

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ENGENHARIA DE PROCESSOS

**“nd ADSORÇÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO EM
RESINAS TROCADORAS DE ÍONS”**

MARIANA DE OLIVEIRA DIAS ARAUJO
Engenheira Química

Prof. Dr. CESAR COSTAPINTO SANTANA
Orientador

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

Campinas - SP

1996



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	Ar15a
V. E.	
TOMBO b3	27748
PRUC.	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/05/96
N.º CPDC	M.00028574-4

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

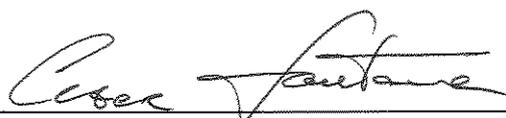
Ar15a	<p>Araujo, Mariana de Oliveira Dias</p> <p>Adsorção de albumina de soro bovino em resinas trocadoras de íons / Mariana de Oliveira Dias Araujo.-- Campinas, SP: [s.n.], 1996.</p> <p>Orientador: Cesar Costapinto Santana. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.</p> <p>1. Adsorção. 2. Resinas. 3. Proteínas. 4. Troca iônica. I. Santana, Cesar Costapinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.</p>
-------	---

Esta versão corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela Eng^a Mariana de Oliveira Dias Araujo e aprovada pela banca examinadora em 24 de abril de 1996.



Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

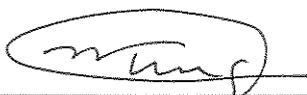
Dissertação defendida e aprovada, em 24 de abril de 1996, pela banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana
Orientador



Prof.^a Dr.^a Jane Sélia dos Reis Coimbra



Prof. Dr. Satoshi Tobinaga

A meus pais pela ajuda e incentivo.
A José Vicente pelo carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Cesar Costapinto Santana pela orientação e otimismo ao longo de todo o trabalho.

Ao técnico Pompeo pela colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

Às alunas de Iniciação Científica, Marcia e Camile, pela ajuda na realização do presente trabalho.

Aos colegas, José Antônio e Fábio, pelo desenvolvimento do método computacional utilizado na modelagem matemática abordada no trabalho.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos os amigos, colegas e professores que direta ou indiretamente contribuíram na execução deste trabalho.

A Elvira e Luiz Mário pela acolhida assim que cheguei aqui em Campinas.

A Rosana pelo convívio e paciência durante todo o tempo em que moramos juntas.

A José Vicente pelo apoio em todos os momentos.

A toda minha família que eu amo tanto e sempre me apoiou, mesmo tão distante.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
NOMENCLATURA.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Características Gerais das Proteínas.....	3
2.1.1. Estrutura das Proteínas.....	3
2.1.2. Função das Proteínas.....	5
2.2. Separação de Proteínas.....	6
2.2.1. Fundamentos para a Separação.....	6
2.2.2. Técnicas utilizadas para a Separação.....	8
2.3. Adsorção em Matrizes Sólidas.....	9
2.3.1. Aspectos Gerais dos Processos Cromatográficos.....	10
2.3.2. Os Procedimentos Cromatográficos.....	12
2.3.3. Adsorção em Resinas Trocadoras de Íons.....	12
2.4. Isotermas de Adsorção: Estudo do Equilíbrio de Fases.....	13
2.4.1. Adsorção em Tanques Agitados.....	14
2.4.2. Adsorção em Colunas.....	15
2.4.2.1. Adsorção em leitos fixos.....	15
2.4.2.2. Adsorção em leitos fluidizados.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Materiais/Preparações.....	18
3.1.1. Adsorbato.....	18
3.1.2. Adsorventes.....	18
3.1.3. Tampão.....	19
3.1.4. Preparação da solução tampão.....	19

3.1.5. Preparação das soluções de BSA	20
3.2. Calibrações	20
3.2.1. Curvas de calibração do espectrofotômetro.....	20
3.2.2. Bomba peristáltica.....	23
3.2.3. Registrador	24
3.2.4. Sistema em estudo	24
3.3. Metodologias Experimentais	27
3.3.1. Experimentos em Tanques Agitados.....	27
3.3.1.1. Sistema com monitoramento contínuo	27
3.3.1.2. Sistema com monitoramento não-contínuo.....	28
3.3.1.3. Testes de equilíbrio.....	30
3.3.2. Experimentos em Colunas de Adsorção.....	31
3.3.2.1. Testes de expansão do leito	31
3.3.2.2. Corridas de adsorção	33
3.4. Equipamentos e Materiais utilizados	35
3.4.1. Equipamentos.....	35
3.4.2. Materiais: vidraria e diversos.....	36
4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS: ANÁLISES E DISCUSSÕES.....	37
4.1. Experimentos em Tanques Agitados.....	37
4.2. Experimentos em Coluna de Adsorção	52
5. MODELAGEM MATEMÁTICA DA TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM TANQUES AGITADOS.....	67
5.1. Formulação Matemática.....	67
5.2. Solução do modelo	71
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	81
6.1. Conclusões.....	81
6.2. Sugestões	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural geral de um polipeptídeo (tetrapeptídeo) típico que constitui as proteínas.....	4
Figura 2: Estruturas fundamentais das proteínas.....	5
Figura 3: Fenômenos de transferência de massa numa partícula porosa.....	10
Figura 4: Esquema que mostra a vantagem da utilização da cromatografia em leiteo fluidizado.....	12
Figura 5: Representação esquemática dos passos na adsorção em leito expandido.....	16
Figura 6: Curva de Calibração de BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	21
Figura 7: Curva de Calibração de BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	21
Figura 8: Curva de Calibração de BSA em tampão Tris 0,05 mol/l pH= 7,0.....	22
Figura 9: Curva de Calibração de BSA em tampão Tris 0,2 mol/l pH= 7,0.....	22
Figura 10: Curva de Calibração de BSA em tampão Tris 0,01 mol/l pH= 7,0.....	23
Figura 11: Curva de Calibração do sistema utilizando o tampão Tris 0,02 mol/l pH=7,0 para a preparação das soluções de BSA.....	25
Figura 12: Curva de Calibração do sistema utilizando o tampão Tris 0,03 mol/l pH=7,0 para a preparação das soluções de BSA.....	26
Figura 13: Montagem utilizada nos experimentos em tanque agitado - sistema com monitoramento contínuo.	30
Figura 14: Montagem utilizada nos experimentos em coluna de adsorção: leitos fixo e fluidizado.....	33

Figura 15: Curvas cinéticas obtidas para várias concentrações iniciais de BSA. Sistema: Q-Sepharose Fast Flow/BSA em tampão Tris 0,2 mol/l pH= 7,0.....	37
Figura 16: Curvas cinéticas obtidas para várias concentrações iniciais de BSA. Sistema: Q-Sepharose Fast Flow/BSA em tampão Tris 0,01mol/l pH= 7,0.....	38
Figura 17: Curvas cinéticas obtidas para várias concentrações iniciais de BSA. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	40
Figura 18: Curvas cinéticas obtidas para várias concentrações iniciais de BSA. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	40
Figura 19: Curvas cinéticas obtidas para uma dada concentração inicial da solução de BSA nos tampões especificados acima, com pH= 7,0 e a resina Accell Plus QMA	42
Figura 20: Isotermas de adsorção para o sistema Q-Sepharose Fast Flow/BSA nos referidos tampões com pH= 7,0.....	45
Figura 21: Isotermas de adsorção para o sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	47
Figura 22: Isotermas de adsorção para o sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	49
Figura 23: Isoterma de adsorção para o sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,05 mol/l pH= 7,0.....	51
Figura 24: Isotermas de adsorção para o sistema Accell Plus QMA/BSA nos referidos tampões com pH= 7,0. (resultados dos testes de equilíbrio).....	52
Figura 25: Teste de expansão do leito realizado com a bomba peristáltica.....	53
Figura 26: Teste de expansão do leito realizado com a bomba de pistão.....	53
Figura 27: Curva de <i>breakthrough</i> obtida para leito fixo (h= 3,4 cm). Solução de BSA com concentração inicial igual à 0,50 mg/ml.....	55

