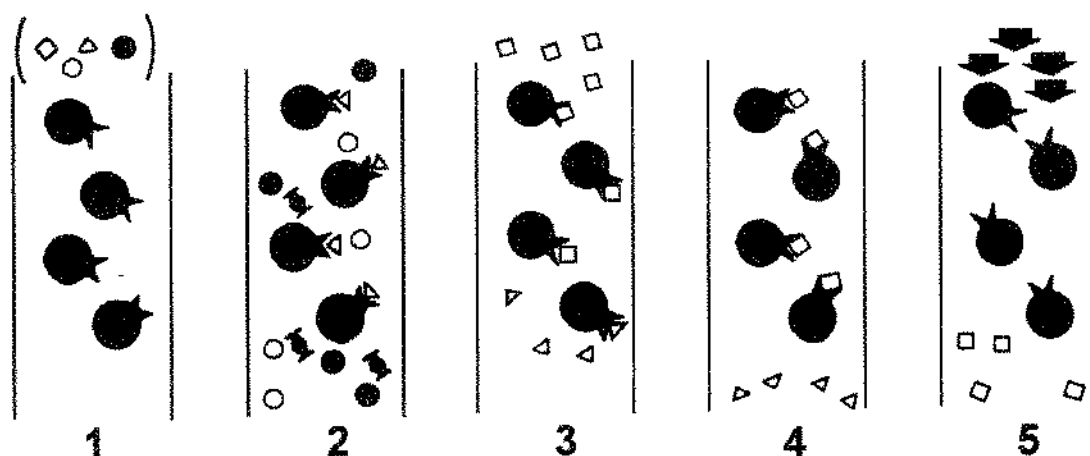


FIGURA 2.2: Esquema do mecanismo do princípio da cromatografia por bioafinidade.

A coluna é equilibrada e eluída em um determinado tampão inicial, sendo que nesta condição são praticamente eliminadas todas as substâncias que não foram ligadas por bioafinidade ao conjunto ligante-matriz, além daquelas que apresentam afinidade, mas que excedem a capacidade de retenção da coluna.

Nas etapas 3 e 4 a eluição da substância do ligante é realizada por modificações de pH, força iônica, ou ainda pela adição de uma substância que tenha maior afinidade pelo ligante.

Na etapa 5 ocorre a regeneração da coluna que é efetuada através da passagem de eluente, que a deixam na condição inicial.

II.1.3.2 - Seleção do suporte ou matriz

O suporte de matriz sólida para afinidades cromatográficas devem possuir as seguintes propriedades, segundo YANG & TSAO,(1982-a):

1 - Não deve interagir com proteínas (ou adsorbatos) em geral, deve ser hidrofílicos e não ter grupos de trocas intrínsecos, no sentido de prevenir adsorção não específica de proteínas;

2 - Deve ter boas propriedades mecânicas, que devem ser mantidas após o tratamento químico para minimizar resistência ao fluxo e assegurar o mesmo fluxo padrão;

3 - Deve ter boa porosidade com poros grandes o suficiente para permitir uma fácil transferência de macromoléculas dentro das partículas;

4 - Deve ter um número suficiente de grupos ativos que são essenciais para ocorrência e modificação química requeridos na ligação covalente cruzadas.

5 - Deve ser mecanicamente e quimicamente estável para o tratamento químico de modificação e variação das condições de operação.

Muitas substâncias possuem essas propriedades que permitem empregá-las como suporte insolúvel ou matrizes na cromatografia por bioafinidade; entre elas destacam-se a celulose, agarose, dextrana, poliacrilamida e outros polímeros, partículas porosas de alumina, sílica de porosidade controlada e algumas associações entre as substâncias citadas. A seguir a descrição de algumas matrizes:

Matriz de celulose

A matriz de celulose tem sido usada frequentemente por imunologistas no preparo de adsorventes para afinidade. Enzimologistas têm usado a celulose com menos frequência principalmente por causa de sua estrutura física instável (perda de porosidade) e forma geométrica irregular. No entanto, por tratamento químico conveniente estas limitações são contornadas por obtenção de esferas mais regulares e porosas, sem contudo comprometer a sua rigidez mecânica.

Matriz de dextrana

A dextrana é um polímero de unidades de glicose unidas por ligações α -1-6, produzido por bactérias a partir do dissacarídeo sacarose. É empregada como matriz por bioafinidade, após tratamento com epícloróxido para formações de ligações cruzadas entre as cadeias polissacarídicas.

A matriz de dextrana apresenta como característica principal um elevado número de hidroxilas disponíveis, que a tornam mais hidrofílica que a agarose, mas possui como limitação a formação de ligações cruzadas indesejáveis durante a sua ativação, tornando o gel menos poroso, dificultando a vazão da fase móvel na coluna.

Matriz de agarose

A agarose é um gel de rigidez considerável e inércia biológica relativa, sendo muito empregada como matriz por bioafinidade.

A retenção inespecífica de proteínas na agarose está relacionada à presença de grupos iônicos como éster sulfatos, metoxil e grupos carboxílicos. A eliminação ou diminuição dos efeitos indesejáveis desses grupos procede por tratamento do gel com borihidreto, em solução alcalina, por duas horas.

Um outro aspecto importante a ser considerado relaciona-se à estrutura secundária da agarose, a qual consiste de uma cadeia linear de polissacarídeos, sem ligações covalentes cruzadas, que implica em instabilidade térmica; dificuldade de congelamento ou secagem, pronta solubilidade na presença de agentes desnaturantes e mudanças drásticas e irreversíveis da estrutura do gel na presença de alguns solventes orgânicos, como o álcool e acetona. Portanto o uso da agarose como suporte insolúvel ou matriz, na cromatografia por bioafinidade, está relacionado ao aumento da estabilidade da estrutura secundária do gel, através da reação com epícloróxidrina, em meio alcalino. Tal reação leva à formação de ligações covalentes cruzadas entre cadeias de agarose, tornando a matriz mecanicamente rígida e mais estável a reagentes orgânicos ou inorgânicos.

Matriz de poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida são formados por uma estrutura de hidrocarbonetos, na qual estão ligados grupos amida. Esses géis apresentam as características principais de estabilidade com pH 1 a 10, de não conterem grupos ionizáveis, portanto com as interações não específicas mínimas, de serem biologicamente inertes e de não serem atacados por microrganismos.

A perda da estabilidade mecânica constitui uma desvantagem deste gel, a qual limita seu uso como suporte para cromatografia por bioafinidade.

II.1.3.3 - A seleção do ligante

Na cromatografia por afinidade ou por ligante-específico, o ligante é o agente que reconhece diretamente e se liga à molécula específica que vai ser purificada. É necessário selecionar um ligante apropriado, por exemplo para purificação de enzima, a escolha é geralmente um inibidor, substrato ou um substrato análogo; para purificação de antígeno, o anticorpo deve servir como um ligante apropriado.

A seleção do ligante para a cromatografia possui dois fatores. Primeiramente, o ligante deve ter ligação por afinidade específica e reversível com a substância a ser purificada; e o segundo fator é que o ligante deve ter grupos modificados que permitem serem acoplados pela matriz sem perder sua atividade de ligamento.

II.1.3.4 - Preparação de fases estacionárias seletivas

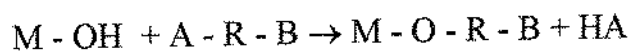
A preparação de fases estacionárias seletivas envolve duas etapas:

1- A ativação da matriz,

2 - E o subsequente acoplamento do ligante.

A fase de ativação compreende a ligação de grupos reativos à matriz inerte, podendo ser esquematizada da seguinte forma: os grupos hidroxílicos ou aminas livres da matriz são ativados por reação com reagentes bifuncionais do tipo A-R-B, onde o lado do grupo A se liga à matriz e o grupo B ao ligante. A fase de acoplamento envolve a ligação covalente do ligante à matriz ativada. De acordo com COLLINS & BRAGA, 1990:

a - Fase de ativação da matriz



b - Fase de acoplamento



O sucesso da purificação de macromoléculas por cromatografia por afinidade muitas vezes está relacionado com a distância existente entre a superfície do suporte e o ligante específico, no qual as macromoléculas ligar-se-ão. Fatores estéricos devem ser considerados, quando proteínas de massa molecular elevada são separadas por esse processo e ligantes específicos pequenos são acoplados diretamente à matriz. Neste caso, o problema pode ser solucionado através da preparação ligantes específicos com uma cadeia de hidrocarboneto, a qual recebe o nome de braço ou espaçador; alternativamente, a extensão de hidrocarboneto pode ser primeiramente ligada ao suporte sólido, e a seguir, liga-se covalentemente o ligante específico a esse braço. A Figura 2.3 mostra o efeito do aumento do braço entre o ligante e o suporte sólido, segundo PHARMACIA (a).

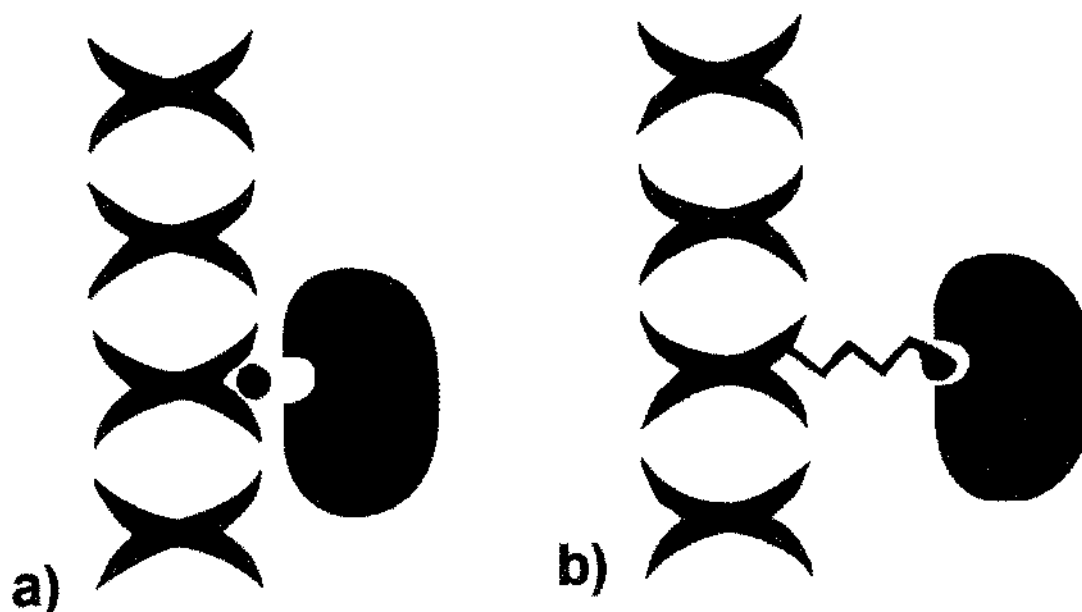


FIGURA 2.3: O princípio dos braços no processo de adsorção por bioafinidade, a: ligante ligado diretamente à matriz, b: ligante ligado à matriz por meio do braço.

II.1.3.5 - Eluição

A eluição do material ligado à fase estacionária seletiva em cromatografia por afinidade é realizada pelo emprego de agentes específicos ou não. Esta etapa é de fundamental importância para que ocorra uma boa separação da substância desejada. Eluição requer a completa dissociação do complexo adsorbato-adsorvente e idealmente o adsorbato deveria ser eluído em altas concentrações num volume pequeno de solução.

Os dois métodos de eluição que tem sido utilizados são o seletivo e o não seletivo, onde:

- seletivo quando se utiliza as propriedades naturais das interações bioespecíficas das macromoléculas biológicas.

- não seletivo quando se utiliza de mudança de pH, proteínas desnaturantes, efeitos de temperatura entre outros.

O método utilizado normalmente é o de eluição não seletivo. Esse método altera, através do uso de um eluente apropriado, as propriedades físicas do adsorvente de forma que a intensidade da ligação entre ligante e substância adsorvida é reduzida e a dissociação do complexo adsorvido-ligante é promovida. O segundo método de eluição seletiva envolve exposição do complexo adsorvido-ligante em uma solução contendo alta concentração de ligante livre. Este eluente seletivo (ligante) tem uma afinidade significativa pela substância adsorvida e pode ser o mesmo ligante que está fixo na superfície interna dos poros presentes na matriz ou pode ser diferente do ligante imobilizado. Há uma competição entre os ligantes solúveis e os imobilizados, e se o ligante solúvel está em excesso, o adsorvido deslocará quase que exclusivamente para a fase solúvel, sendo então separado das partículas de adsorvente. A substância de interesse é separada do ligante solúvel explorando a diferença no peso molecular das duas espécies.

Embora o passo de eluição seja de grande importância, poucos trabalhos tem considerado a análise quantitativa teórica do estágio de eluição. ARVES & LIAPIS (1987) descreveram um modelo matemático envolvendo o comportamento do estágio de eluição da adsorção bioespecífica num reator de mistura, onde são considerados os dois métodos de eluição.

II.1.3.6 - Aplicações

Adsorção bioespecífica tem sido amplamente reconhecida como método eficiente para a análise quantitativa e identificação de macromoléculas biológicas bem como para separação e purificação em escala industrial de biopolímeros naturais como plasma sanguíneo e matéria-prima de reatores de bioquímicos (ARVES & LIAPIS, 1988). Na purificação de macromoléculas sabe-se que um grande número de proteínas foram purificadas, e as enzimas sem dúvida alguma são a maior categoria dessas macromoléculas, podendo ainda ser citado: purificação de anticorpos, antígenos e glicoproteínas.

II.2 - Teorias de Adsorção do leito empacotado e suas aplicações na cromatografia por afinidade

II.2.1 - Introdução

A técnica de cromatografia por afinidade em leito empacotado recai em duas categorias principais, segundo CHASE (1984-b), o método do pulso e o método degrau.

Método Pulso

Consiste na aplicação de uma pequena amostra a ser analisada na coluna e subsequentemente um eluente que não possui afinidade pelo adsorvente é introduzido na coluna. O processo é frequentemente referido como desenvolvimento da eluição. A técnica é normalmente utilizada para procedimentos analíticos, com vistas a medir a quantidade de adsorbatos presente na amostra.

A operação do método do pulso pode ser usada para separar misturas de compostos que possuem diferentes afinidades em relação a fase imobilizada, isto se as condições de operações resultam em separações cromatográficas dos componentes ao longo do comprimento da coluna. Entretanto, como somente pequenas amostras de material são aplicadas em cada ciclo de operação este método não é ideal para aplicações macropreparativas onde a capacidade máxima da coluna para purificação é necessária.

Método Degrau

Neste método de operação da coluna empacotada, a amostra é alimentada continuamente na coluna até que a capacidade máxima da coluna seja esgotada e o adsorbato começa a aparecer na saída da coluna. A concentração de adsorbato na saída da coluna varia em função do tempo e é conhecida como curva de "breakthrough", e a medida destas curvas nestes sistemas é referida como uma análise degrau.

Este método de operação é particularmente apropriado para separações por afinidade macropreparativas, onde o adsorvente tem afinidade específica somente por uma espécie de molécula da alimentação.

A revisão de YANG & TSAO (1982-b) tem mostrado que a suposição de isoterma linear de adsorção ou cinética adsorção/dessorção linear, as quais tem sido usadas frequentemente para obter soluções analíticas que descrevem o desempenho da cromatografia convencional líquida ou gasosa, não são aplicáveis para cromatografia por afinidade, principalmente quando são operadas sob condições de análise degrau.