Figura 28: Curvas de <i>breakthrough</i> obtidas para diferentes alturas do leito. Solução de BSA com concentração inicial igual à 1,00 mg/ml	55
Figura 29: Curvas de <i>breakthrough</i> obtidas para diferentes alturas do leito. Solução de BSA com concentração inicial igual à 1,50 mg/ml	56
Figura 30: Curvas de <i>breakthrough</i> obtidas para diferentes alturas do leito. Solução de BSA com concentração inicial igual à 2,00 mg/ml	56
Figura 31: Curvas de <i>breakthrough</i> obtidas para diferentes alturas do leito. Solução de BSA com concentração inicial igual à 3,00 mg/ml	57
Figura 32: Curvas de <i>breakthrough</i> obtidas para diferentes alturas do leito. Solução de BSA com concentração inicial igual à 4,00 mg/ml	57
Figura 33: Determinação do equilíbrio por análise frontal.....	59
Figura 34: Isotermas de adsorção obtidas na coluna com leitos fixo e fluidizado. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	61
Figura 35: Isotermas de adsorção obtidas na coluna e no sistema contínuo. Sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	62
Figura 36: Curva <i>breakthrough</i> - definição do tempo estequiométrico, $(t_{st})_{teo}$	62
Figura 37: Curva <i>breakthrough</i> - determinação do tempo estequiométrico, $(t_{st})_{exp}$	65
Figura 38: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_o = 1,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	72
Figura 39: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_o = 2,00$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	73
Figura 40: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_o = 3,00$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	73

Figura 41: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 3,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	74
Figura 42: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 4,00$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	74
Figura 43: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 4,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	75
Figura 44: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 1,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	75
Figura 45: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 2,00$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	76
Figura 46: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 2,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	76
Figura 47: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 3,00$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	77
Figura 48: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 3,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	77
Figura 49: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 4,00$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	78
Figura 50: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 4,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	78

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Resumo de resultados recentes sobre adsorção de proteínas com resinas trocadoras de íons em leitos fluidizados	11
Tabela 2: Dados das massas do adsorvente Q-Sepharose Fast Flow utilizadas nos experimentos do sistema com monitoramento não contínuo	43
Tabela 3: Dados utilizados para a construção da isoterma de adsorção do sistema Q-Sepharose Fast Flow/BSA em tampão Tris 0,2 mol/l pH= 7,0	44
Tabela 4: Dados utilizados para a construção da isoterma de adsorção do sistema Q-Sepharose Fast Flow/BSA em tampão Tris 0,01 mol/l pH= 7,0	44
Tabela 5: Valores obtidos para os parâmetros q_m e k_d . Sistema: Q-Sepharose Fast Flow/BSA.....	46
Tabela 6: Dados utilizados para a construção das isotermas de adsorção do sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	47
Tabela 7: Valores obtidos para os parâmetros q_m e k_d . Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	48
Tabela 8: Dados utilizados para a construção das isotermas de adsorção do sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	49
Tabela 9: Valores obtidos para os parâmetros q_m e k_d . Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	50
Tabela 10: Dados utilizados para a construção das isotermas de adsorção do sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,05 mol/l pH= 7,0.....	50
Tabela 11: Valores obtidos para os parâmetros q_m e k_d . Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,05 mol/l pH= 7,0	51

Tabela 12a: Dados de volume final injetado (V_f) e da área sob a curva. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	59
Tabela 12b: Dados de volume final injetado (V_f) e da área sob a curva. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	60
Tabela 13: Dados da quantidade de proteína adsorvida por massa de adsorvente, q^* . Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	60
Tabela 14: Valores obtidos para os parâmetros q_m e k_d . Sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0 - coluna de adsorção.....	61
Tabela 15: Dados necessários para o cálculo de $(t_{st})_{teo}$. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0 - coluna de adsorção (leito fixo).....	64
Tabela 16: Dados necessários para o cálculo de $(t_{st})_{exp}$. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0 - coluna de adsorção	66
Tabela 17: Valores do tempo estequiométrico teórico e experimental. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0 - coluna de adsorção com leito fixo	66
Tabela 18: Dados dos parâmetros k_f e D_{ef} obtidos através da modelagem. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.....	79
Tabela 19: Dados dos parâmetros k_f e D_{ef} obtidos através da modelagem. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.....	79

NOMENCLATURA

A = área da seção transversal da coluna (cm^2)

Bi_m = número de Biot de massa definido pela equação (31)

C = concentração de proteína na solução (mg/ml)

c^* = concentração do soluto na fase líquida em equilíbrio (mg/ml)

c_b = concentração global de proteína na fase líquida (mg/ml)

c_i = concentração de proteína na fase líquida nos poros da partícula (mg/ml)

c_{i0} = concentração de proteína na saída da coluna quando o equilíbrio é atingido (mg/ml)

c_o = concentração inicial da solução de proteína (mg/ml)

D_{ef} = coeficiente de difusão nos poros da partícula (m^2/s)

F = vazão volumétrica da solução de proteína (ml/min)

h = altura do leito (cm)

k_1 = constante cinética de adsorção ($\text{ml/mg}\cdot\text{min}$)

k_2 = constante cinética de dessorção (min^{-1})

k_d = constante de dissociação (mg/ml)

k_f = coeficiente de transferência de massa na película líquida (m/s)

m_{ads} = massa de adsorvente (g)

q^* = quantidade de soluto adsorvido por unidade de massa de adsorvente (mg/g de ads)

q_i = concentração de proteína na fase sólida (mg/ml)

q_{i0} = concentração de proteína na fase sólida em equilíbrio com c_{i0} (mg/ml)

q_m = quantidade máxima adsorvida na fase sólida (mg/g de ads)

R = raio da partícula (m)

r = variável espacial (radial) (m)

T = tensão lida no multímetro (mV)

t = variável temporal (min)

t^* = tempo onde C é igual a c_{i0} na curva de *breakthrough* (min)

t_m = tempo morto do sistema (min)

t_{st} = tempo estequiométrico (min)

u_o = velocidade superficial do fluido (cm/min)

v = volume de adsorvente (ml)

V = volume do leito (cm³)

V_f = volume injetado até que C seja igual a c_o na solução efluente (ml)

V_l = volume de líquido (ml)

V_m = volume morto do sistema (ml)

V_{sol} = volume de solução (ml)

x = variável espacial (radial) adimensional

Símbolos Gregos:

ρ = massa específica do fluido (g/cm³)

ε = porosidade do leito

τ = variável temporal adimensional

τ^* = parâmetro de tempo definido pela equação (9) (min)

ρ_{ads} = massa específica do adsorvente (g/cm³)

ξ_m = fator de capacidade definido pela equação (10)

ε_p = porosidade da partícula

RESUMO

Foram adotadas duas técnicas experimentais para a determinação da isoterma de adsorção de proteínas em solução líquida utilizando-se resinas macroporosas trocadoras de íons como sólido adsorvente. Uma das técnicas, denominada de experimentos em tanques agitados, permitiu obter dados sobre a cinética de adsorção e também as isotermas de equilíbrio para dois adsorventes, ambos contendo grupos do tipo amino quaternário, na adsorção da proteína Albumina de Soro Bovino. A segunda técnica, denominada de experimentos em colunas de adsorção, permitiu obter as curvas do tipo *breakthrough* e conseqüentemente a isoterma de equilíbrio para apenas um dos adsorventes na adsorção da mesma proteína.

O tratamento matemático das isotermas através do modelo de Langmuir conduziu aos dois parâmetros do modelo para uma temperatura de 24° C para o sistema Albumina de Soro Bovino (BSA) e as resinas de troca iônica Q-Sepharose® Fast Flow e Accell® Plus QMA. Foram analisados dois níveis de força iônica do tampão Tris(hidroximetil)aminometano para cada uma das resinas.

A modelagem matemática das curvas cinéticas obtidas permitiu otimizar os parâmetros que exprimem a convecção externa e a difusão interna às partículas para os experimentos em tanques agitados para o sistema BSA-Accell Plus QMA.