Na literatura de cromatografia, especialmente, as referências que descrevem análise degrau ou processo de adsorção em leito fixo, os dois termos são comumente usados para representar a forma básica do equilíbrio. Eles são equilíbrio desfavorável para os quais as isotermas são convexas e o equilíbrio é favorável quando as isotermas são côncavas. Um caso intermediário é de isoterma linear. A Figura 2.4 mostra os tipos de isotermas. As isotermas de adsorção são a de Freundlich e Langmuir.

- Isoterma de Freundlich

A equação de Freundlich que descreve a curva matematicamente por:

$$Q = K_F C^n \quad (2.1)$$

onde:

Q - concentração da fase sólida do material adsorvido

K_F - constante de equilíbrio de Freundlich

C - concentração

n - expoente, se 1 igual a linear, > 1 convexa, < 1 côncava

K_F e n são parâmetros empíricos.

A isoterma de adsorção de Freundlich, entretanto, é limitada para soluções altamente diluídas e moléculas simples.

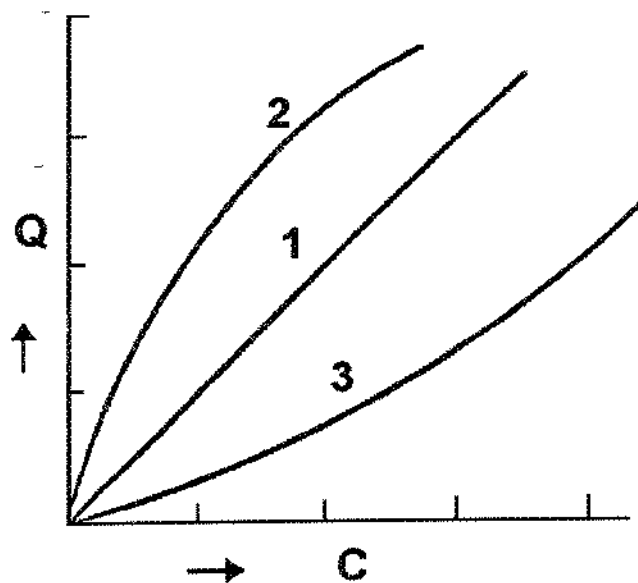


FIGURA 2.4: Tipos de isoterma de adsorção para equação de Freundlich, sendo 1: $n=1$, 2: $n < 1$ e 3: $n > 1$.

- Isoterma de Langmuir

A equação de adsorção, como uma monocamada, é descrita por Langmuir como:

$$Q = Q_m \frac{C}{C + K_L} \quad (2.2)$$

C - concentração de adsorbato

Q - concentração da fase sólida do material adsorvido

Q_m - quantidade máxima de enzima que pode ser adsorvida na resina

K_L - constante de equilíbrio de Langmuir

K_L e Q_m são frequentemente parâmetros ajustados em programas computacionais.

A equação de Langmuir é mais apropriada para moléculas complexas.

II.2.2 - As teorias da cromatografia por afinidade

As principais teorias de cromatografia podem ser dividida em duas categorias. Na literatura as duas teorias podem ser aplicadas na análise da cromatografia por afinidade e são a teoria dos pratos e a teoria das taxas.

- A teoria dos pratos:

A teoria dos pratos foi primeiramente introduzida por Martin and Synge (citado em YANG & TSAO, 1982-b) como um modelo de equilíbrio de pratos. Este modelo define a coluna como uma sucessão de pratos de equilíbrio bem-misturado.

O adsorvente (fase estacionária) é contido dentro de cada prato e o líquido ou gás carregador (fase móvel) passa continuamente através dos pratos. Assumindo que o equilíbrio é sempre alcançado entre duas fases de cada prato, o processo pode ser tratado como uma série de "contactores" ideais de fluxo de mistura.

O número de pratos na coluna depende das propriedades do adsorbato e das variáveis de operação, que podem ser determinadas experimentalmente através da informação da resposta ao impulso da coluna.

A falha mais óbvia, desta teoria dos pratos, é a sua incapacidade de prever o número de pratos ou a altura efetiva do prato, e a falha para fornecer informações como uma mudança nas condições de operações afetará a coluna. Consequentemente, o número de pratos deve ser determinado experimentalmente antes de qualquer cálculo ser feito e as condições ótimas de operação são encontradas por tentativas e erros. É possível compensar estas falhas tirando proveito dos resultados dados pela teoria das taxas e outros modelos cromatográficos.

- A teoria das taxas:

A teoria das taxas de cromatografia é um conjunto de equações do balanço de massa e condições inicial e de contorno apropriadas. Na teoria das taxas, segundo YANG & TSAO (1982-b), a análise é baseada no fluxo contínuo do fluido através da coluna, taxas finitas de transferência de massa, isothermas de equilíbrio e cinética de adsorção.

A equação de continuidade da fase móvel pode ser formulada como:

$$E \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - v \frac{\partial C}{\partial x} - R = \frac{\partial C}{\partial t} \quad (2.3)$$

onde:

E - dispersão axial

v - velocidade linear

R - é a taxa de transferência de massa da interface

C - concentração de adsorbato

x e t - são coordenadas de espaço e tempo

Esta teoria tem sido, por longo período, estudada principalmente para adsorção em leito fixo e operações de troca iônica, as quais são duas formas de técnicas cromatográficas por análise degrau.

Diferenças nos modelos são devido, principalmente, às variações nas equações das taxas de transferência de massa ou para a expressão de R, ou seja, a taxa da reação química.

A taxa de transferência de massa na superfície pode ser formulada para as seguintes situações:

- 1 - a etapa limitante é a taxa de difusão do filme fluido;
- 2 - a etapa limitante é a taxa de reação de adsorção;
- 3 - a etapa limitante é a taxa de difusão no poro e/ ou partícula.

Os vários passos na transferência de massa estão descritos na Figura 2.5:

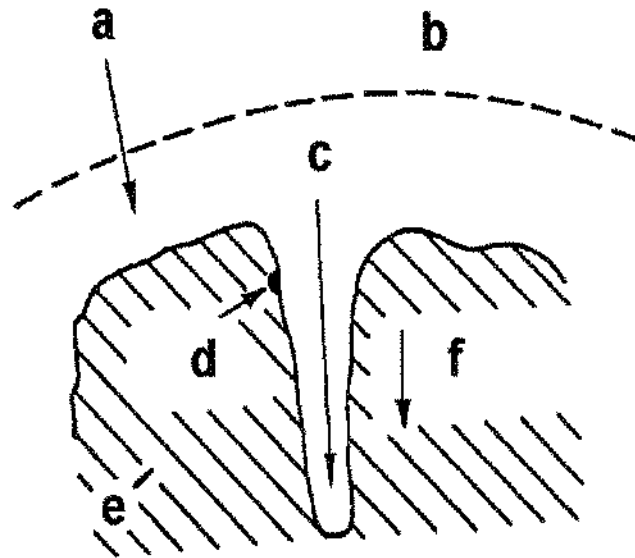


FIGURA 2.5: Natureza física e a localização dos passos na transferência de massa de um soluto a partir de um fluido para uma partícula sólida. Onde: a: resistência do filme; b: meio líquido; c: resistência à difusão no poro; d: resistência à reação na superfície; e: partícula (resina); e f: resistência à difusão intrapartícula (fase sólida).

A etapa determinante pode ser atribuída a uma ou a combinação destas resistências. Para uma análise degrau simples, todos os casos tem sido analiticamente solucionados com restrições e simplificações.

II.2.3 - A teoria da taxa de adsorção da análise degrau :

II.2.3.1 - Taxa de adsorção na superfície como etapa limitante

Neste caso, a reação na superfície é lenta comparada com a taxa de transferência de massa. Então a função da taxa assume a forma da equação da taxa cinética:

$$R = k_1 C (Q_m - Q) - k_2 Q \quad (2.4)$$

Onde:

C - concentração de adsorbato

k_1 - k_2 - são constantes de adsorção e dessorção;

Q - concentração da fase sólida do material adsorvido;

Q_m - capacidade máxima do adsorvente.

II.2.3.2 - Difusão no filme líquido como a etapa limitante

Estes casos pertencem a categoria de tipos de equações simplificadas ou empíricas, onde a equação da taxa é a etapa limitante de difusão no filme. Sob controle da difusão do filme a concentração dentro da partícula é constante

$$R = K a (C - C_i) \quad (2.5)$$

onde:

K - coeficiente de transferência de massa

a - área superficial/ porosidade do leito

C e C_i - são as concentrações no meio líquido e na superfície da partícula, respectivamente.

A difusão no filme pode tornar-se a etapa determinante da taxa global de reação somente em casos onde o tamanho da partícula é pequena ou a difusividade efetiva na zona intrapartícula é grande. Deve ser lembrado que o Número de Reynolds (N_{Re}) é função do diâmetro da partícula, portanto se a partícula for pequena o N_{Re} é pequeno.

II.2.3.3 - Difusão intrapartícula como etapa limitante

Na maioria dos casos práticos dos processos de dessorção, dificilmente a etapa da difusão no filme ou adsorção na superfície será a etapa limitante do processo.

Para construir a equação da taxa com limitação pela difusão existem dois tipos de aproximações que são: o modelo sólido homogêneo e o modelo partícula porosa.

- Modelo sólido homogêneo

O modelo sólido homogêneo trata a partícula como uma matriz homogênea independentemente de sua estrutura porosa. O processo de adsorção ocorre na superfície da fase sólida, acompanhada pela difusão do adsorbato dentro da partícula.

O equilíbrio do adsorbato é assumido ocorrer somente na superfície externa da partícula. Este tipo de aproximação tem sido usado, quase frequentemente nos processos de troca iônica onde, geralmente, um íon de carga oposta não é ligado num sítio específico mas é mantido pelo adsorvente por forças puramente eletrostáticas. Este modelo é perfeito para um gel homogêneo e não é para grânulos porosos, embora, se a difusão na fase sólida for rápida comparada com a do fluido no poro, esta aproximação é provavelmente aceitável também.

A taxa de transferência de massa pode ser expressa pela primeira lei de Fick:

$$R = -a \rho D_e \left. \frac{\partial Q}{\partial r} \right|_{r=R_p} \quad (2.6)$$

onde:

ρ - densidade da partícula

D_e - difusividade efetiva intrapartícula

R_p - raio da partícula

Este modelo tem sido muito usado para processos de troca iônica, entretanto sua aplicação parece ser irreal para a maioria dos casos de adsorção.

Para afinidade cromatográfica, o tamanho do poro da matriz sólida deve ser largo o suficiente para acomodar livremente as macromoléculas das proteínas, então parece ser dificilmente desejável descrever este sistema usando o modelo sólido homogêneo.

Modelo partícula porosa

O modelo da partícula porosa tem sido usado com mais frequência do que o modelo sólido homogêneo, que descreve com maior precisão a característica do material poroso de empacotamento. Para este modelo a equação do balanço material intrapartícula pode ser escrita como:

$$D_e \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) = \frac{\partial C}{\partial t} \quad (2.7)$$

onde:

C - concentração do fluido no poro

D_e - difusividade efetiva intrapartícula

r e t - são as coordenadas da posição e tempo.

Este modelo da partícula porosa é mais realístico e desejável para análises de cromatografia por afinidade.

Esta revisão baseada no artigo de YANG & TSAO (1982-b) mostra que através da modelagem matemática as taxas de adsorção podem tornar-se processos bem estabelecidos e podem fornecer a base para aplicá-la em diferentes problemas para purificação de macromoléculas biológicas.

HORSTMANN et alii (1986) estudaram a adsorção por afinidade de proteínas em gel Sepharose analisando a influência do tamanho das partículas, em uma estreita faixa de diferentes diâmetros médios de partículas e as duas proteínas analisadas foram a lisozima e BSA (albumina do soro bovino).

Como pode ser observado através da Tabela 2.1, para estas proteínas a quantidade máxima que a resina pode adsorver aumentou com o decréscimo do diâmetro médio das partículas. Para a lisozima, a porcentagem no aumento da capacidade máxima de adsorção é menor do que a porcentagem de aumento da área de contato. Para o BSA, entretanto o aumento na capacidade é mais de que quatro vezes maior que o aumento na área contato.

TABELA 2.1: Resultados obtidos nas análises das duas proteínas em relação ao tamanho das partículas:

proteína	Diâmetro (μm)	Q_m (mg/ml)	Aumento Q_m (%)	Aumento na Área Superficial Externa (%)
lisozima	49	15,1	--	--
	45	15,8	5	13
	38	16,6	10	30
BSA	49	5,4	--	--
	45	7,7	43	13
	38	12,0	122	30

As constantes de dessorção/adsorção descrevem que a interação por afinidade também se altera com o tamanho da partícula. Comprovando novamente que os efeitos são mais pronunciados para proteína maior, BSA, do que para lisozima.

II.3 - Modelagem Matemática

A modelagem matemática dos processos fermentativos e de purificação, baseada nos balanços fundamentais de massa e reações cinéticas tem sido alvo de interesse de muitos pesquisadores na última década. Pode-se praticamente afirmar que os experimentos baseados na tentativa e erro utilizando-se planta piloto ou escala de laboratório para melhorar o desempenho do processo já estão ultrapassados. Este fato se deve principalmente a algumas características singulares dos bioprocessos: matéria-prima muito cara, tempo longo de processamento, muitos parâmetros a serem estudados (pH, temperatura, composição do meio de fermentação), condições operacionais (batelada, batelada-alimentada, contínuo) e análises complexas e caras. Assim, estudos preliminares através de simulações em computador a partir dos modelos tem se tornado um método eficiente e econômico para otimização, aumento de escala e definição de estratégias de controle. Segundo BERNINGER et alii (1991), citado por RODRIGUES (1993), os modelos não substituem os experimentos práticos, podendo, no entanto, reduzir consideravelmente o número destes experimentos.

Os modelos matemáticos podem ser classificados em dois grupos: modelos determinísticos e estocásticos ou probabilísticos. Os modelos determinísticos são obtidos a partir dos balanços fundamentais de massa, momento e energia, enquanto que os probabilísticos através de dados experimentais e tratamento estatístico. No modelo determinístico, cada parâmetro está associado a variável do processo, enquanto que no modelo probabilístico as variáveis ou parâmetros usados para descrever a relação entrada/saída não são precisamente conhecidas (HIMMELBLAU & BISCHOFF, 1968).

A modelagem e simulação de processo de adsorção utilizando a técnica da cromatografia por afinidade tem sido estudada por vários pesquisadores nos diferentes problemas de purificação de proteínas. Alguns destes trabalhos são citados a seguir:

CHASE (1984-b) apresenta um modelo que descreve com êxito a cromatografia por afinidade e usa este modelo para desenvolver métodos para prever a performance de leito empacotado e tanques agitados para separação por afinidade. A performance experimental destes dois tipos diferentes de sistemas de separação por afinidade são comparadas com a performance da predição pelo modelo através dos parâmetros que

estão envolvidos no estágio de adsorção de β -galactosidase utilizando Cibacron-Blue e anticorpos monoclonal imobilizados.

COWAN et alii (1986) fizeram uma revisão sobre trabalhos anteriores à respeito da bioafinidade da lisozima em Blue Sepharose CL6-B. Eles utilizam-se dos dados experimentais de CHASE (1984-a) para comparar com os resultados do modelo numérico e solução analítica. Predições da performance da coluna de adsorção de leito empacotado apresentaram bons resultados auxiliando a ampliação da escala. A dispersão axial foi levada em consideração em algumas simulações, tendo sido desprezada em outras.

ARVES & LIAPIS (1987) identificaram que a transferência de massa através do filme líquido e os mecanismos difusionais são tão importantes quanto as etapas das taxas de adsorção e dissociação do complexo adsorbato-ligante nos diferentes estágios (adsorção, lavagem, eluição), no caso da cromatografia por afinidade em leito fixo.