As curvas de *breakthrough* obtidas para o sistema BSA-Accell Plus QMA indicaram um comportamento similar para colunas operando em leito fixo e em leitos fluidizados. Nos experimentos em leito fixo, foi obtido o parâmetro tempo estequiométrico, que possui importância na interpretação da adsorção com relação ao balanço de massa e à ampliação de escala do processo.

ABSTRACT

Two different experimental techniques were studied aiming the determination of adsorption isotherms of proteins in liquid solutions by using macroporous adsorbents solids. One of the techniques, named stirred tank experiments, allowed to study the kinetics of adsorption and the equilibrium isotherms for two adsorbents based quaternary amino groups working with Bovine Serum Albumin (BSA), as a model protein. The second technique, named breakthrough curve experiments, allowed also get the equilibrium isotherm for the same system.

The mathematical treatment using non-linear regression for the Langmuir model isotherm led to the two parameters of the isotherm for the temperature of 24° C for the systems containing BSA and the anionic resins Q-Sepharose® Fast Flow and Accell® Plus QMA. Two different levels of ionic strength of the buffer Tris(hydroxymethyl)aminomethane were analyzed in the experiments.

The mathematical modeling of the adsorption kinetics allowed to optimize the mass transfer parameters described by the phenomena of internal diffusion and external convection for the system BSA-Accell Plus QMA.

The breakthrough curves for the experiments with fixed and fluidized beds have similar behaviour. The parameter stoichiometric time obtained from the column experiments is important to describe the mass balance in the column, helping the scale-up of the process.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Dentre os bioprodutos resultantes da indústria biotecnológica destacam-se as proteínas por suas propriedades enzimáticas e terapêuticas. Essas proteínas podem ser obtidas a partir de diversas fontes como extratos biológicos e processos como a fermentação. Elas se constituem em compostos macromoleculares, formados pela associação de aminoácidos e possuem pesos moleculares que podem variar de alguns milhares até a ordem de alguns milhões de daltons (1 dalton = 1 unidade de massa atômica = $1,66 \cdot 10^{-24}$ g). As necessidades recentes de isolamento e recuperação em grande escala desses compostos, têm trazido inovações importantes nas operações unitárias necessárias para os esquemas de tratamento e purificação de proteínas, envolvendo em geral, uma seqüência extensiva de etapas, o que acarreta custos elevados (Wheelwright, 1991).

Devido à natureza poliiônica das proteínas, resultante dos grupos ionizáveis dos aminoácidos que as originaram, algumas técnicas de separação e purificação utilizam princípios que se baseiam em interações com esses grupos dotados de cargas elétricas. Uma dessas técnicas é conhecida como Cromatografia de Troca Iônica (CTI), sendo utilizada como método usual em laboratório (Scopes, 1987), bem como nos processos em maior escala para separação e purificação de albumina de sangue (Curling, 1980) e proteínas do soro de queijo (Skudder, 1983).

Os esquemas experimentais de purificação de proteínas freqüentemente contêm uma grande seqüência de passos que aumentam o custo e a perda de material. A grande maioria desses esquemas envolve líquidos que contêm traços de material particulado que impedem a utilização do sistema de leito fixo (ou coluna empacotada). Em geral, quanto menor o número de operações em um processo, mais eficiente ele será, com maior redução nos custos e menor perda de material. Desta forma, o leito fluidizado é de grande interesse para a indústria de bioprodutos, uma vez que com este sistema de adsorção pode-se trabalhar com líquidos que contenham material particulado, sem a

necessidade da remoção prévia deste, dispensando assim, vários passos de purificação (Chase, 1994; *Pharmacia Publication*, 1995). Esse sistema de adsorção só recentemente vem sendo empregado na separação/purificação de proteínas e a sua otimização requer um entendimento da hidrodinâmica do líquido e da partícula no leito, bem como das características de transferência de massa e equilíbrio do adsorvente (Draeger e Chase, 1990).

No presente trabalho, foram utilizados dois diferentes métodos para avaliar a adsorção de uma dada proteína em resinas trocadoras de íons. Foi escolhida a proteína modelo Albumina de Soro Bovino que foi largamente utilizada em trabalhos pioneiros envolvendo processos de recuperação dessa substância. Os métodos utilizados foram: experimentos em tanques agitados e em colunas de adsorção com leitos fixo e fluidizado. O primeiro método tem por objetivo a determinação dos parâmetros essenciais para o estudo do processo de adsorção, ou seja: a isoterma e a cinética de adsorção. O segundo é uma técnica para a determinação das características fluidodinâmicas e de transferência de massa de um dado sistema proteína-adsorvente. No segundo método foram estudados os seguintes aspectos: expansão do leito de partículas em função da velocidade do fluido e a determinação da capacidade de adsorção no leito através da obtenção da curva de concentração de proteína na saída dada em função do volume de solução de proteína injetada.

Para a execução do presente trabalho, foram realizadas algumas calibrações descritas no Capítulo 3, juntamente com as metodologias utilizadas. Os resultados experimentais obtidos encontram-se no Capítulo 4. Através deles, pôde-se medir a capacidade de adsorção dos adsorventes utilizados, avaliando-se o seu desempenho. Uma modelagem matemática implementada num programa computacional foi usada para ajustar o modelo às curvas cinéticas experimentais de um dado sistema proteína-adsorvente.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO DA LITERATURA

Para facilitar o estudo da adsorção de Albumina de Soro Bovino em resinas trocadoras de íons, a revisão da literatura foi dividida em quatro partes: características gerais das proteínas; separação de proteínas, incluindo também as técnicas utilizadas para separação; adsorção em matrizes sólidas e discussão do equilíbrio de fases através das isothermas de adsorção.

2.1. Características Gerais das Proteínas

2.1.1. Estrutura das Proteínas

Proteínas são os principais componentes dos sólidos totais de organismos vivos e são compostas de polímeros de aminoácidos, possuindo cadeias longas. A maior parte das proteínas contém os 20 aminoácidos principais: alanina, valina, prolina, leucina, etc, formando cadeias de até várias centenas de aminoácidos. Cada aminoácido é distinguido por uma cadeia característica lateral que pode ser apolar (hidrofóbica), polar carregada (hidrofilica) ou polar não carregada. A Figura 1 mostra a fórmula estrutural geral de um polipeptídeo (tetrapeptídeo) típico que constitui as proteínas e que determina as estruturas fundamentais das mesmas que são discutidas a seguir e que se encontram esquematizadas na Figura 2, de acordo com a classificação seguinte (catálogo intitulado como *Guide to Protein Separations* da Rainin Instrument Co. Inc.):

- Estrutura Primária

Os aminoácidos individuais são acoplados pela ligação peptídica, que une um grupo amina a um grupo carboxila de outro aminoácido, formando uma cadeia que é denominada de estrutura primária da proteína.

- Estrutura Secundária

Um arranjo regular e recorrente das cadeias polipeptídicas ao longo de uma dimensão espacial como uma hélice tipo α ou uma folha plissada determina a estrutura secundária da proteína.

- Estrutura Terciária

O enovelamento das cadeias polipeptídicas forma uma estrutura mais compacta que é característica das proteínas globulares. A estrutura terciária é criada pelas interações específicas entre os diferentes resíduos de aminoácidos, usualmente nas regiões das cadeias laterais, causadas por uma variedade de forças, incluindo as ligações por pontes de hidrogênio, dissulfeto e interações de Van Der Waals (hidrofóbicas), além de interações eletrostáticas.

- Estrutura Quaternária

O arranjo de cadeias polipeptídicas em múltiplas cadeias compostas de sub-unidades é provocado por interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e pontes iônicas entre os aminoácidos na superfície das sub-unidades de polipeptídeos. Essas estruturas quaternárias podem também ser formadas por ligações covalentes como as do tipo dissulfeto.

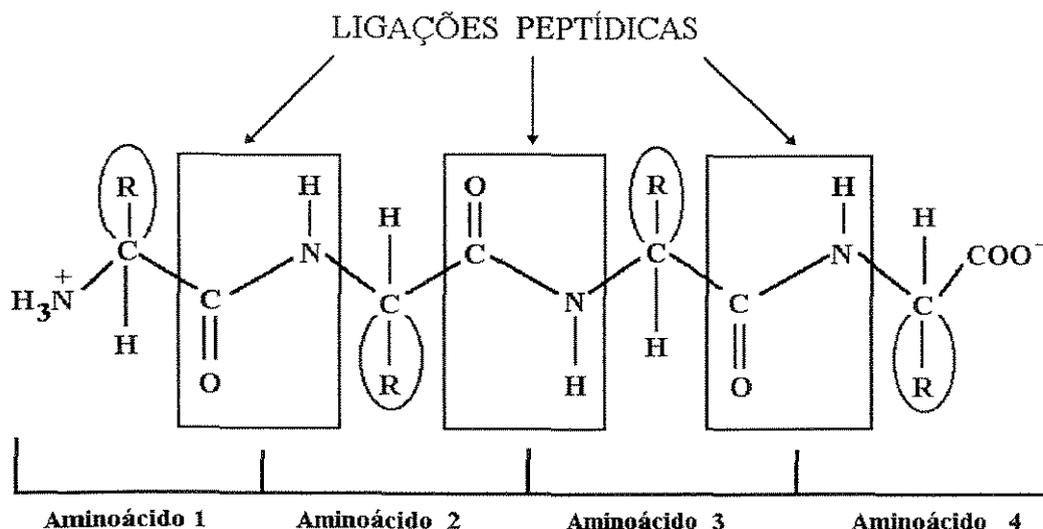


Figura 1: Fórmula estrutural geral de um polipeptídeo (tetrapeptídeo) típico que constitui as proteínas. (Referência: catálogo intitulado como *Guide to Protein Separations* da Rainin Instrument Co. Inc.)

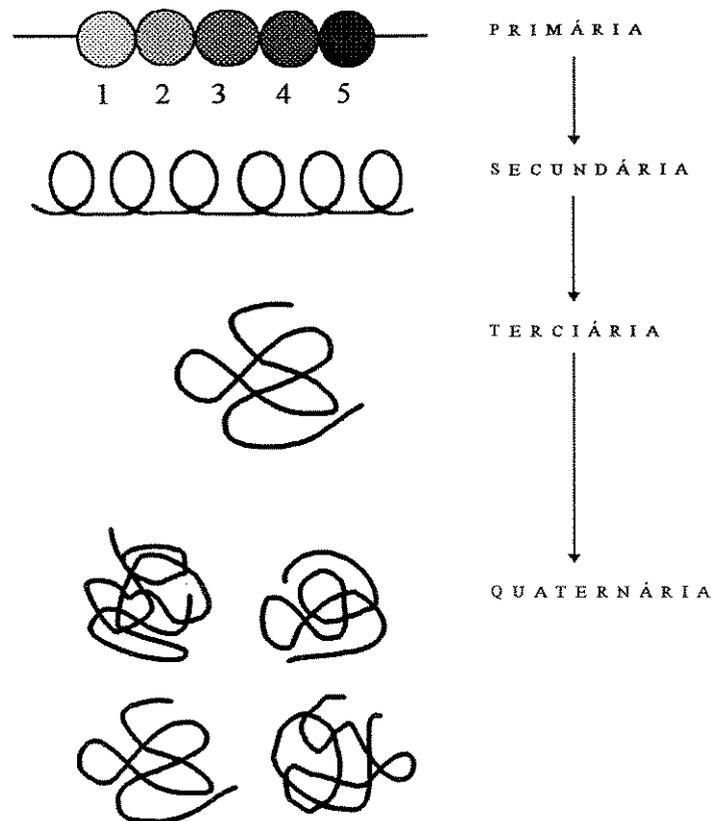


Figura 2: Estruturas fundamentais das proteínas. (Referência: catálogo intitulado como *Guide to Protein Separations* da Rainin Instrument Co. Inc.)

2.1.2. Função das Proteínas

A conformação global da proteína é uma combinação das estruturas acima mencionadas, sendo ditada pela seqüência primária de aminoácidos. A função das proteínas está intimamente ligada à sua estrutura. A grande diversidade de estruturas dá origem aos diversos tipos de funções, sendo alguns exemplos dados a seguir.

- Metabolismo: enzimas, hormônios, toxinas.
- Estrutura: colágeno, elastina, proteínas das membranas.
- Armazenamento: caseína, ovalbumina.
- Transporte: hemoglobina, albumina.
- Mobilidade: miosina, actina.
- Defesa: anti-corpos.

A estrutura nativa de uma proteína deve ser mantida sem modificação para preservar sua função biológica. Desde que proteínas são altamente sensíveis à mudanças no meio, desvios de condições fisiológicas podem afetar a conformação da proteína e causar desnaturação. Fatores como pH, temperatura, força iônica, entre outros, podem afetar a atividade da proteína. O pH deve ser mantido tão perto quanto possível do encontrado no ambiente natural da proteína. A maioria das proteínas são praticamente estáveis a temperaturas abaixo de 40° C.

A tarefa de separar e purificar proteínas individuais é dificultada pela fragilidade das estruturas proteicas no que se refere à perda de atividade biológica (desnaturação) e também pelo fato de que qualquer tipo de célula pode conter milhares de proteínas além de ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos e outros componentes. Considerando porém a combinação de técnicas clássicas de separação, acopladas a modernos métodos cromatográficos de alta resolução e a técnicas eletroforéticas, é possível atingir níveis de purificação bastante elevados (Sofer e Nystrom, 1989).

2.2. Separação de Proteínas

2.2.1. Fundamentos para a Separação

Diferenças nas propriedades físicas, químicas e funcionais das proteínas fornecem as bases para a classificação e separação das mesmas. As principais propriedades exploradas visando a separação são descritas a seguir.

- Tamanho

O peso molecular das proteínas varia numa faixa bastante elevada. Por exemplo, a insulina possui um peso molecular de 5.700 daltons enquanto a hemocianina tem peso molecular de 6.700.000 daltons. O peso molecular médio da maioria das proteínas está, no entanto, compreendido na faixa de 40.000 à 80.000 daltons, sendo as proteínas maiores compostas geralmente de sub-unidades. A proteína globular hemoglobina, que consiste de 574 aminoácidos em 4 cadeias com peso molecular total de 64.500 é dobrada com forma aproximadamente esférica com diâmetro de 64 Angstroms. Como comparação, um aminoácido simples como a alanina tem aproximadamente 5 Angstroms de comprimento.

- Forma

A forma das proteínas pode variar desde a linear (proteínas fibrosas) até a forma aproximadamente esférica (proteínas globulares). Essa propriedade é altamente influenciada pelos aspectos físicos e químicos do ambiente onde se encontra a proteína, tal como o pH.

- Carga

Levando-se em conta que todas as proteínas contêm terminais amino e carboxílicos além de muitas cadeias laterais carregadas, as soluções proteicas possuem comportamento ácido-base. A carga líquida das proteínas depende fortemente do pH do meio. Num pH característico em que as cargas positivas e negativas se cancelam, a proteína se encontra no ponto isoelétrico (pI). Para valores de pH superiores ao pI a proteína está negativamente carregada enquanto que para valores inferiores ao pI a proteína está positivamente carregada.

- Hidrofobicidade

O número, tipo e distribuição dos resíduos não polares de aminoácidos determina o caráter hidrofóbico da proteína. Em soluções aquosas, esses grupos hidrofóbicos estão frequentemente na região interna da proteína já que são repelidos pelas moléculas polares da água. A interação de cadeias laterais apolares com essas regiões hidrofóbicas é um fator importante na estabilização da estrutura da proteína e pode contribuir para outras interações pelo fato de prover um ambiente menos polar do que aquele obtido em solução.