A adsorção por afinidade de imunoglobulina G em adsorvente consistindo de proteína A imobilizada em matrizes de agarose foram estudadas por HORSTMANN & CHASE (1989). O estudo envolve a determinação das características do equilíbrio da adsorção através de medidas das taxas de adsorção em sistemas de tanques agitados e leitos empacotados. Os dados experimentais usados para se obter a validade do modelo teórico proposto descrevem a transferência de massa para o adsorvente. Neste caso a transferência de massa pôde ser descrita como uma combinação da resistência do filme na superfície e da resistência da difusão no poro.

LIAPIS et alii (1989) no sentido de compreender o equilíbrio e as características dinâmica da adsorção por bioafinidade da lisozima em anticorpos imobilizados em partículas de sílicas não porosas propôs um modelo matemático. Neste, o modelo de Langmuir é utilizado para representar os dados de equilíbrio, fornecendo resultados satisfatórios. As constantes de equilíbrio e calor da adsorção tem sido estimadas para dois sistemas com diferentes densidades do ligante. O efeito das interações não específicas são mais evidentes no sistema de baixa densidade do ligante. A dinâmica do leito fixo do modelo de adsorção representam bem a maioria dos dados experimentais da curva de saída e fornece uma boa concordância na fase inicial destas curvas. No entanto, não há um bom ajuste na fase final (perto da saturação). Supõe-se que nesta fase a adsorção é não específica e/ou os sítios de adsorção estão

esticamente impedidos. O modelo proposto não leva isto em consideração, e talvez daí ocorra o desvio predito pelo modelo e os dados experimentais.

II.3.1 - Fatores que determinam o formato das curvas de saída

Em sistemas de afinidade onde o método degrau de operação é adotado, a performance de adsorção mais eficiente é a obtida quando o formato da curva se aproximar da resposta de um pulso degrau em reator tubular ideal, ou seja, o mais vertical possível. A Figura 2.6 mostra os dois tipos de curvas de saída que seriam obtidas para uma mesma coluna empacotada, dependendo das condições de operação. É normal na preparação de coluna de cromatografia por afinidade terminar a alimentação da coluna quando o nível de adsorbato na saída da coluna atingir um certo nível. Se a alimentação continuar além deste ponto, quantidades consideráveis de adsorbato podem passar através da coluna sem ser adsorvido. A quantidade de adsorbato que pode ser alimentado em uma coluna antes deste nível ser atingido dependerá do formato da curva "breakthrough". Na prática, é pouco provável que a coluna será carregada até a sua capacidade máxima de adsorção. Está claro através da Figura 2.6 que as condições de adsorção que resultam em boa forma da curva "breakthrough" resultaria também em mais material sendo retido pela coluna.

O interesse, portanto, no estudo de fatores que influenciam a curva "breakthrough" visa melhorar a performance do estágio de adsorção do processo de purificação por afinidade da coluna (CHASE, 1984-a).

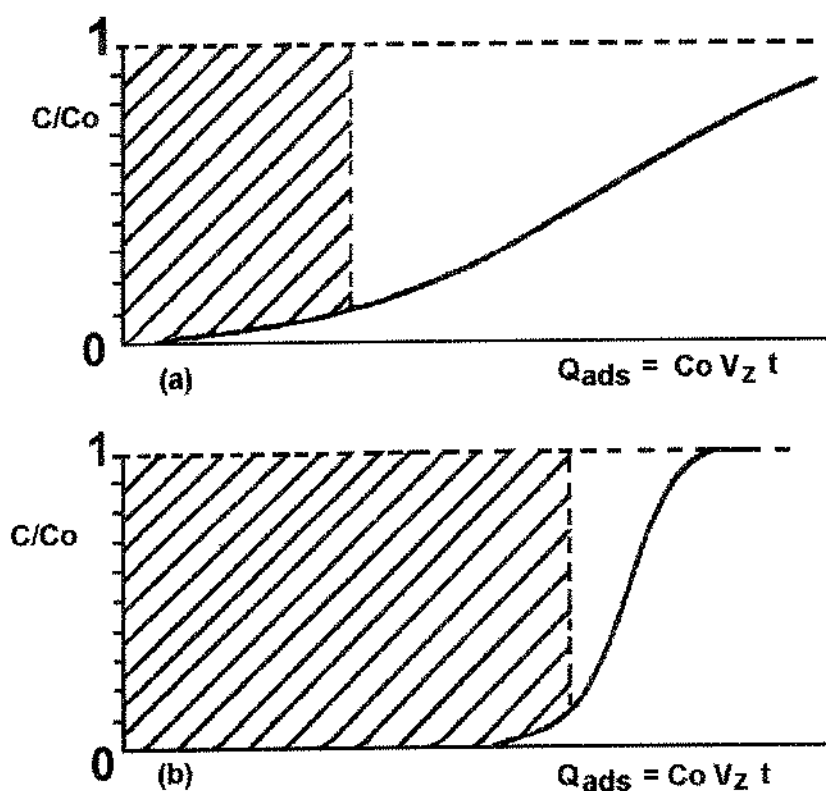


FIGURA 2.6: A influência do formato da curva de "breakthrough" no desempenho de colunas leito fixos; a área hachurada mostra a quantidade adsorbato ($Q_{ads} = C_o V_z t$) que seria adsorbido na coluna, se o carregamento terminasse quando C/C_o atinge o valor de 0,1. Onde: a: tipo de curva obtida em coluna empacotada e b: curva mais inclinada, na vertical, obtida na mesma coluna com alterações das condições de operação.

III - MODELAGEM MATEMÁTICA

III.1 - Modelo Cinético

A separação por afinidade explora as interações que podem ocorrer em sistemas biológicos quando duas diferentes moléculas podem interagir reversivelmente para formar uma ligação não covalente forte. Tais interações incluem aquelas que ocorrem entre uma enzima e seu substrato ou inibidor, anticorpo e seu antígeno, hormônio e seu receptor, e aquelas entre sequências complementares presente em ácidos nucleicos. Através da imobilização de um dos componentes envolvidos nas interações, um adsorvente com uma afinidade específica por um único componente pode ser gerado. Se a interação altamente específica é explorada um adsorvente com uma afinidade específica pode ser sintetizado.

Através de um modelo matemático de velocidade de reação, segundo a equação de Michaelis-Menten, baseado em um balanço de massa, é possível estudar a relação entre os componentes do processo de adsorção.

A equação abaixo representa este tipo de interação bioespecífica:



onde:

(B) representa os sítios imobilizados no adsorvente que possui uma afinidade específica por uma única espécie de adsorbato (A), k_1 e k_2 são as constantes da taxa que governam a reação de adsorção, e $K_d = (k_2 / k_1)$ a constante de dissociação que descreve o equilíbrio da reação de adsorção.

Exemplificando tem-se que A, B e AB são a lisozima a ser adsorvida, o adsorvente e o complexo lisozima-adsorvente respectivamente.

A proposta de expressão cinética para adsorção da lisozima em resina descrita pela Equação (3.1) é dada por:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = k_1 C(Q_m - Q) - k_2 Q \quad (3.2)$$

onde:

C é a concentração de lisozima em solução que pode ser adsorvida, Q é a concentração de lisozima na fase sólida de material adsorvido na resina por unidade de volume de adsorvente, Q_m é a capacidade máxima de adsorção do adsorvente, k_1 e k_2 são as constantes cinéticas do modelo.

Da mesma forma, em equilíbrio a interação é descrita por:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = k_1 C^*(Q_m - Q^*) - k_2 Q^* = 0 \quad (3.3)$$

onde o símbolo (*) representa o valor da variável no equilíbrio.

A partir da Equação (3.3) pode ser observado que no equilíbrio a concentração da fase sólida de material adsorvido (Q^*) varia com a concentração de material que pode ser adsorvido (C^*) da seguinte forma:

$$Q^* = \frac{Q_m C^*}{K_d + C^*} \quad (3.4)$$

A Equação (3.4) prediz que a isoterma de adsorção deve ser não linear e do tipo descrito por Langmuir, frequentemente referida como uma isoterma favorável.

As constantes cinéticas foram determinadas por CHASE (1984-a) através de experimentos em batelada.

III.2 - Modelo Matemático

Um processo isotérmico de adsorção de lisozima em Cibacron Blue Sepharose CL-6B em uma coluna tubular (Figura 3.1) foi descrito matematicamente em termos das equações diferenciais obtidas do balanço de massa e da cinética do processo. Utilizou-se o método numérico de Crank-Nicholson acoplado a uma rotina de Runge-Kutta de quarta ordem para resolver as equações. O objetivo é verificar se este modelo descreve bem os dados experimentais obtidos por CHASE (1984-a).

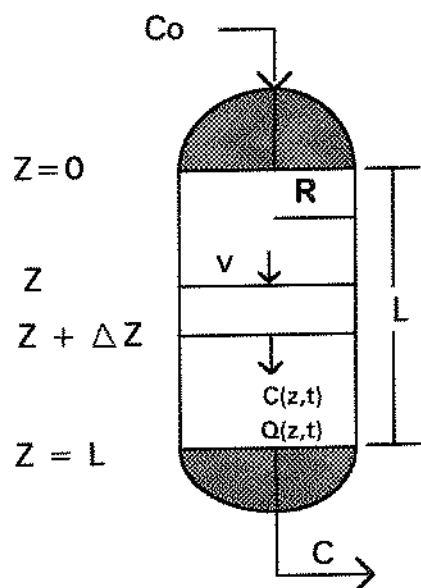


FIGURA 3.1: Esquema de uma coluna de cromatografia.

C_o - concentração de lisozima na alimentação	[mol lisozima/ m^3 sol.]
C - concentração de lisozima em solução	[mol lisozima/ m^3 sol.]
L - comprimento do leito da coluna	[m]
Q - concentração de lisozima adsorvida na resina	[mol/ m^3 resina]
R - raio da coluna tubular	[m]
v - velocidade de escoamento da solução de lisozima	[m/h]
Z - distância	[m]
t - tempo	[h]

Definiu-se um volume diferencial de controle (VDC) na coluna , de Z até ΔZ , e a seguinte nomenclatura adicional:

A - área da secção transversal da coluna $[m^2]$

E - coeficiente dispersão axial da enzima em solução $[m^2 / h]$

R_s - Taxa de adsorção de lisozima pela resina $[mol / m^3 \text{ leito } h]$

ε - Porosidade do leito de resina $[m^3 \text{ sol.} / m^3 \text{ leito}]$

Os termos de balanço de massa são:

Lisozima em solução que entra no (VDC) por convecção $v C A \varepsilon \Big|_Z$

Lisozima em solução que entra no (VDC) por difusão $-E \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right) A \varepsilon \Big|_Z$

Lisozima em solução que sai do (VDC) por convecção $v C A \varepsilon \Big|_{Z+\Delta Z}$

Lisozima em solução que sai do (VDC) por difusão $-E \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right) A \varepsilon \Big|_{Z+\Delta Z}$

Lisozima adsorvida na resina no (VDC) $R_s \pi R^2 \Delta Z (1 - \varepsilon)$

Acúmulo de lisozima em solução no (VDC) $\frac{\partial C}{\partial t} \pi R^2 \Delta Z (1 - \varepsilon)$

Portanto a equação de balanço de massa torna-se:

$$\left[vCA\varepsilon \Big|_Z + \left(-E \frac{\partial C}{\partial z} \right) A\varepsilon \Big|_Z \right] - \left[vCA\varepsilon \Big|_{Z+\Delta Z} + \left(-E \frac{\partial C}{\partial z} \right) A\varepsilon \Big|_{Z+\Delta Z} \right] - R_s \pi R^2 \Delta Z (1-\varepsilon) = \frac{\partial C}{\partial t} \pi R^2 \Delta Z \varepsilon \quad (3.5)$$

onde: $A = \pi R^2$

Dividindo-se pela área A e por ΔZ tem-se:

$$\frac{vE\varepsilon \Big|_Z - vC\varepsilon \Big|_{Z+\Delta Z}}{\Delta Z} + \frac{-E\varepsilon \frac{\partial C}{\partial z} \Big|_Z + E\varepsilon \frac{\partial C}{\partial z} \Big|_{Z+\Delta Z}}{\Delta Z} - (1-\varepsilon)R_s = \varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} \quad (3.6)$$

Tomando o limite com $\Delta Z \rightarrow 0$ e considerando que o coeficiente de dispersão axial (E) e a porosidade do leito (ε) são constantes ao longo da coluna tem-se:

$$-v\varepsilon \frac{\partial C}{\partial z} + E\varepsilon \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - (1-\varepsilon)R_s = \varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} \quad (3.7)$$

Rearranjando tem-se:

$$\frac{\partial C}{\partial t} \Big|_{Ac.} = -v\varepsilon \frac{\partial C}{\partial z} + E\varepsilon \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - (1-\varepsilon)R_s \quad (3.8)$$

$$R_s = \frac{\partial Q}{\partial t}$$

Então a equação de balanço de massa na coluna de adsorção pode ser escrita da seguinte maneira:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -v \frac{\partial C}{\partial z} + E \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial Q}{\partial t} \quad (3.9)$$

A expressão cinética para adsorção da lisozima em resina pode ser escrita como:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = [k_1 C (Q_m - Q) - k_2 Q] = -\frac{\partial C}{\partial t} \frac{\varepsilon}{(1-\varepsilon)} \quad (3.10)$$

onde:

R_s - taxa de adsorção de lisozima [mol lisozima/m³ meio]

Q - conc. de lisozima adsorvida na resina [mol lisozima/m³ resina]

C - conc. de lisozima em solução [mol lisozima/m³ solução]

k_1 , k_2 e Q_m - constantes cinéticas do modelo de adsorção.