- Solubilidade

Ao contrário dos grupos hidrofóbicos, a maior parte dos resíduos iônicos dos aminoácidos está localizada na superfície externa da molécula da proteína. A carga superficial contribui para a solubilidade das proteínas globulares tornando-as apropriadas para funções que exigem mobilidade e interação com o ambiente fisiológico. Cada proteína tem uma solubilidade distinta e característica e um ambiente definido e quaisquer mudanças nas condições (tipo de solvente ou de tampão, força iônica, temperatura) pode causar uma precipitação diferenciada.

- **Função**

A estrutura única de cada proteína determina a sua função ou atividade bem como a sua bioespecificidade na interação com outras moléculas. A estrutura nativa da proteína deverá estar intacta para uma interação funcional ocorrer e constitui a base dos métodos denominados de afinidade. É importante observar que as proteínas são também susceptíveis à clivagem da sua molécula, formando-se fragmentos menores de peptídeos num processo denominado de proteólise.

2.2.2. Técnicas utilizadas para a Separação

São numerosas as técnicas envolvidas na separação de proteínas, ocorrendo normalmente uma seqüência das mesmas quando se visa a obtenção de um produto final. A seguir, são apresentados alguns aspectos dessas principais técnicas e serão detalhados em parágrafos específicos os processos que utilizam a adsorção em matrizes sólidas.

- **Precipitação**

É um dos métodos mais antigos para a separação de proteínas, sendo que Scopes (1987) dedica especialmente o Capítulo 3 da sua obra a esse método de separação. Após a precipitação, as proteínas são geralmente separadas por centrifugação, podendo-se usar em alguns casos alternativamente a flotação (Miranda e Berglund, 1993; Santana, 1994). Pode-se distinguir entre os seguintes métodos de precipitação:

- precipitação por sais;
- precipitação com polieletrólitos;
- precipitação por solventes orgânicos;
- precipitação com polímeros não-iônicos;
- precipitação por afinidade em presença de substratos ou inibidores das moléculas a purificar;
- precipitação no ponto isoelétrico (a solubilidade da proteína é mínima nesse pH).

- Ultrafiltração e Osmose reversa

Com a utilização de uma membrana sintética de porosidade controlada (Flaschel et al., 1983), esse método permite a separação de espécies de tamanhos diferentes de molécula. Em geral essa técnica é mais apropriada para a separação de misturas contendo proteínas e pequenas moléculas, sendo que recentemente (Michaels, 1990) foram desenvolvidas membranas que conseguem separar proteínas que possuam pesos moleculares que difiram por um fator 2.

- Eletroforese

Amostras contendo as proteínas a serem separadas são colocadas em um campo elétrico que provoca o deslocamento das proteínas carregadas. O meio utilizado é geralmente um gel no qual o balanço entre a força motriz do campo elétrico e a força de retardamento viscosa conduz a uma velocidade de migração da proteína proporcional ao campo elétrico aplicado. Desse sistema resulta uma mobilidade eletroforética característica para cada proteína, o que permite que as mesmas sejam separadas. É possível aplicar às amostras campos elétricos em direções ortogonais fazendo com que a eletroforese ocorra num espaço bi-dimensional. Uma sofisticação dessa técnica é denominada de eletrofocalização e utiliza adicionalmente um gradiente de pH no gel de modo que as proteínas migrem até a região onde o pH seja igual ao ponto isoelétrico da mesma.

- Cristalização

É utilizada mais frequentemente para purificar uma proteína específica e não para separar misturas de proteínas.

- Extração líquido-líquido

Implica na distribuição de proteínas entre duas fases líquidas devido à solubilidade preferencial em cada fase. Vários sistemas podem ser utilizados, entre eles os constituídos por fluorcarbonetos (Asenjo,1990) e por tensoativos em solução orgânica (Michaels,1990).

2.3. Adsorção em Matrizes Sólidas

A adsorção ocorre quando um soluto dissolvido é ligado a um adsorvente sólido. Tanto a adsorção quanto a extração são processos usados para isolar solutos de

soluções diluídas. A adsorção tende a ter uma menor capacidade mas apresenta uma maior seletividade que a extração. Devido ao fato do equilíbrio ser não linear e das fortes interações do soluto, a adsorção é um processo que requer mais experimentos laboratoriais que a extração (Belter, 1988). Esse fenômeno (proveniente do contato entre adsorbato e adsorvente) envolve um número de passos distintos. Esses passos contribuem para a resistência à transferência de massa e incluem: transferência de massa da solução de adsorbato para a superfície externa da partícula de adsorvente (resistência à difusão na película líquida), difusão dentro dos poros da partícula (difusão nos poros ou resistência à difusão na partícula) e reação química na superfície da partícula (resistência à reação na superfície) (Horstmann e Chase, 1989). A Figura 3 mostra os fenômenos de transferência de massa numa partícula porosa (Carrère, 1993).

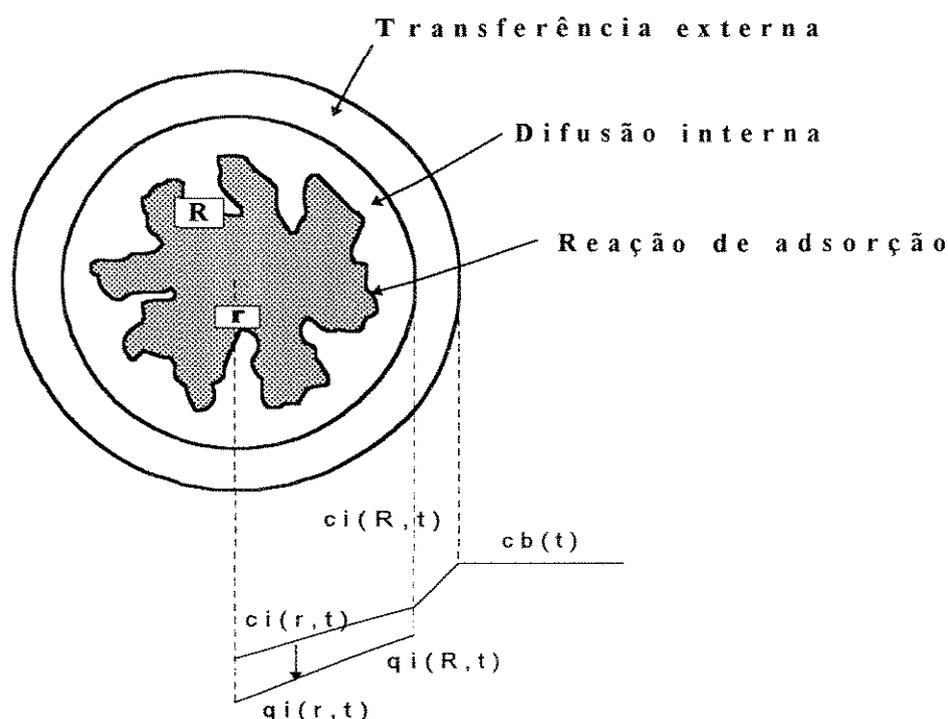


Figura 3: Fenômenos de transferência de massa numa partícula porosa (Carrère, 1993).

2.3.1. Aspectos Gerais dos Processos Cromatográficos

Um leito constituído pelas partículas de resinas sólidas percolado pelo líquido contendo as proteínas (coluna cromatográfica) é a principal forma de contato para a recuperação e separação desses compostos. A fase sólida é denominada fase

estacionária enquanto a fase que contém a mistura a ser separada é a fase móvel. O princípio de separação de uma mistura consiste na existência de interação entre os constituintes da mistura e a fase estacionária, fazendo com que cada uma das espécies a ser separada seja transportada com velocidades diferentes e trazendo como consequência a separação dos diversos constituintes.

A Tabela 1 resume um conjunto de sistemas biológicos para os quais foi aplicada recentemente e com sucesso a técnica de concentração e purificação de proteínas com uso de resinas como fase estacionária no caso especial em que o leito é fluidizado. Esse sistema de adsorção é especialmente vantajoso em situações em que o líquido que contém proteínas incorpora também material particulado, que é uma situação muito comum em separações biotecnológicas. A utilização de leitos fluidizados do tipo sólido-líquido se adapta bem a essa aplicação, pois sendo um sistema de porosidade global elevada não sofre o problema da colmatagem (entupimento do meio poroso), resultando na economia de uma operação de separação de particulados como a filtração ou centrifugação, por exemplo. Essa vantagem está esquematizada no diagrama de blocos da Figura 4.

Tabela 1: Resumo de resultados recentes sobre adsorção de proteínas com resinas trocadoras de íons em leitos fluidizados (*GBF, Scientific Report* 1992 e 1993; Hansson et al., 1994).

Produto	Organismo	Adsorvente	Rendimento(%)	Enriquecimento
Galactosidade	E. coli	DEAE Sepharose	90	5,5
Malate desidrogenase	E. coli	Blue Sepharose	80	3,4
Proteína de Fusão	E. coli	DEAE Sepharose	90	-
Fumarase	S. cerevisae	Streamline DEAE	70	7,1
Glucose-6-fosfato desidrogenase	S. cerevisae	Streamline DEAE	75	9,4

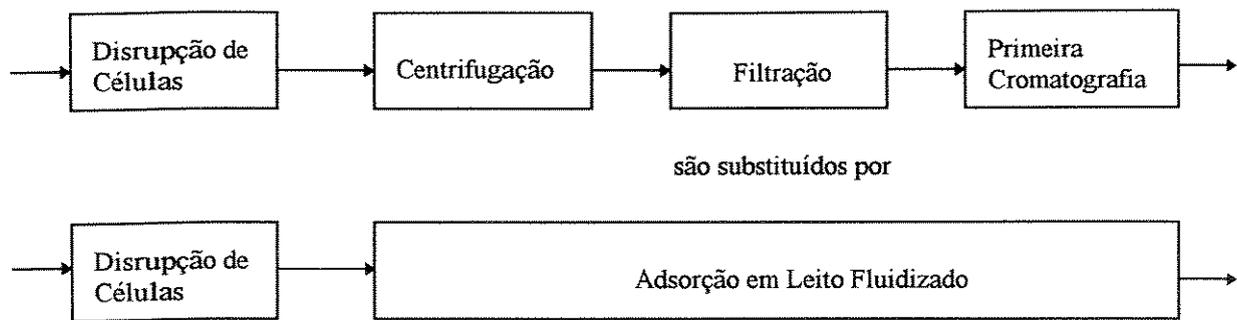


Figura 4: Esquema que mostra a vantagem da utilização da cromatografia em leito fluidizado. (Referência: *GBF, Scientific Report 1993*)

2.3.2. Os Procedimentos Cromatográficos

Os quatro principais processos cromatográficos foram discutidos por Nicoud et al. (1991), são eles: eluição, deslocamento, eluição por etapas e frontal. O processo frontal é bastante empregado na purificação de proteínas. Nessa técnica, a coluna é pré-equilibrada com um solvente de força eluente fraca e os compostos a serem purificados são introduzidos continuamente na coluna, onde são adsorvidos enquanto as impurezas são eliminadas. Quando o adsorvente está saturado, efetua-se a fase de eluição através da introdução na coluna de um solvente de força eluente elevada (com variação do pH ou da força iônica) e desse modo o produto desejado é desorvido.

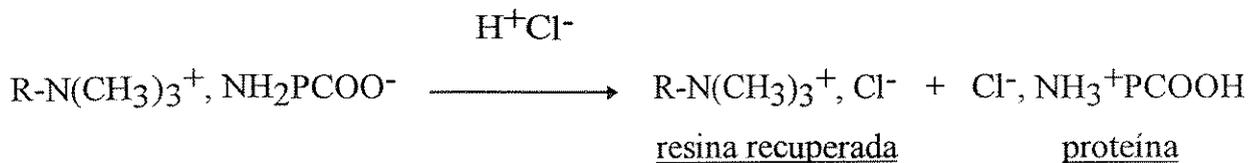
2.3.3. Adsorção em Resinas Trocadoras de Íons

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

Como exemplo, toma-se um caso de troca de ânions onde uma proteína carregada negativamente é adsorvida em uma resina que possui o grupamento amino quaternário e íons cloreto:



Essa etapa é denominada também de fixação da proteína. A dessorção (ou eluição) da proteína é obtida numa etapa suplementar através da modificação do pH para um valor inferior ao pI da proteína, com a adição, por exemplo, de um ácido como o HCl:



Um exemplo típico de sistema de adsorção que utiliza esse princípio foi reportado por Carrère (1993) usando a resina Spherosil QMA para concentrar as proteínas lactalbumina e lactoglobulina a partir do soro de queijo.

2.4. Isotermas de Adsorção: Estudo do Equilíbrio de Fases

A análise da adsorção é baseada no equilíbrio entre as fases envolvidas e nos balanços de massa. O equilíbrio é apresentado na forma de isotermas de adsorção. Para cada isoterma, a abscissa dá a concentração de soluto na solução, usualmente em unidades de massa de soluto por volume de solução. A ordenada indica a concentração de soluto na superfície do adsorvente, mais comumente em unidades de massa de soluto por massa de adsorvente (Belter, 1988). A isoterma de Langmuir (1916) é freqüentemente utilizada para correlacionar dados de adsorção de proteínas. Mais adiante, são apresentadas algumas informações sobre esse tipo de isoterma, bem como sua expressão.

2.4.1. Adsorção em Tanques Agitados

Para a adsorção em batelada, o contato entre as fases é realizado de modo que se tem um estágio de equilíbrio. No Capítulo 3 é apresentado o esquema da aparelhagem experimental, onde é possível realizar o estudo da adsorção com monitoramento contínuo de modo a determinar a cinética de adsorção, além do valor da concentração de equilíbrio a uma dada temperatura.

No estudo do equilíbrio e para a adsorção de um componente, o modelo matemático mais difundido é a isoterma de Langmuir (1916), que pode ser escrita na forma:

$$q^* = \frac{q_m c^*}{k_d + c^*} \quad (1)$$

em que:

c^* é a concentração do soluto na fase líquida em equilíbrio;

q^* é a quantidade de soluto adsorvido por unidade de massa (ou de volume) do adsorvente;

q_m é a quantidade máxima adsorvida na fase sólida;

k_d é a constante de dissociação que descreve o equilíbrio da reação de adsorção.

O modelo de Langmuir se baseia em várias hipóteses:

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

Apesar de sua simplicidade, a isoterma do tipo Langmuir se adapta com boa precisão à adsorção de proteínas em resinas trocadoras de íons (Horstmann e Chase, 1989; Draeger e Chase, 1990).

2.4.2. Adsorção em Colunas

2.4.2.1. Adsorção em leitos fixos

Um leito fixo é um tubo cilíndrico, colocado na posição vertical e preenchido na base por partículas de adsorvente. Fluido contendo o soluto de interesse escoava de uma das extremidades do cilindro, saindo pela extremidade oposta. Inicialmente, a maioria do soluto é adsorvida, tal que a concentração de soluto no efluente é baixa. Como a adsorção continua, a concentração do efluente aumenta, vagarosamente no começo, mas então aumenta abruptamente. Quando este aumento abrupto ou *breakthrough* ocorre, o fluxo é interrompido. O material adsorvido é então elutriado pela lavagem do leito (Belter, 1988).

Descrever esse processo é simples, operá-lo é direto, mas analisá-lo é complexo. Essa complexidade é resultante da adsorção não-linear e não-estacionária. Isto é mais uma consequência da não-homogeneidade das partículas no leito fixo.

2.4.2.2. Adsorção em leitos fluidizados

Em muitas situações de recuperação de proteínas por adsorção, o líquido inicial contém também material particulado, necessitando usualmente uma etapa de filtração antes da adsorção em leitos fixos. A utilização de leitos fluidizados é vantajosa nessa situação por ser um sistema de porosidade global mais elevada, simplificando o processo com a eliminação da operação preliminar de remoção de partículas (Anônimo, 1993). Essa concepção tem sido explorada especialmente por fabricantes de resinas adsorventes como são os casos da Pharmacia® e da Waters®, que têm procurado obter resinas mais densas e portanto mais apropriadas à operação com leitos fluidizados. O ciclo completo de operação de adsorção, lavagem e eluição está esquematizado na Figura 5.