Como o sistema de equações consiste de uma equação diferencial parcial e uma equação diferencial ordinária, sugere-se aplicar 2 métodos de resolução numérica. Neste caso utilizou-se simultaneamente o método de Crank-Nicholson e Runge-kutta de quarta ordem para equação diferencial parcial e equação diferencial ordinária respectivamente.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -v \frac{\partial C}{\partial z} + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial C_s}{\partial t} + E \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (3.11)$$

Com as seguintes condições inicial e de contorno:

condição inicial:

$$t = 0 \Rightarrow 0 \leq Z \leq L \Rightarrow C = C_0$$

na entrada da coluna:

$$\left\{ Z = 0 \Rightarrow \frac{v}{\varepsilon} C - E \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \right.$$

na saída da coluna:

$$\left\{ Z = L \Rightarrow \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \right. \begin{cases} C_{n+1,j} = C_{n,j} \\ C_{n+1,j+1} = C_{n,j+1} \end{cases}$$

Com as seguintes condições inicial e de contorno para $C(z,t)$ e $Q(z,t)$:

$$C_{0,0} = C_0 \qquad Q_{0,0} = 0 \qquad C_{0,j} = C_0 \quad \forall j$$

$$C_{i,0} = 0 \quad i > 1 \qquad Q_{i,0} = 0 \quad i > 1 \qquad Q_{0,j} = 0 \quad \forall j$$

Derivadas da concentração de lisozima em solução, segundo Crank-Nicholson são:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{C_{i,j+1} - C_{i,j}}{\Delta t} \quad (3.12)$$

$$\frac{\partial C}{\partial z} = \frac{1}{2} \left\{ \frac{C_{i+1,j+1} - C_{i-1,j+1}}{2\Delta Z} + \frac{C_{i+1,j} - C_{i-1,j}}{2\Delta Z} \right\} \quad (3.13)$$

$$\frac{\partial^2 C}{\partial z^2} = \frac{1}{2} \left\{ \frac{C_{i+1,j} - 2C_{i,j} + C_{i-1,j}}{(\Delta Z)^2} + \frac{C_{i+1,j+1} - 2C_{i,j+1} + C_{i-1,j+1}}{(\Delta Z)^2} \right\} \quad (3.14)$$

Equação cinética:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = k_1 C (Q_m - Q) - k_2 Q \quad (3.2)$$

Substituindo-se a equação (3.12), (3.13) e (3.14) na equação (3.11) tem-se:

$$\begin{aligned} \frac{C_{i,j+1} - C_{i,j}}{\Delta t} = & -v \frac{1}{2} \left\{ \frac{C_{i+1,j+1}}{2\Delta Z} + \frac{C_{i+1,j} - C_{i-1,j}}{2\Delta Z} \right\} + \\ & E \frac{1}{2} \left\{ \frac{C_{i+1,j} - 2C_{i,j} + C_{i-1,j}}{(\Delta Z)^2} + \frac{C_{i+1,j+1} - 2C_{i,j+1} + C_{i-1,j+1}}{(\Delta Z)^2} \right\} - \\ & \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \left[k_1 C_{i,j} (Q_m - Q_{i,j}) - k_2 Q_{i,j} \right] \end{aligned} \quad (3.15)$$

Rearranjando a equação (3.15) tem-se:

$$\begin{aligned} - \left[\underbrace{\frac{v}{4\Delta Z} + \frac{E}{2(\Delta Z)^2}}_{\alpha} \right] C_{i-1,j+1} + \left[\underbrace{\frac{E}{(\Delta Z)^2} + \frac{1}{\Delta t}}_{\beta} \right] C_{i,j+1} + \left[\underbrace{\frac{v}{4\Delta Z} - \frac{E}{2(\Delta Z)^2}}_{\gamma} \right] C_{i+1,j+1} = \\ \left[\underbrace{\frac{v}{4\Delta Z} + \frac{E}{2(\Delta Z)^2}}_{\alpha} \right] C_{i-1,j} + \left[\underbrace{\frac{1}{\Delta t} - \frac{E}{(\Delta Z)^2}}_{\delta} - \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) k_1 (Q_m - Q_{i,j}) \right] C_{i,j} + \\ \left[\underbrace{\frac{E}{2(\Delta Z)^2} - \frac{v}{4\Delta Z}}_{-\gamma} \right] C_{i+1,j} + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) k_2 Q_{i,j} \end{aligned} \quad (3.16)$$

onde:

$$\alpha = \left[\frac{v}{4\Delta Z} + \frac{E}{2(\Delta Z)^2} \right] \quad (3.17)$$

$$\beta = \left[\frac{E}{(\Delta Z)^2} + \frac{1}{\Delta t} \right] \quad (3.18)$$

$$\gamma = \left[\frac{v}{4\Delta Z} - \frac{E}{2(\Delta Z)^2} \right] \quad (3.19)$$

$$\delta = \left[\frac{1}{\Delta t} - \frac{E}{(\Delta Z)^2} \right] \quad (3.20)$$

Da qual obtém-se a equação geral:

$$-\alpha C_{i-1,j+1} + \beta C_{i,j+1} + \gamma C_{i+1,j+1} = \alpha C_{i-1,j} - \gamma C_{i+1,j}$$

$$\left[\delta - \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} k_1 (Q_m - Q_{i,j}) \right] C_{i,j} + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} k_2 Q_{i,j} \quad (3.21)$$

Levando-se em consideração a resistência à transferência de massa externa e considerando regime permanente:

$$R_s = j = K(C - C_s) \quad (3.22)$$

Para um reator de leito fixo tem-se:

$$j = \frac{N_{Sh}}{N_{Re} N_{Sc}} (N_{Sc})^{2/3} \quad (3.23)$$

onde:

$$N_{sh} = \frac{K dp}{D v} \quad (3.24)$$

e D é a difusividade molecular da lisozima.

Segundo YOUNG et alii, citado por LIAPIS et alii (1989), a difusividade molecular da lisozima pode ser obtida pela seguinte expressão:

$$D = 8,34 \times 10^{-8} \left[\frac{T}{(\mu M^{1/3})} \right] \quad (3.25)$$

onde:

T - * é a temperatura absoluta (300 K)

μ - é a viscosidade da solução que contém o adsorbato (Kg/mh)

M - * é o peso molecular da enzima (avaliado em 14400)

* De acordo com LIAPIS et alii (1989).

$$N_{sc} = \frac{\mu}{\rho D v} \quad (3.26)$$

$$N_{Re} = \frac{\rho v dp}{\mu} \quad (3.27)$$

Substituindo-se os números adimensionais na equação (3.23):

$$j = \frac{K}{v} \left(\frac{\mu}{\rho D} \right)^{2/3} \quad (3.28)$$

Isolando o coeficiente global de transferência de massa (K) tem-se:

$$K = j v \left(\frac{\mu}{\rho D} \right)^{-2/3} \quad (3.29)$$

De acordo com a correlação de DWIVEDI & UPADHYAY (1977) para $N_{Re} < 10$:

$$j = \frac{1,1068}{\varepsilon} \left(\frac{\rho v dp}{\mu} \right)^{-0,72} \quad (3.30)$$

Substituindo-se a correlação acima na expressão do coeficiente global de transferência de massa:

$$K = v \frac{1,1068}{\varepsilon} \left(\frac{\rho v dp}{\mu} \right)^{-0,72} \left(\frac{\mu}{\rho D} \right)^{-2/3} \text{ ou seja,}$$

$$K = v \frac{1,1068}{\varepsilon} (N_{Re})^{-0,72} (N_{Sc})^{-2/3} \quad (3.31)$$

Retornando-se as equações (3.10) e (3.22) para obter a expressão da concentração na superfície da resina:

$$-\frac{\partial C}{\partial t} = \left[k_1 C_s (Q_m - Q) - k_2 Q \right] \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (3.10)$$

$$j = K(C - C_s) = R_s = -\frac{\partial C}{\partial t} = \left[k_1 C (Q_m - Q) - k_2 Q \right] \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (3.22)$$

Assim isolando-se Cs:

$$C_{s,i,j} = \frac{KC_{i,j} + k_2 Q_{i,j} \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}}{K + k_1 (Q_m - Q_{i,j}) \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}} \quad (3.32)$$

e substituindo equação (3.32) na equação (3.9) obtém-se a equação:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -v \frac{\partial C}{\partial z} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - K \left[C - \frac{KC + k_2 Q \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}}{K + k_1 (Q_m - Q) \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}} \right] \quad (3.33)$$

Portanto a equação geral assume a seguinte expressão:

$$-\alpha C_{i-1,j+1} + \beta C_{i,j+1} + \gamma C_{i+1,j+1} = \alpha C_{i-1,j} - \gamma C_{i+1,j} + \left\{ \delta - \left[K + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} k_1 (Q_m - Q_{i,j}) \right] \right\} C_{i,j} + k_2 Q_{i,j} \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \left[\frac{(2\alpha - 2\gamma - \beta + \delta)}{K} + 1 \right] \quad (3.34)$$

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Este trabalho apresenta um modelo matemático do processo, com resolução numérica baseada nos métodos de Crank-Nicholson e Runge Kutta de quarta ordem, para coluna de adsorção. Foi dividido em três etapas principais que são o ajuste do modelo, análise paramétrica e predição da ampliação de coluna.

Os parâmetros operacionais e cinéticos, foram obtidos do artigo de CHASE (1984-a) para purificação de lisozima em gel sepharose e ligante Cibacron Blue e são apresentados na Tabela 4.1.

TABELA 4.1: Valores dos parâmetros utilizados nas simulações do modelo proposto:

L	=	(14, 41, 66, 104, 161) x 10 ⁻³ m
ε	=	0,4 e 0,5 *
θ	=	0,01 m
Co	=	7,1x10 ⁻³ mol/m ³
Q _m	=	8,8x10 ⁻¹ mol/m ³
k ₁	=	1000 m ³ /(mol h)
k ₂	=	1,8/ h
D	=	2,9x10 ⁻⁹ m ² /h**
dp	=	3,8x10 ⁻⁵ m ***
E	=	1,1x10 ⁻⁴ m ² /h
v	=	8,1x10 ⁻¹ m/h

* Valores estimados.

** YOUNG et alii, citado por LIAPIS et alii (1989).

***HORSTMANN et alii (1986).

IV.1 - Primeira Etapa: Ajuste do Modelo

Como primeira etapa, foram realizadas simulações, com a finalidade de ajustar o modelo matemático proposto aos dados experimentais da literatura tendo como parâmetro de ajuste a porosidade. O fato de se ter tomado a porosidade como parâmetro de ajuste se deve a não existência deste valor nos artigos de CHASE (1984). Os valores de porosidade utilizados nas simulações foram 0,4 e 0,5. O valor inicial de porosidade igual a 0,4 foi baseado no artigo de ARVES & LIAPIS (1988), depois o valor de 0,5 foi uma aproximação da porosidade utilizada por LIAPIS et alii (1989) de valor igual a 0,46 na adsorção bioespecífica de lisozima. As Figuras 4.1 a 4.5 abaixo mostram as curvas de saída "breakthrough" para os diferentes comprimentos de coluna utilizando um valor de porosidade igual a 0,4.

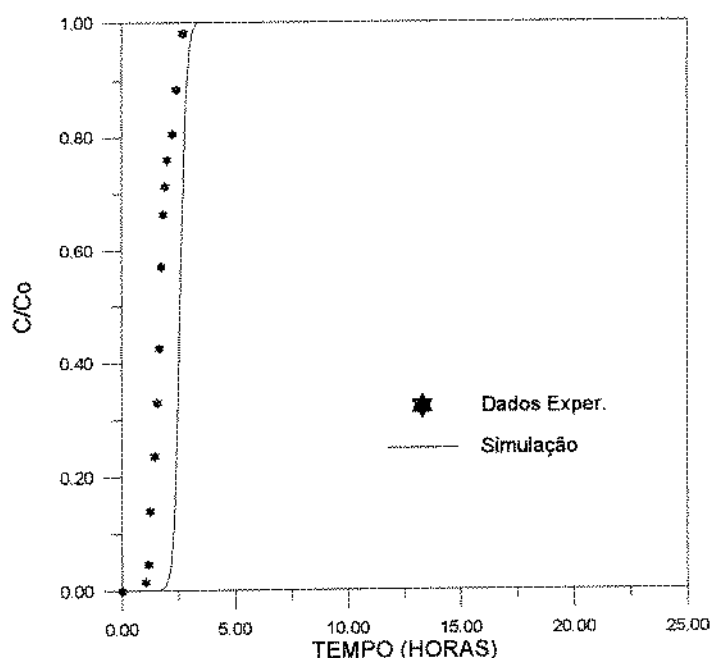


FIGURA 4.1: Comparação da curva de "breakthrough" simulada da coluna de adsorção de comprimento 14 mm e porosidade 0,4 com os dados experimentais.

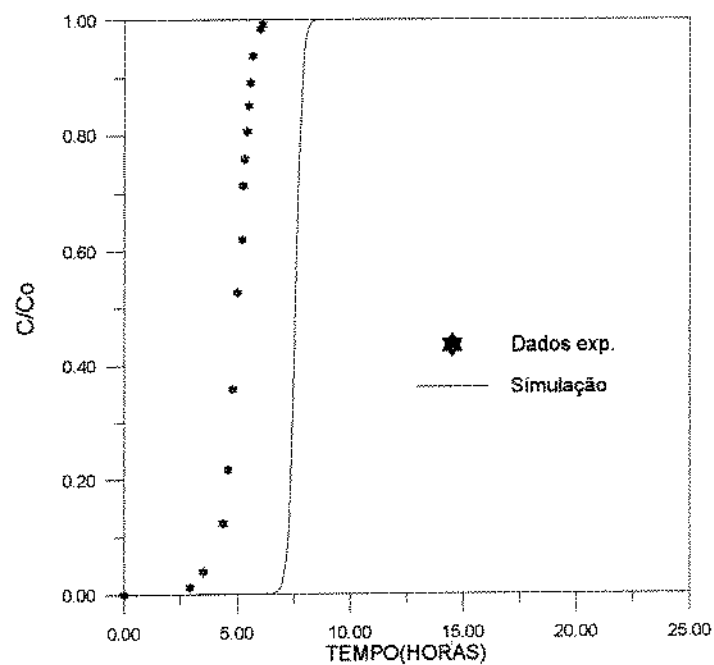


FIGURA 4.2: Comparação da curva de "breakthrough" simulada da coluna de adsorção de comprimento 41 mm e porosidade 0,4 com os dados experimentais.

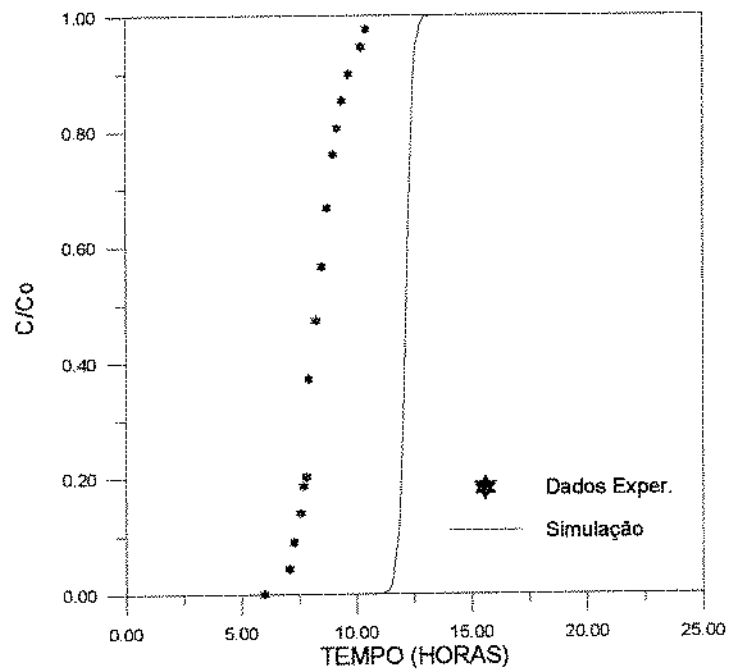


FIGURA 4.3: Comparação da curva de "breakthrough" simulada da coluna de adsorção de comprimento 66 mm e porosidade 0,4 com os dados experimentais.

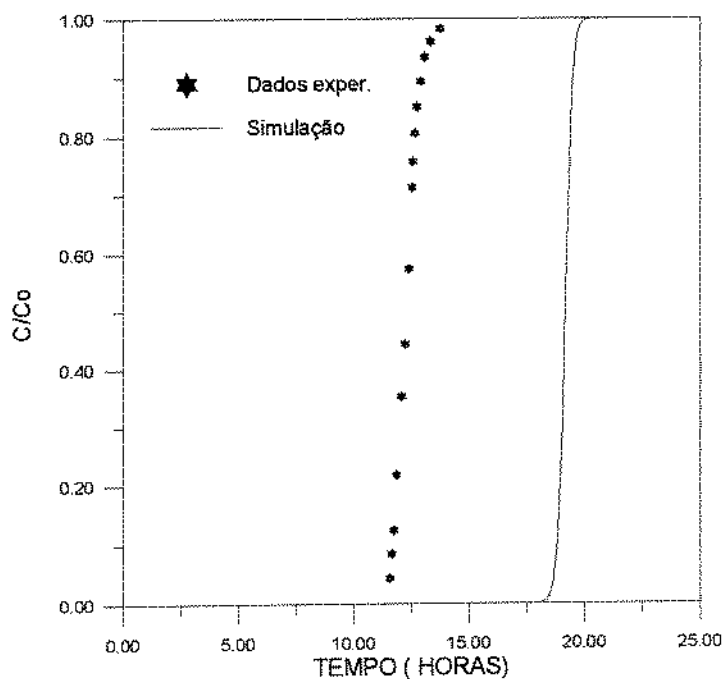


FIGURA 4.4: Comparação da curva de "breakthrough" simulada da coluna de adsorção de comprimento 104 mm e porosidade 0,4 com os dados experimentais.

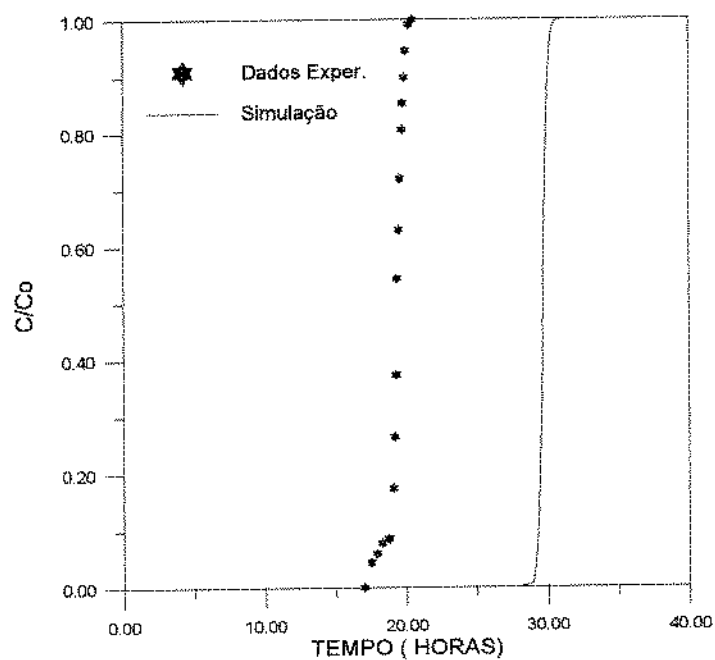


FIGURA 4.5: Comparação da curva de "breakthrough" simulada da coluna de adsorção de comprimento 166 mm e porosidade 0,4 com os dados experimentais.

COWAN et alii (1986) utilizou como parâmetro de ajuste o valor da quantidade máxima de adsorção da resina e velocidade superficial. Neste caso houve uma diminuição de 4% no valor da quantidade máxima de enzima a ser adsorvida pela resina (Q_m), proporcionando o ajuste do modelo, e um aumento na velocidade superficial que afeta o tempo de saturação. HORSTMANN & CHASE (1989) também ajustaram o modelo proposto com os dados experimentais através do parâmetro de Q_m em análise de adsorção, em leito fixo, de imunoglobulina G em Sepharose.

Neste trabalho, no entanto, lançou-se mão do parâmetro porosidade por este não ter sido citado no trabalho de CHASE (1984) e portanto o valor de 0,4 foi uma estimativa inicial.

Um novo valor de porosidade foi verificado, realizadas as simulações para os diferentes comprimentos de coluna de adsorção, mantendo-se os outros parâmetros constantes.

A Figura 4.6 mostra as comparações entre a curva simulada para a porosidade do leito (ϵ) igual a 0,5 e os dados experimentais. Houve uma boa concordância, com exceção da coluna de 66 mm que apresentou uma pequena discrepância. A curva com os dados experimentais se mostra mais inclinada do que a curva simulada.

COWAN et alii (1986) também obteve a mesma discrepância para a coluna de adsorção de 66 mm usando um programa computacional denominado Facsimile. Este programa foi desenvolvido para solucionar equações diferenciais do balanço de massa para predição de processos de adsorção e tem demonstrado ser robusto e confiável. A Figura 4.7 compara os resultados das curvas simuladas através do modelo proposto neste trabalho e o de COWAN et alii (1986) com a curva dos dados experimentais. Esta discrepância pode ser devido a ocorrência de canais preferenciais dentro da coluna ou adsorção não-específicas.

O valor da porosidade do leito na coluna de adsorção, igual a 0,5 forneceu boa concordância, sendo portanto mantido como referência nas simulações das etapas seguintes.

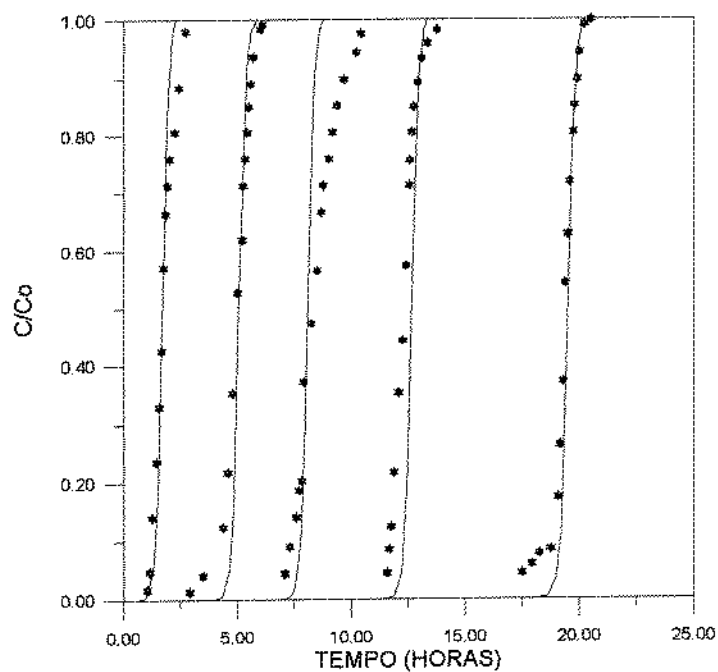


FIGURA 4.6: Curvas de "breakthrough" das colunas de comprimento 14, 41, 66, 104 e 161 mm, da esquerda para a direita respectivamente, e porosidade 0,5 comparadas com as curvas dos dados experimentais.

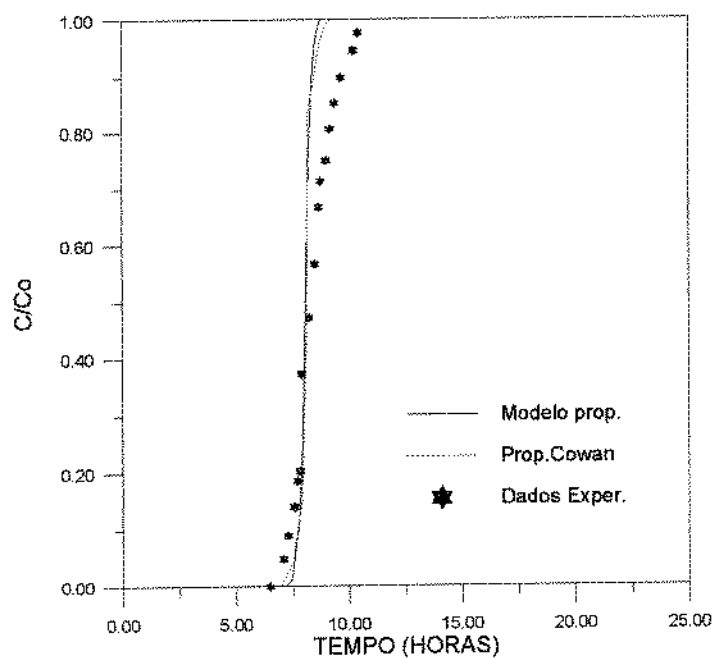


FIGURA 4.7: Curvas obtidas pelo modelo proposto, de COWAN (1986) através do Facsimile e dos dados experimentais para coluna de adsorção de comprimento 66 mm.

IV.2 - Segunda etapa: Análise Paramétrica

A modelagem e simulação torna possível estudar o efeito de alterações nos parâmetros operacionais e cinéticos do processo e, com isso possibilitar uma análise do comportamento do sistema através das respostas obtidas ou, em outros termos, uma análise paramétrica.

A análise paramétrica foi realizada com intuito de verificar a influência de cada parâmetro, com uma variação de 25 % superior ao valor na referência (Tabela 4.1), através do fator sensibilidade. No cálculo da sensibilidade, a eficiência da coluna de adsorção foi considerada o parâmetro de saída e os parâmetros de entrada considerados estão na Tabela 4.2. A referência adotada, nesta etapa, foi a coluna de adsorção de 104 mm.

TABELA 4.2: Valores dos parâmetros com uma alteração de 25 % superior, aos parâmetros de referência, utilizados para a análise paramétrica da coluna de adsorção:

L	$= 0,13 \text{ m}$
ε	$= 0,625$
θ	$= 1,25 \times 10^{-2} \text{ m}$
C_o	$= 8,9 \times 10^{-3} \text{ mol/m}^3$
Q_m	$= 1,1 \text{ mol/m}^3$
k_1	$= 1250 \text{ m}^3/(\text{mol h})$
k_2	$= 2,25/\text{h}$
D	$= 3,625 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{h}$
dp	$= 4,75 \times 10^{-5} \text{ m}$
E	$= 1,375 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{h}$
v	$= 1,0125 \times 10^{-1} \text{ m/h}$

As Figuras 4.8 a 4.15 mostram os resultados obtidos para estes experimentos. Nestas figuras estão graficados as curvas simuladas consideradas como referência e as oriundas do modelo com uma variação de 25% superior nos parâmetros considerados como padrão e os dados experimentais.

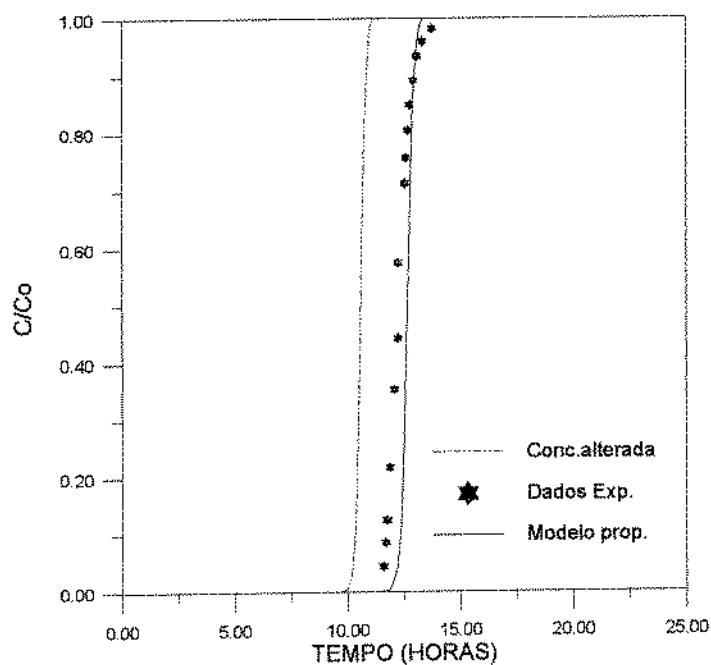


FIGURA 4.8: Comparação entre as curvas do modelo proposto, dos dados experimentais e do modelo com uma variação de 25% , superior, na concentração (C_o).

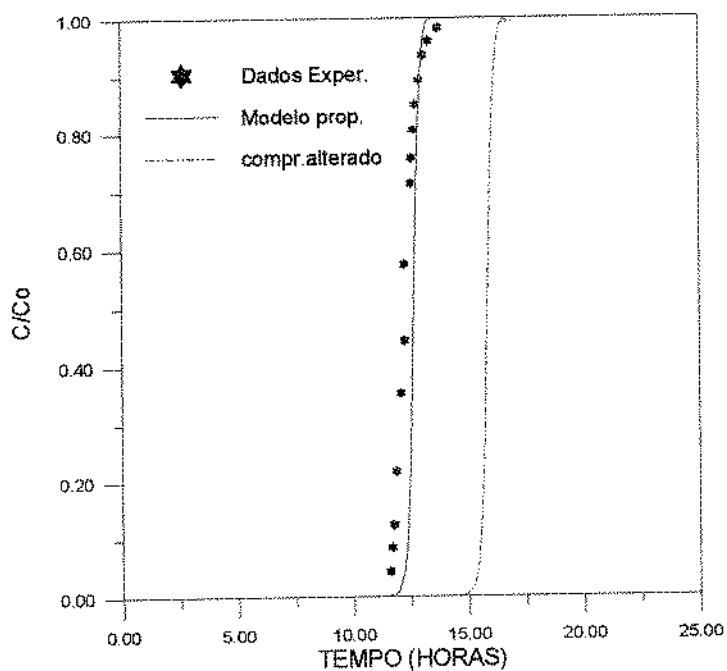


FIGURA 4.9: Comparação das curvas de "breakthrough" do modelo proposto, dos dados experimentais e do modelo com uma variação de 25 % no comprimento da coluna (L).

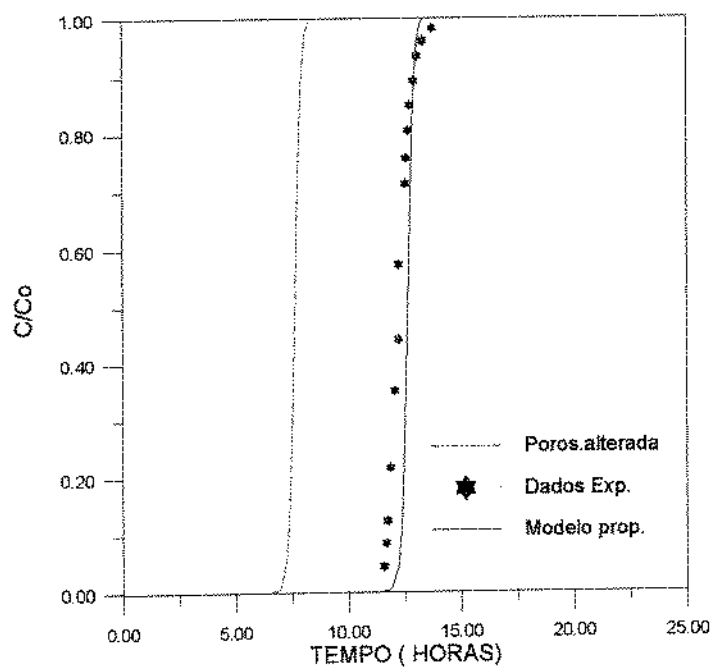


FIGURA 4.10: Comparação das curvas de "breakthrough" do modelo proposto, dos dados experimentais e do modelo com uma variação de 25 % na porosidade (ϵ) da coluna.

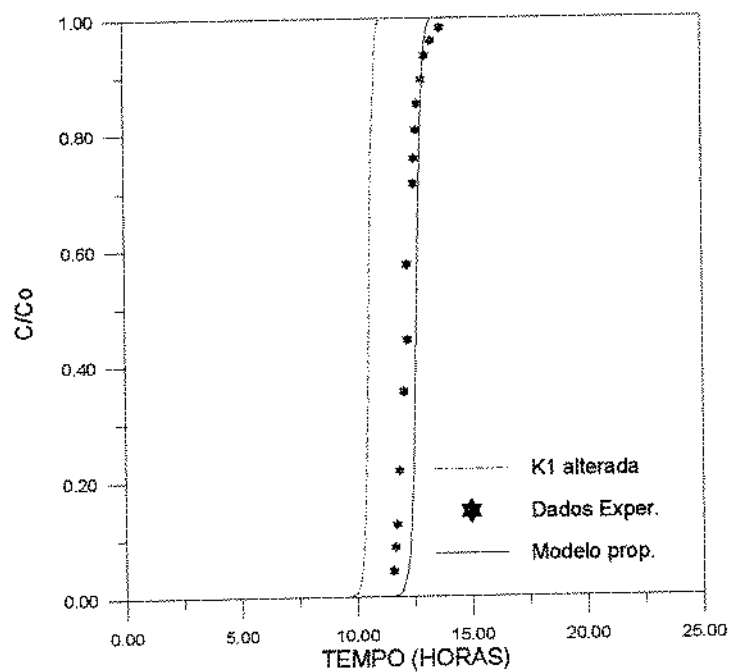


FIGURA 4.11: Comparação das curvas de "breakthrough" do modelo proposto, modelo com uma variação de 25% constante cinética k_1 e dos dados experimentais.