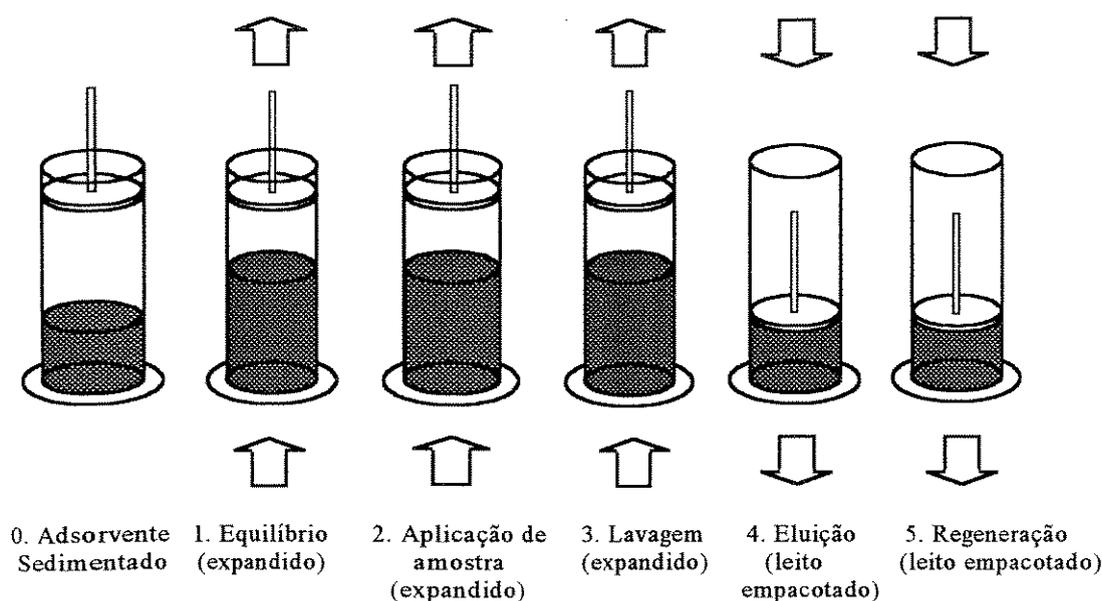


Figura 5: Representação esquemática dos passos na adsorção em leito expandido (Thömes et al, 1994).

Os estudos pioneiros de Draeger e Chase (1990) e de Horstmann e Chase (1989) com as proteínas-modelo Albumina de Soro Bovino (BSA) e imunoglobulina G utilizando leitos expandidos e adsorventes contendo grupos amino quaternário, conduziram a um entendimento mais profundo dos efeitos de transferência de massa no processo de adsorção, como a difusão interna na partícula de adsorvente e a resistência externa do meio que contém as partículas. Os trabalhos de Firouztale et al. (1992) e Firouztale et al. (1994) com insulina e com cefalosporina C, respectivamente, são também importantes marcos na compreensão do fenômeno da adsorção de proteínas em resinas sólidas.

Trabalhos recentes publicados por Hansson et al. (1994) e por Frej et al. (1994) evidenciaram o uso da técnica de leito fluidizado nas escalas de laboratório e piloto para a recuperação de proteínas recombinantes, com a esperada redução no número de etapas necessárias à concentração dos produtos.

CAPÍTULO 3

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, são abordados aspectos sobre os materiais e equipamentos utilizados e sobre os métodos e metodologias empregados para a realização do presente trabalho.

Foram utilizados métodos diferentes para a obtenção das características de adsorção de um dado adsorbato. São eles: experimentos em tanques agitados e experimentos em colunas de adsorção com leitos fixo e fluidizado, os quais são descritos a seguir.

• Experimentos em Tanques Agitados

Este método consiste na utilização de um banho termostático agitado para manter a mistura adsorbato/adsorvente sempre homogênea e com temperatura constante. O princípio do método consiste em circular pelo sistema uma solução com dada concentração inicial de adsorbato, contendo o adsorvente, e monitorar a concentração da solução com o tempo. Esse monitoramento pode ser feito continuamente com o auxílio de uma bomba peristáltica e um monitor para detecção de luz na faixa do ultravioleta. Pode ser feito também em batelada com a retirada de amostras do sistema de tempos em tempos e posterior análise no espectrofotômetro. Nesse trabalho, o monitoramento do sistema foi feito das duas maneiras citadas acima. A capacidade de adsorção nesses experimentos foi obtida através da análise das curvas cinéticas e também dos testes de equilíbrio, obtendo-se assim valores de concentração de equilíbrio para o sistema em estudo.

• Experimentos em Colunas de Adsorção com leitos fixo e fluidizado

A diferença básica entre leito fixo e leito fluidizado está na expansão do leito. No caso do leito fixo, essa expansão não existe e ele é dito empacotado. Já no caso do leito fluidizado, essa expansão existe e pode assumir diversos valores a depender da

vazão aplicada ao sistema. O fenômeno da adsorção em colunas com leito fixo e também leito fluidizado consiste em passar uma solução com dada concentração inicial de adsorbato por uma coluna na posição vertical, contendo o adsorvente, monitorando a concentração dessa solução na saída da coluna. O processo de operação cromatográfico denominado frontal é utilizado nesses experimentos. Nessa técnica, é realizada a medição da concentração do adsorbato na saída do leito em função do volume de solução injetada, obtendo-se a curva denominada de *breakthrough* do sistema. A capacidade de adsorção do leito pode ser então obtida por integração da curva de *breakthrough*.

Após a breve descrição dos métodos utilizados nesse trabalho, faz-se necessária também a descrição dos materiais empregados, bem como a preparação deles.

3.1. Materiais/Preparações

3.1.1. Adsorbato

A proteína padrão **BSA** (Albumina de Soro Bovino- Sigma®) foi utilizada como adsorbato nos experimentos de adsorção realizados em tanques agitados e em colunas. Seu peso molecular é da ordem de 66.000 daltons e sua composição é de 98-99% p/p de albumina (Draeger e Chase, 1990). A Albumina de Soro Bovino é uma das poucas proteínas do plasma sanguíneo que não é uma glicoproteína e o seu peso molecular é o mais baixo de todas elas, estando presente no plasma em uma quantidade de aproximadamente 50 mg/ml. Trata-se de uma proteína elipsóide com dimensões moleculares de mais ou menos 30 por 180 Angstroms (Smith et al.,1983).

3.1.2. Adsorventes

A. Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia®)- é um forte trocador aniônico com excelentes propriedades de escoamento e alta capacidade para adsorção de proteínas de todos os valores de pI. O grupo de troca iônica é um amino quaternário que permanece carregado positivamente e mantém consistentemente altas capacidades de troca sobre toda a faixa de trabalho, pH 2-12. As características deste adsorvente são (Pharmacia Guide):

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

Tamanho médio das partículas (μm): 90.

Faixa de trabalho de pH: 2-12.

Massa específica das partículas (g/cm^3): 1,13 (Draeger e Chase, 1990).

B. Accell Plus QMA (Waters®-Division of Millipore)- é um trocador de íon (aniônico) preparado por um processo de polimerização que encapsula a base rígida de sílica com um ligante hidrofílico e um ligante funcional reticulado altamente estável. Este adsorvente também possui um grupo de troca iônica do tipo amino quaternário e fornece uma excelente recuperação e uma alta resolução de biomoléculas. Sua estrutura rígida e incompressível o faz altamente adequado para a purificação e o isolamento de proteínas, enzimas e imunoglobulinas. Suas características são (Waters Guide):

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

Tamanho dos poros: 500 Angstroms.

Massa específica das partículas secas à 22°C (g/cm^3): 2,32 (determinada através de um picnômetro de Hélio existente no Instituto de Química - UNICAMP).

Massa específica das partículas após embebição no tampão (g/cm^3): 1,16.

Porosidade da partícula: 0,60.