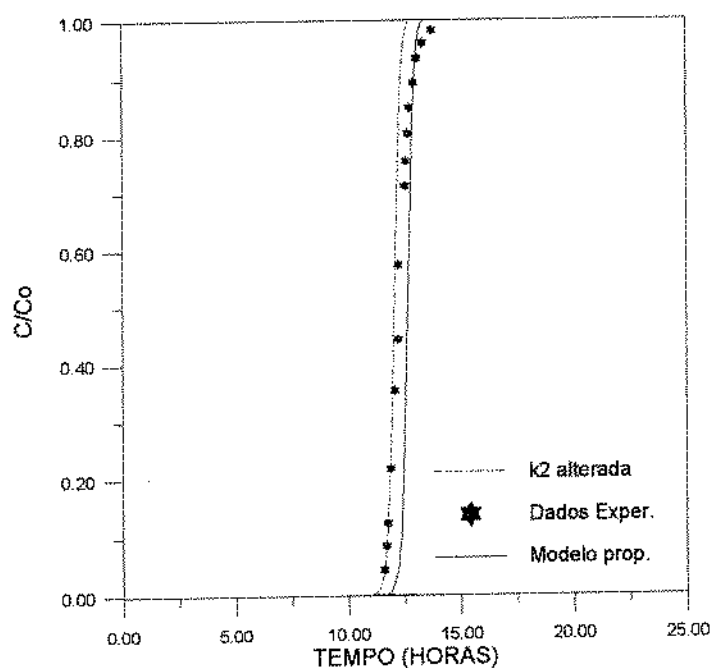


FIGURA 4.12: Comparação das curvas de "breakthrough" do modelo proposto, do modelo com uma variação de 25 % na constante cinética k_2 e dos dados experimentais.

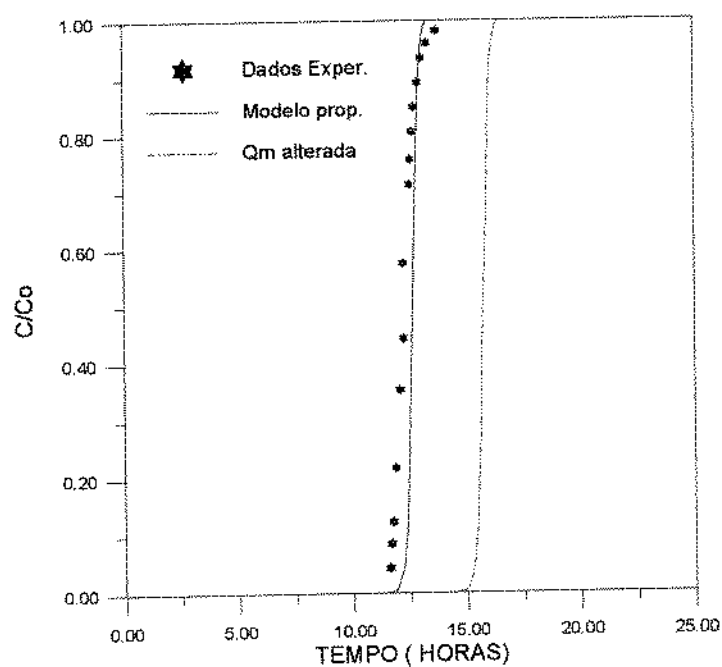


FIGURA 4.13: Comparação das curvas de "breakthrough" do modelo proposto, do modelo com uma variação de 25 % na quantidade máxima de enzima (Q_m) a ser adsorvida e dos dados experimentais.

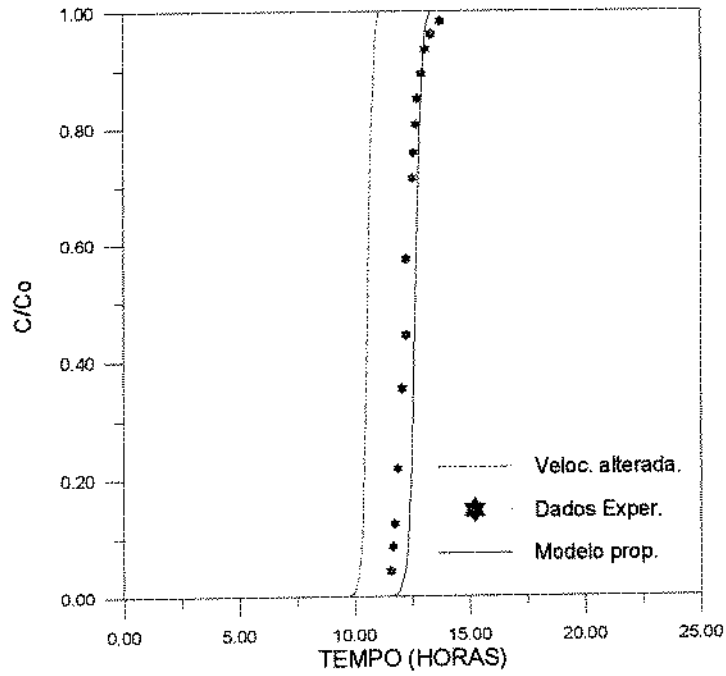


FIGURA 4.14: Comparação das curvas de "breakthrough" do modelo proposto, do modelo com uma variação de 25 %, superior, na velocidade superficial (v) e dos dados experimentais.

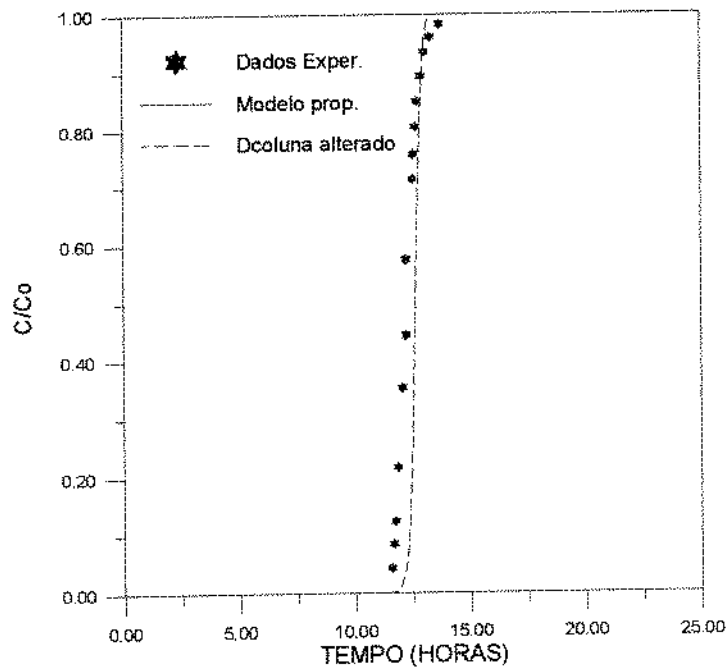


FIGURA 4.15: Comparação das curvas de "breakthrough" do modelo proposto, do modelo com variação de 25 % no diâmetro da coluna ($\theta=1,25 \times 10^{-2}$ m) e na vazão volumétrica ($V_z= 4,97 \times 10^{-5}$ m³/h) e dos dados experimentais, (para o modelo proposto e o mesmo com alteração no diâmetro da coluna as curvas são coincidentes).

É interessante notar nestas figuras que ao se alterar algum parâmetro, na maioria dos casos, ocorre uma alteração no tempo de resposta, mas praticamente a forma das curvas não se alteram, podendo estas serem consideradas paralelas. Isto implica que a operação da coluna não é afetada consideravelmente com a alteração dos parâmetros, pelo menos na magnitude em que foi efetuada esta alteração (25% superior aos parâmetros considerados como referência).

Para uma análise mais criteriosa, definiu-se a eficiência da coluna, como explicado na seção a seguir.

IV.2.1 - Cálculo da eficiência da coluna

O desempenho da coluna foi analisado com base no conceito da eficiência, que é definida pela razão da quantidade de enzima retida pelo leito sobre a quantidade de enzima aplicada no leito, ou seja, quando ocorre a saturação do leito. A escolha arbitrária do valor de C/Co , da curva de saída "breakthrough", no processo adsorção foi de 0,1. Neste ponto que se pode calcular a quantidade de enzima retida na coluna através da equação:

$$Q_{ads} = Co V_z t \quad (4.1)$$

onde:

o tempo (t) é o correspondente quando atinge-se um valor de 0,1 da razão de C/Co .

Depois de realizadas as simulações para a variação de 25% em todos os parâmetros, pode-se calcular a eficiência com base na quantidade de enzima adsorvida na coluna.

A eficiência foi estabelecida da seguinte forma:

$$\phi = \frac{Q_{ads} (C/Co=0,1)}{Q_{ads} (C/Co=1)} \quad (4.2)$$

onde o valor de $Q_{ads(C/Co=0,1)}$ e $Q_{ads(C/Co=1)}$ são definidos, respectivamente como:

$$Q_{ads(C/Co=0,1)} = Co V_Z t_{(C/Co=0,1)} \quad (4.3)$$

$$Q_{ads(C/Co=1)} = Co V_Z t_{C/Co=1} - V_Z \left[\int_{C/Co=0}^{C/Co=1} \frac{C(t)}{Co} dt \right] \quad (4.4)$$

O cálculo da integral foi feito pela integração numérica por pontos.

Os valores de $Q_{ads(C/Co=1)}$, referentes à coluna de comprimento 104 mm, utilizados no cálculos da eficiência estão na Tabela 4.3, e os valores das eficiências calculadas para cada parâmetro com o respectivo tempo de saturação da coluna são mostrados na Tabela 4.3.

Analizando a terceira coluna da Tabela 4.3, que contém os resultados de eficiência como definido pela Equação 4.2, verifica-se que pouco se altera estes valores com a alteração dos parâmetros, como já se podia prever a partir das Figuras 4.8 a 4.15.

A partir destes resultados pode-se dizer que as operações com colunas de cromatografia de afinidade são bastante estáveis, não estando sujeitos a grandes riscos, salvos, evidentemente, se ocorrerem erros graves de manipulação.

No entanto, é válido analisar o fator de sensibilidade descrito no item a seguir, cujos valores estão expressos na quarta coluna da Tabela 4.3.

IV.2.2 - Fator de sensibilidade dos parâmetros:

A sensibilidade de um sistema, como um conceito geral, refere-se a uma alteração na variável de saída que pode ser atribuída a uma variação em um dos parâmetros do sistema. Como uma medida, a sensibilidade tem um valor muito significativo para a engenharia pois permite prever possíveis alterações na saída do sistema. O seu cálculo é baseado numa predição de um modelo face a mudanças nos parâmetros de uma coluna em operação.

O fator de sensibilidade tornou-se muito importante, especialmente em processos de ciclos, que são processos nos quais existe a possibilidade de um parâmetro de saída ter influência sobre ele mesmo, segundo HIMMELBLAU & BISCHOFF (1968).

Após a realização das simulações, foi feita a quantificação nos parâmetros de entrada (L, Co, E, K, k₁, k₂, v, dp, θ, ε, D) e no parâmetro de saída, ou seja, a eficiência da coluna de adsorção (φ).

O fator sensibilidade (S) foi calculado como a razão entre a variação em porcentagem dos parâmetros de entrada e a variação em porcentagem do parâmetro de saída. Este fator representa o ganho ou perda no estado estacionário, definido como:

$$S = \frac{\frac{\text{valor obtido da variável de saída} - \text{valor da variável de saída nas condições de referência}}{\text{valor da variável de saída nas condições de referência}}}{\frac{\text{valor alterado (25 \%) variável de entrada} - \text{valor da variável de entrada nas condições de referência}}{\text{valor da variável de entrada nas condições de referência}}}$$

Os valores calculados do fator sensibilidade para cada parâmetro alterado estão na Tabela 4.3.

Como exemplo, mostra-se abaixo o cálculo do fator sensibilidade para a porosidade:

$$S = \frac{\Delta\phi}{\Delta\varepsilon} = \frac{(96,01 - 97,43) / 97,43}{(0,625 - 0,5) / 0,5} = -5,830 \times 10^{-2}$$

Neste caso os valores de ϕ e ε foram retirados da Tabela 4.3 e Tabelas 4.1 e 4.2 respectivamente.

Os dados de fator sensibilidade podem ser interpretados como a porcentagem de variação na variável de saída (a eficiência) para 1% de variação de entrada. No exemplo acima, para a porosidade, tem-se que a eficiência diminui 0,05 % para cada 1 % de aumento na porosidade do leito.

IV. 2.3 - Análise dos Resultados Obtidos:

Através dos resultados das simulações, na Tabela 4.3, para análise paramétrica verificou-se que os parâmetros K , d_p , D , θ e E quando alterados 25%, em relação à referência, apresentaram os mesmos resultados (ϕ e S) da curva de "breakthrough" da coluna de comprimento 104 mm com os parâmetros considerados padrão, ou seja, fator de sensibilidade nulo. Em outras palavras, a alteração destes parâmetros, pelo menos até uma magnitude de mais ou menos 25%, não altera em nada o comportamento da coluna.

Estes resultados podem parecer surpreendentes principalmente no que tange a alteração do coeficiente global de transferência de massa da película (K). É de se prever que com o aumento de K a resistência na película diminua e portanto melhora a transferência de massa e velocidade de reação na superfície. No entanto, há de se considerar os aspectos da limitação do processo como descrito no capítulo II. Analisando mais proximamente este aspecto e tomando o número de Damköhler adaptado para a transferência de massa externa em coluna de adsorção, como descrito pela Equação 4.5, e substituindo os valores dos parâmetros de velocidade de reação e velocidade de transferência de massa, obtém-se 1×10^{-6} para o número de Damköhler. Ou seja, a etapa de reação química é amplamente limitante neste processo, o que explica portanto o resultado obtido.

O cálculo do número de Da é dado por:

$$Da = \frac{k_1 Q_m Co / Kd}{\left(K / dp^2 \right)} \quad (4.5)$$

Por outro lado, o fato do coeficiente de dispersão, não influenciar no comportamento da coluna, mostra que a coluna opera proximamente a um reator tubular ideal.

No caso do aumento no diâmetro da coluna não há alteração na eficiência, mas por outro lado, favorece muito o aumento da quantidade de adsorbato retido pela coluna, para um mesmo tempo de saturação que a referência.

Para comprovação dos efeitos de K e E, ou seja a influência dos parâmetros relativos à resistência de transferência de massa externa e o fator de dispersão axial foram feitas as seguintes considerações nas seguintes simulações:

Simulação 1: $Fj=0$

Simulação 2: $E=0$

Simulação 3: $Fj=0$ e $E=0$

Sendo $Fj = (2\alpha - 2\gamma - \beta + \delta) / K$, portanto quando:

$Fj = 0$ conseqüentemente $K \rightarrow \infty$

Novamente foram obtidos os mesmos resultados da simulação da coluna de comprimento 104 mm, considerada padrão de referência, comprovando que a resistência à transferência de massa externa assim como a dispersão axial podem ser negligenciadas neste modelo proposto para o processo de adsorção.

A porosidade, a velocidade superficial e k_2 quando alterados 25% em relação ao padrão apresentaram uma sensibilidade negativa, que representa uma perda na eficiência da coluna. Para os dois primeiros parâmetros quando aumentados diminuem o tempo de contato entre o adsorbato e o adsorvente, por esta razão são mais significativos do que a perda na eficiência fornecida pela constante k_2 .

A concentração inicial, comprimento, quantidade máxima de adsorção e a constante k_1 quando alterados 25%, em relação ao padrão, apresentaram uma sensibilidade positiva, que representa um ganho na eficiência da coluna de adsorção. O aumento no comprimento da coluna não é muito recomendado, pois o tempo de saturação aumenta muito em relação aos outros parâmetros e à própria referência, apesar de apresentar uma eficiência maior. O mesmo ocorre com o aumento da quantidade máxima de adsorção (Q_m). A constante k_1 , que favorece a formação do complexo adsorbato-ligante, fornece uma eficiência maior entre os parâmetros analisados, juntamente com a quantidade máxima de adsorção, mas com um tempo e quantidade de adsorbato retido pelo leito aproximadamente igual a referência.

Portanto, no que tange aos aspectos operacionais e geométricos, passíveis de serem manipulados, é recomendável trabalhar em concentrações relativamente altas da enzima e com comprimentos maiores. No entanto depara-se com um problema que é a fragilidade das resinas utilizadas em afinidade, que não suportam pressões altas limitando o comprimento da coluna. Uma solução é a operação com colunas pequenas dispostas em série.

Os parâmetros Q_m e k_1 , que favorecem o processo quando aumentados, dependem intrinsecamente da interação adsorbato-adsorvente e não é sujeito à manipulações, salvo na etapa de seleção da resina e de escolha das condições de operação (pH, temperatura, força iônica, etc). Deve-se escolher a resina e as condições que favoreçam o aumento de Q_m e k_1 e/ou a diminuição de k_2 .

A produtividade também está relacionada com a velocidade superficial, que é um dado dos fabricante. Seu aumento não deve ultrapassar o limite estipulado pelo fabricante, com riscos de provocar perda de carga excessiva resultando em compactação de leito e formação de canais preferenciais. A velocidade superficial está relacionada com o binômio eficiência e produtividade; ou seja, quanto maior o seu valor ocorre uma perda na eficiência e um ganho na produtividade. Um valor de compromisso tem de ser estabelecido levando em conta, inclusive, fatores de economia de escala.

TABELA 4.3: Valores da eficiência do modelo proposto com parâmetro alterado (25% superior) com o respectivo tempo de processo, análise do fator sensibilidade e a produtividade para cada parâmetro do processo, comparados com o modelo proposto para a coluna de comprimento 104 mm ($\phi = 97,43$ e $t = 13,35$ horas):

Parâmetros	$Q_{ads} (C/C_0=1)$ (mol enz)	Parâmetros Modificados (+25 %)		S	P
		ϕ	Tempo (horas)		
porosidade (ϵ)	$2,157 \times 10^{-6}$	96,01	8,33	$- 5,83 \times 10^{-2}$	$2,59 \times 10^{-7}$
concentração inicial (C_0) (mol/m ³)	$2,990 \times 10^{-2}$	97,63	11,13	$+ 8,10 \times 10^{-3}$	$2,69 \times 10^{-7}$
comprimento (L) (m)	$3,577 \times 10^{-6}$	97,97	16,60	$+ 2,22 \times 10^{-2}$	$2,15 \times 10^{-7}$
velocidade superficial (v) (m/h)	$2,85 \times 10^{-6}$	96,98	10,74	$- 1,85 \times 10^{-2}$	$2,65 \times 10^{-7}$
constante de dispersão (E) (m ² /h)	$2,851 \times 10^{-6}$	97,43	13,35	0	$2,13 \times 10^{-7}$
diâmetro da coluna (θ) (m)	$4,460 \times 10^{-6}$	97,43	13,35	0	$3,34 \times 10^{-7}$
constante de taxa (k_1) (m ³ /mol h)	$2,968 \times 10^{-6}$	98,07	13,71	$+ 2,63 \times 10^{-2}$	$2,16 \times 10^{-7}$
constante de taxa (k_2) (1/h)	$2,721 \times 10^{-6}$	97,41	12,74	$- 8,21 \times 10^{-4}$	$2,14 \times 10^{-7}$
quant. máx. adsorvida (Q_m) - (mol/m ³)	$3,552 \times 10^{-6}$	98,00	16,43	$+ 2,34 \times 10^{-2}$	$2,16 \times 10^{-7}$
difusividade (D) (m ² /h)	$2,861 \times 10^{-6}$	97,43	13,35	0	$2,14 \times 10^{-7}$
coeficiente global de TM (K) - (m/h)	$2,861 \times 10^{-6}$	97,43	13,35	0	$2,14 \times 10^{-7}$
diâmetro da resina (dp) (m)	$2,861 \times 10^{-6}$	97,43	13,35	0	$2,14 \times 10^{-7}$

Coluna de $\theta = 10$ mm e $L = 104$ mm

P = Produtividade (mol enz/h)

S = Fator de sensibilidade

$Q_{ads}(C/C_0=1)$ = Quantidade de enzima adsorvida na resina

IV.3 - Terceira etapa: Predição da ampliação de escala da coluna de adsorção:

O desenvolvimento da ampliação de escala de processos cromatográficos por afinidade, utilizando a tecnologia das colunas empacotadas, geralmente começa com os estudos em escala de laboratório, passa então pela escala piloto e em seguida para uma escala de produção industrial propriamente dita.

Neste processo de ampliação de escala, a parte inicial de laboratório é muito importante para o conhecimento físico e químico do processo de adsorção, ou seja, é nesta etapa que se obtém a faixa de operação dos parâmetros.

O objetivo da ampliação de escala segundo VOSER (1985), citado por COWAN et alii (1987), na adsorção ou processos cromatográficos é obter o mesmo rendimento e qualidade do produto no mesmo período de tempo na escala de laboratório, piloto e industrial.

Um método comumente usado, adotado por VOSER (1985) e PHARMACIA (1985), citado por COWAN et alii (1987) para determinar a altura do leito e velocidade linear ou superficial da coluna à partir da escala de laboratório é manter estes parâmetros constantes na ampliação de escala. Portanto a altura do leito é mantida constante e o volume da coluna é aumentado através do diâmetro, a composição da alimentação é mantida constante, ou seja, o pH, a viscosidade, concentração inicial e a força iônica.

No entanto, estes procedimentos adotados são puramente empíricos, demandam muito tempo e apresentam alto custo. É por este motivo que a modelagem e simulação do processo podem ser instrumentos valiosos, permitindo a análise do funcionamento das colunas, nos diversos níveis, sem se recorrer a experimentos práticos. O resultado seria uma redução drástica de recursos e ganho de tempo.

Desta forma estabeleceu-se realizar simulações em colunas industriais, a partir dos dados cinéticos obtidos em escala de laboratório a fim de prever o comportamento do sistema em diferentes situações práticas.

A predição da ampliação de escala da coluna de adsorção foi feita de acordo com as colunas industriais da PHARMACIA(b- Bioprocess media) cujos parâmetros estão na Tabela 4.4:

TABELA 4.4: Os valores dos parâmetros para uma escala de produção industrial segundo a Pharmacia:

Diâmetro da coluna (cm)	Comprimento da coluna (cm)	Velocidade superficial (cm/h)
	50	
10	75	100
20	95	

O diâmetro da partícula da resina (d_p), porosidade (ϵ) e os outros parâmetros não foram alterados.

A Figura 4.16 mostra as simulações das curvas de saída da coluna "breakthrough" para os três diferentes comprimento proposto pela literatura:

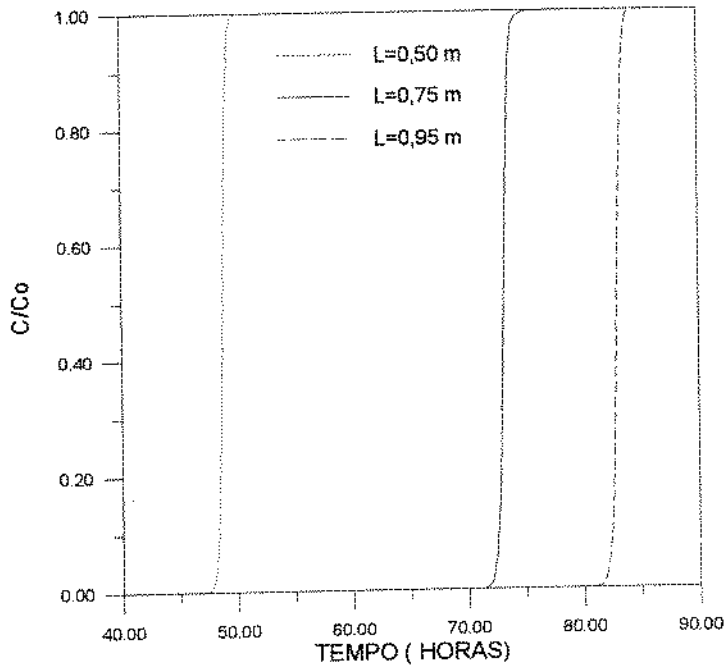


Figura 4.16: Predição das curvas de "breakthrough" através das simulações para os três diferentes comprimento de coluna de adsorção para escala de produção industrial.

TABELA 4.5: Valores da quantidade adsorvida, quando ocorre a saturação da coluna de adsorção, para os três diferentes comprimentos de colunas para a produção industrial com o respectivo tempo, diâmetro, eficiência (ϕ) e produtividade (P):

Comprimento da coluna (m)	$Q_{ads} (C/C_0=1)$		Tempo (horas)	ϕ	Produtividade (P) (mol/h)	
	$\theta=0,1m$	$\theta=0,2m$			$\theta=0,1m$	$\theta=0,2m$
0,50	$1,360 \times 10^{-3}$	$5,440 \times 10^{-3}$	50,18	99,12	$2,71 \times 10^{-5}$	$1,08 \times 10^{-4}$
0,75	$2,041 \times 10^{-3}$	$8,164 \times 10^{-3}$	77,00	99,27	$2,65 \times 10^{-5}$	$1,06 \times 10^{-4}$
0,95	$2,313 \times 10^{-3}$	$9,253 \times 10^{-3}$	84,27	99,38	$2,74 \times 10^{-5}$	$1,09 \times 10^{-4}$

É interessante notar nos dados da Tabela 4.5 que o efeito do aumento no comprimento da coluna é levemente benéfico em termos da eficiência, porém pouco altera na produtividade. No entanto, o diâmetro tem influência decisiva no aumento da capacidade de retenção sem perdas na eficiência. Há o dado do tempo que é importante e deve ser levado em consideração quando o produto sofre desnaturação rápida. Nestes casos quanto menor o tempo melhor seria o rendimento final da purificação.

IV.3.1 - Análise paramétrica da predição da ampliação de escala

Para esta etapa do trabalho foi escolhido o comprimento da coluna intermediária de 75 cm e o diâmetro de 10 cm considerando a mesma variação nos parâmetros de 25 % superior em relação aos parâmetros obtidos da literatura.

O intuito desta etapa é verificar se na escala industrial ocorre as mesmas alterações da escala de bancada, já realizadas na etapa anterior.

IV.3.1.1 - Cálculo da eficiência da coluna e cálculo do fator sensibilidade

Foram realizadas as simulações para os respectivos parâmetros da Tabela 4.6, e então foram feitos os cálculos da eficiência e do fator sensibilidade segundo os tópicos IV.2.1 e IV.2. A Tabela 4.7 mostra os resultados obtidos para cada parâmetro alterado.

TABELA 4.6: Valores dos parâmetros utilizados, nas simulações com o modelo proposto, para uma predição de ampliação de escala:

L	$= 9,375 \times 10^{-1} \text{ m}$
ϵ	$= 0,625$
θ	$= 1,25 \times 10^{-1} \text{ m e } 2,50 \times 10^{-1} \text{ m}$
C_0	$= 8,9 \times 10^{-3} \text{ mol/m}^3$
Q_m	$= 1,1 \text{ mol/m}^3$
k_1	$= 1250 \text{ m}^3/(\text{mol h})$
k_2	$= 2,25/\text{h}$
D	$= 3,625 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{h}$
dp	$= 4,75 \times 10^{-5} \text{ m}$
E	$= 1,375 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{h}$
v	$= 1,25 \text{ m/h}$

As Figuras 4.17 a 4.20 mostram as curvas de predição da ampliação de escala comparadas com a curva dos dados experimentais, onde novamente se observa que as variações se dão mais no tempo e menos na forma das curvas, sendo estas praticamente paralelas em cada experimento:

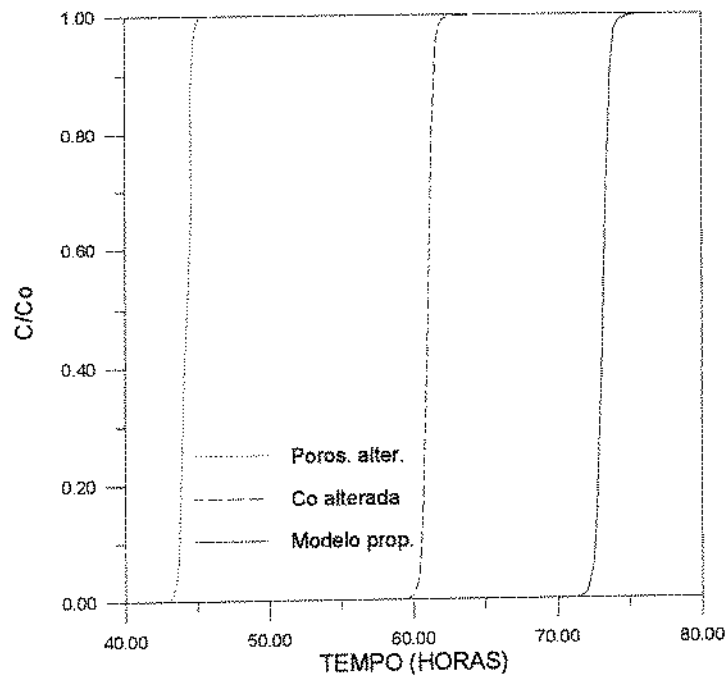


FIGURA 4.17: Comparação da predição das curvas do modelo proposto e modelo com variação de 25 % nos parâmetros concentração de enzima da alimentação (C_o) e porosidade do leito (ϵ).

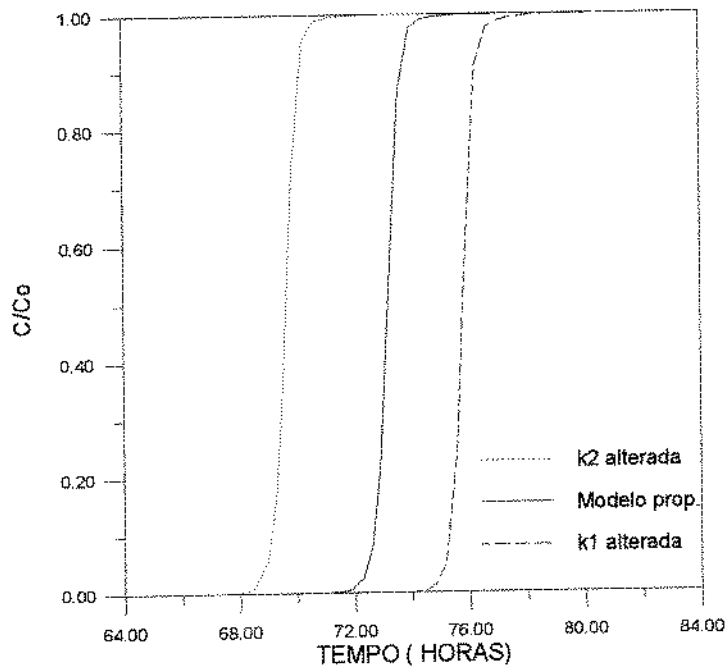


FIGURA 4.18: Comparação da predição das curvas do modelo proposto e do modelo com variação de 25 % nos parâmetros constantes cinéticas k_1 e k_2 .

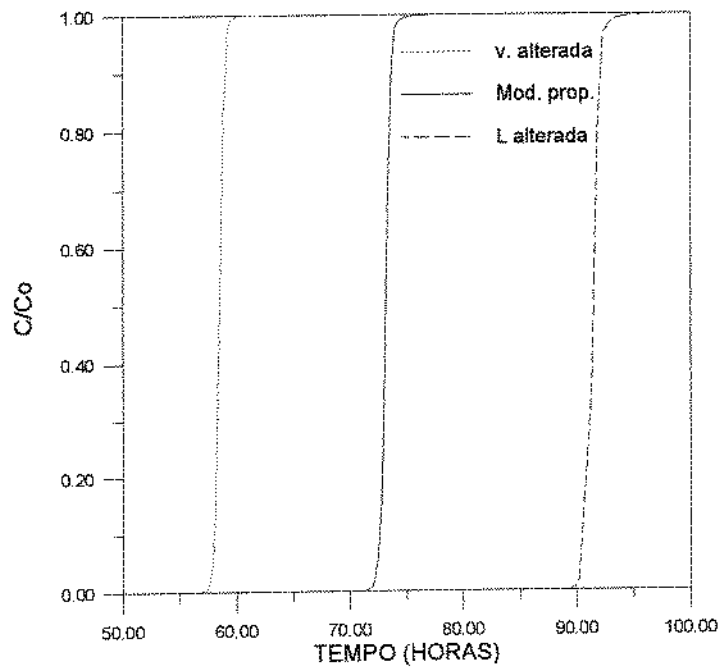


FIGURA 4.19: Comparação da predição das curvas do modelo proposto e do modelo com variação de 25 % nos parâmetros velocidade superficial (v) e comprimento (L).

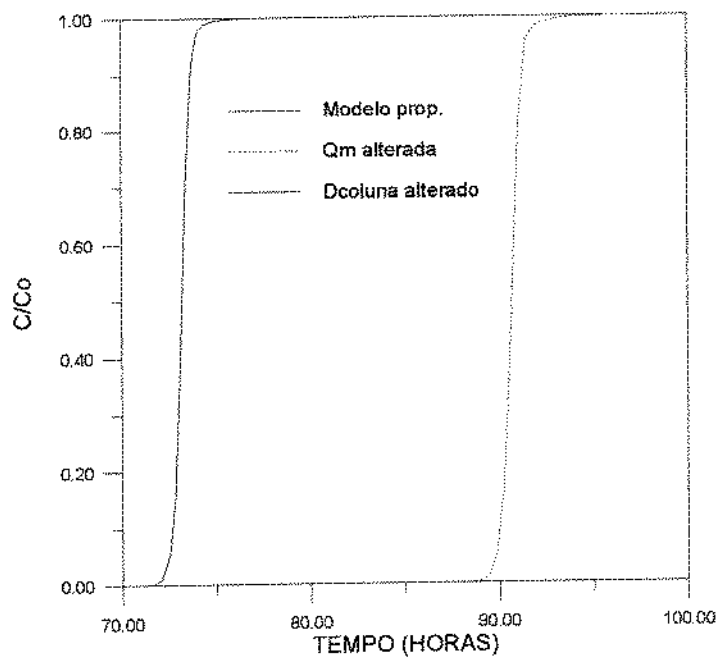


FIGURA 4.20: Comparação da predição das curvas do modelo proposto e do modelo com uma variação de 25 % na quantidade máxima de adsorção da resina (Q_m) e diâmetro da coluna (θ), (para o modelo e alteração no diâmetro da coluna as curvas são coincidentes).

IV.3.2. - Análise dos Resultados Obtidos:

Através dos resultados das simulações, Tabela 4.7, a análise paramétrica mostrou-se que os parâmetros K , dp , D , θ e E quando alterados 25%, em relação à referência, apresentaram os mesmos resultados (ϕ , S) da curva da coluna de 0,75 m com os parâmetros considerados padrão, como já ocorridos na escala de laboratório.

Como no item IV.3.2 fez-se a comprovação dos efeitos de K e E , ou seja a influência dos parâmetros relativos à resistência de transferência de massa externa e o coeficiente de dispersão axial.. Foram feitas as seguintes considerações nas simulações:

Simulação 1: $F_j=0$

Simulação 2: $E=0$

Simulação 3: $F_j=0$ e $E=0$

Sendo $F_j = (2\alpha - 2\gamma - \beta + \delta)/K$, portanto quando:

$F_j = 0$ consequentemente $K \rightarrow \infty$

Novamente foram obtidos os mesmos resultados da simulação da coluna de comprimento 0,75 m, considerada padrão de referência, comprovando que a resistência à transferência de massa externa pode ser negligenciada para este processo, mesmo em escala industrial de adsorção.

Na predição de ampliação de escala o comportamento da coluna mediante a análise paramétrica foi similar ao da coluna de comprimento 104 mm com exceção da quantidade máxima de adsorção, que apresentou uma sensibilidade pequena e negativa. Portanto as mesmas considerações poderiam ser feitas neste caso. É importante frisar novamente o aspecto de ampliação no sentido do comprimento da coluna, pois ganha-se eficiência neste caso, embora o ganho seja muito pequeno. Porém, como já mencionado anteriormente, a prática na ampliação de escala de colunas de afinidade é no sentido do diâmetro e não da altura. Parece que a combinação das duas dimensões seria o ideal. Deve-se considerar entretanto que o tempo de processamento aumenta e isto pode ser danoso para certos produtos.

Quanto à ampliação referente ao diâmetro das colunas, existe um ganho de produtividade, sendo que os outros parâmetros não são afetados.

TABELA 4.7: Valores da eficiência do modelo proposto com parâmetro alterado (25%) com o respectivo tempo de processo, análise do fator sensibilidade e produtividade para cada parâmetro do processo comparado com o modelo proposto para coluna de comprimento 0,75 m ($\phi = 99,27$ e $t = 77$ horas):

Parâmetros	Q _{ads} (C/Co=1) Coluna Industrial L= 0,75 m		Parâmetros Modificados (+25%)		Sensibili- dade (S)	Produtividade das colunas	
	$\theta=0,1$ m	$\theta=0,2$ m	ϕ	Tempo (horas)		$\theta=0,1$ m	$\theta=0,2$ m
porosidade (ϵ)	$1,54 \times 10^{-3}$	$6,16 \times 10^{-3}$	99,06	45,96	$-8,46 \times 10^{-3}$	$3,35 \times 10^{-5}$	$1,34 \times 10^{-4}$
concentração inicial (Co) (mol/m ³)	$2,13 \times 10^{-3}$	$8,51 \times 10^{-3}$	99,29	64,31	$+8,06 \times 10^{-4}$	$3,31 \times 10^{-5}$	$1,32 \times 10^{-4}$
comprimento (L) (m)	$2,55 \times 10^{-3}$	$1,02 \times 10^{-2}$	99,33	98,05	$+2,42 \times 10^{-3}$	$2,57 \times 10^{-5}$	$1,04 \times 10^{-4}$
velocidade superficial (v) (m/h)	$2,04 \times 10^{-3}$	$8,16 \times 10^{-3}$	99,20	60,76	$-2,82 \times 10^{-3}$	$2,65 \times 10^{-5}$	$8,23 \times 10^{-5}$
constante de dispersão (E) (m ² /h)	$2,04 \times 10^{-3}$	$8,16 \times 10^{-3}$	99,27	77,00	0	$2,65 \times 10^{-5}$	$8,23 \times 10^{-5}$
diâmetro da coluna (θ) (m)	$3,19 \times 10^{-3}$	$1,28 \times 10^{-2}$	99,27	77,00	0	$4,14 \times 10^{-5}$	$8,23 \times 10^{-5}$
constante de taxa (k_1) (m ³ /mol h)	$2,11 \times 10^{-3}$	$8,46 \times 10^{-3}$	99,34	80,27	$+2,82 \times 10^{-3}$	$2,63 \times 10^{-5}$	$8,51 \times 10^{-5}$
constante de taxa (k_2) (1/h)	$1,63 \times 10^{-3}$	$7,77 \times 10^{-3}$	99,25	73,08	$-8,63 \times 10^{-3}$	$2,23 \times 10^{-5}$	$1,06 \times 10^{-4}$
quant. máx. adsorvida (Q _m) - (mol/m ³)	$2,55 \times 10^{-3}$	$1,01 \times 10^{-3}$	99,26	95,83	$-4,02 \times 10^{-4}$	$3,32 \times 10^{-5}$	$1,06 \times 10^{-5}$
difusividade (D) (m ² /h)	$2,04 \times 10^{-3}$	$8,16 \times 10^{-3}$	99,27	77,00	0	$2,65 \times 10^{-5}$	$1,06 \times 10^{-4}$
coeficiente global de TM (K) - (m/h)	$2,04 \times 10^{-3}$	$8,16 \times 10^{-3}$	99,27	77,00	0	$2,65 \times 10^{-5}$	$1,06 \times 10^{-4}$
diâmetro da resina (dp) (m)	$2,04 \times 10^{-3}$	$8,16 \times 10^{-3}$	99,27	77,00	0	$2,65 \times 10^{-5}$	$1,06 \times 10^{-4}$

Q_{ads} (L=0,75 m e $\theta = 0,1$ m) = $2,04 \times 10^{-3}$ mol enz e

Q_{ads} (L=0,75 m e $\theta = 0,2$ m) = $8,16 \times 10^{-3}$ mol enz

P(produtividade) = mol enz/h

V - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem que sejam tiradas as seguintes conclusões:

-o aplicativo desenvolvido consistindo do método numérico das diferenças finitas implícitas de Crank-Nicholson para a resolução da equação diferencial parcial resultante do balanço de massa na coluna, combinado com o método numérico de Runge-Kutta de quarta ordem para resolução da equação diferencial ordinária representando a cinética de adsorção, mostrou ser confiável e promoveu bom ajuste em relação aos dados experimentais, usando a porosidade do leito como fator de ajuste.

-o estudo paramétrico e de sensibilidade usando a eficiência da coluna como parâmetro de medição, mostrou que a operação da coluna de afinidade é bastante estável e que uma alteração em até 25% pouco altera a eficiência da coluna.

-dos estudos paramétricos pode se concluir ainda que a escolha e preparação da resina deve ser criteriosa para favorecer o aumento de Q_m (a quantidade máxima de produto a ser adsorvido por unidade de resina) e as condições de adsorção (pH, temperatura, tampão, força iônica, etc) devem ser otimizadas previamente a fim de diminuir a constante de equilíbrio K_d (igual a k_2/k_1), pois estes parâmetros influem na eficiência das colunas.

-um estudo de limitações do processo, mostrou que a coluna opera sob limitação da reação bioquímica de afinidade, de forma que os problemas de resistências à transferência de massa, assim como de dispersão axial, podem ser desprezados. O fato da dispersão axial poder ser desprezada implica que a coluna opera praticamente como um reator tubular ideal.

-no estudo de ampliação de escala, mostrou-se que a operação não é afetada. A ampliação no sentido radial é bastante aceitável por não afetar a eficiência do processo e aumentar a produtividade; no sentido longitudinal também merece ser considerada, pois aumenta a eficiência da coluna.

-a modelagem e simulação de colunas de adsorção por afinidade mostraram ser instrumentos úteis e poderosos de previsão do comportamento de colunas tanto em escala de laboratório como industrial. Sua utilização implica em ganhos consideráveis tanto em tempo quanto em custos materiais.

VI - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Fazer determinações práticas e cinéticas do processo de adsorção de outras proteínas, levando em consideração que as condições de adsorção devem ser otimizadas como indicadas neste trabalho.

Levantamento de dados práticos variando as condições de operação e geometria da coluna para que se possa fazer uma comparação com o predito pelo modelo e metodologia desenvolvido.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARVES, B. H. & LIAPIS, A. I. - Modelling and analysis of biospecific adsorption in a finite bath. Aiche Journal. 33(2): 179-91, feb. 1987.
- ARVES, B. H. & LIAPIS, A. I. - Modelling and analysis of elution stage of biospecific adsorption in a finite bath. Biotech. Bioeng. 31: 240-49, 1988.
- CHASE, H. A. - Prediction of performance of preparative affinity chromatography. J. Chromatography. 297: 179-202, 1984(a).
- CHASE, H. A. - Affinity separations utilising immobilised monoclonal antibodies - a new tool for the biochemical engineer., Chem. Eng. Science. 39 1099-1125, 1984(b).
- COLLINS, C. H. & BRAGA, G. L. - Introdução a métodos cromatográficos. Campinas, Ed. da UNICAMP, 4ª edição, 1990.
- COWAN, G. H.; GOSLING, I. S.; LAWS, J. F.; SWEETENHAM, W. P. - Physical and mathematical modelling to aid scale-up of liquid chromatography. J. Chromatography 363: 37-56, 1986.
- COWAN, G. H.; GOSLING, I. S.; SWEETENHAM, W. P. - Modelling for scale-up and optimisation of packed-bed columns in adsorption and chromatography., In: VERRALL, M. S. & HUDSON, M. J., ed. Separations for biotechnology. Ellis Horwood Ltd., cap.10, p. 152-75, 1987.
- DWIVEDI, P. N. & UPADHYAY, S. N. - Particle-fluid mass transfer in fixed and fluidized beds. Ind. Eng. Chem., Process Des. Dev., 16(2), 1977.
- HIMMELBLAU, D. M. & BISCHOFF, K. B. - Process analysis and simulation: deterministic systems. Jonh Willey & Sons, 1968.

- HORSTMANN, B. J. & CHASE, H. A. - Modelling the affinity adsorption of immunoglobulin G to protein A immobilised to agarose matrices. Chem. Eng. Re. Des., 67: 243-254, may 1989.
- HORSTMANN, B. J.; KENNEY, C. N.; CHASE, H. A. - Adsorption of proteins on sepharose affinity adsorbents of varying particle size. J. Chromatography 361:179-190, 1986.
- LIAPIS, A. I. - Modelling and analysis of bioespecific adsorption process. 32^o IUPAC Congress. Stockholm, Sweden, 2-7, aug. 1989.
- LIAPIS, A. I.; ANSPACH, B.; FINDLEY, M. E.; DAVIE, J.; HEARN, M. T.W.; UNGER, K. K. - Bioespecific adsorption of lysozyme onto monoclonal antibody ligand immobilized on nonporous silica particles, Biotech. Bioeng. 34: 467-477, 1989.
- PHARMACIA LKB BIOTECNOLOGY - Affinity chromatography-Principles and Methods- (código: 18-1022-29).(a)
- PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY - Bio-process media (Selection guide).(b)
- RODRIGUES, M. I. - Modelagem, simulação e controle de um processo contínuo de purificação de enzimas. Campinas, 1993. Tese de doutorado - Fac. Eng. Alim. - Universidade Estadual de Campinas.
- SOUZA, E. S. - Modelagem e simulação de um reator contínuo com reciclo da enzima para produção " *in vitro* " de dextrana. Campinas, 1993. Tese de mestrado - Fac. Eng. Alim. - Universidade Estadual de Campinas.
- YANG, C-M. & TSAO, G. T. - Affinity chromatography.- Advances in biochemical engineering (FIECHTER, A.),25:19-42, 1982(a).

YANG, C-M. & TSAO, G. T. - Packed-bed adsorption theories and their applications to affinity separations - Advances in biochemical engineering (FIECHTER, A.), 25:1-18, 1982(b).