3.1.3. Tampão

Os experimentos foram realizados em presença de solução tampão de Tris(hidroximetil)aminometano com forças iônicas diferentes, mas com o pH mantido em torno de 7,0. As concentrações de Tris utilizadas foram: 0,02, 0,03 e 0,05 mol/l para o sistema Accell Plus QMA/BSA e 0,2 e 0,01 mol/l para o sistema Q-Sepharose Fast Flow/BSA. A preparação da solução tampão é descrita a seguir.

3.1.4. Preparação da solução tampão

A solução tampão foi obtida partindo-se da solução de Tris e do acréscimo de HCl com uma molaridade relativamente alta. Preparou-se a solução de Tris diluindo-se uma dada massa do Tris (Nuclear®- peso molecular= 121,14 g/gmol) em água

destilada (2,4228 g em 1000 ml para uma concentração de 0,02 mol/l, por exemplo). Preparou-se essa solução com aproximadamente 80% do volume final desejado, acrescentou-se o HCl, acompanhando o pH com o auxílio do pHmetro, até ter atingido o pH desejado. Completou-se então o volume final com água destilada.

3.1.5. Preparação das soluções de BSA

As soluções de BSA podem ser preparadas de duas maneiras. Uma delas, corresponde a preparar solução por solução a partir da pesagem da BSA de acordo com a concentração desejada, utilizando-se um agitador magnético. A outra maneira, consiste na preparação de uma solução de BSA mais concentrada seguida de sucessivas diluições com o tampão para a obtenção das soluções nas concentrações desejadas. Nos experimentos realizados, foram utilizados os dois modos de preparação. A faixa de concentrações utilizada ficou em torno de 0,5 à 5,5 mg/ml para o sistema Accell Plus QMA/BSA e em torno de 0,25 à 3,0 mg/ml para o sistema Q-Sepharose Fast Flow/BSA.

Algumas calibrações preliminares foram feitas para possibilitar a execução do trabalho. Foram elas: levantamento das curvas de calibração do espectrofotômetro, calibração da bomba peristáltica, do registrador e também do sistema em estudo.

3.2. Calibrações

3.2.1. Curvas de calibração do espectrofotômetro

A calibração do espectrofotômetro foi feita utilizando-se soluções de BSA com concentrações iniciais diferentes e conhecidas. O tampão Tris foi utilizado como branco e foi feita a leitura das absorvâncias das referidas soluções. Com esses dados, pôde-se construir uma curva de absorvância versus concentração. Os dados foram ajustados por uma reta e sua expressão foi utilizada para cálculos de concentração a partir de valores de absorvância. O comprimento de onda indicado no caso da proteína BSA é de 280 nm (Stoscheck, 1990). Nos experimentos realizados, utilizou-se o tampão Tris com concentrações diferentes, logo foram obtidas curvas de calibração

para cada um dos casos. A seguir, são apresentadas essas curvas e suas respectivas expressões.

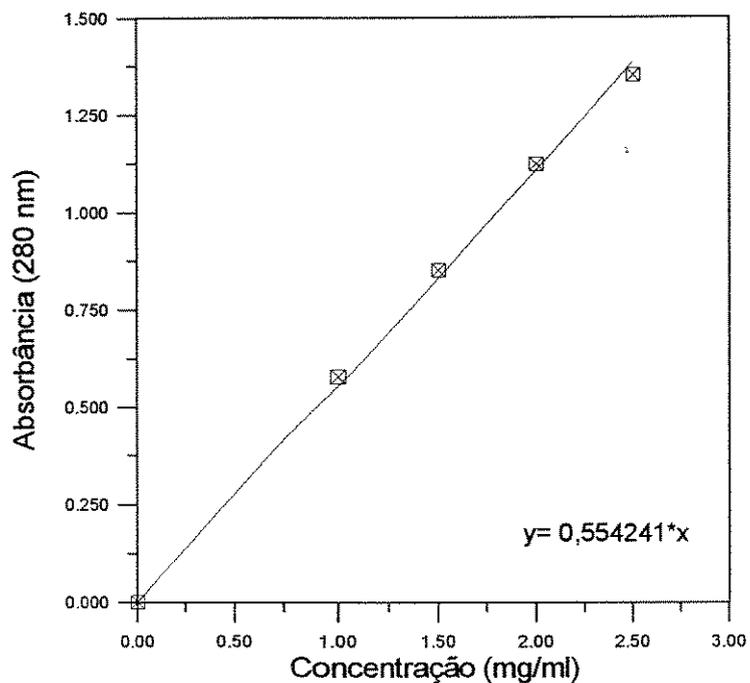


Figura 6: Curva de Calibração de BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

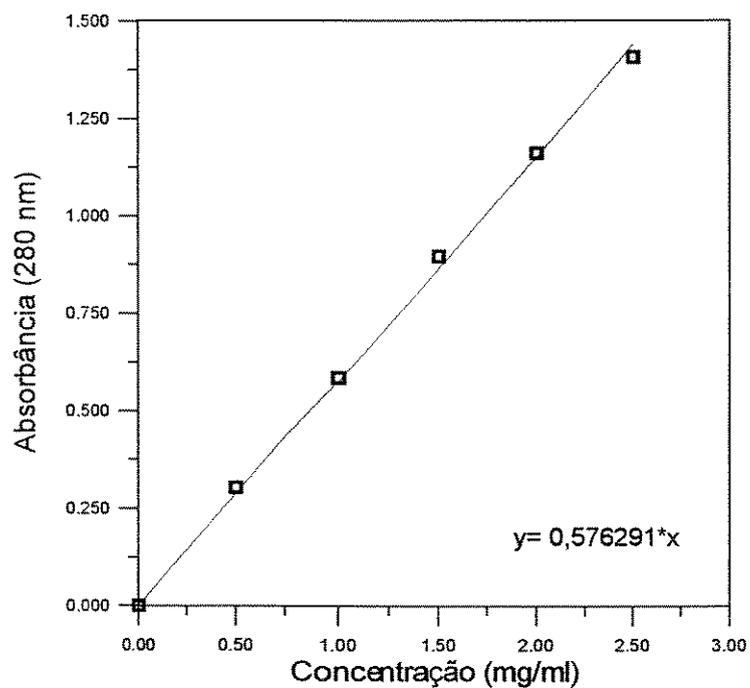


Figura 7: Curva de Calibração de BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

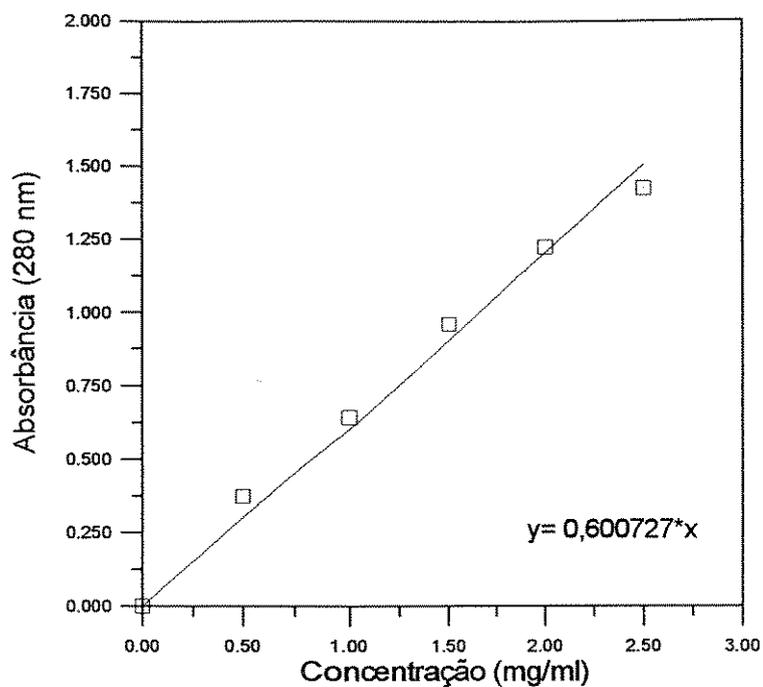


Figura 8: Curva de Calibração de BSA em tampão Tris 0,05 mol/l pH= 7,0.

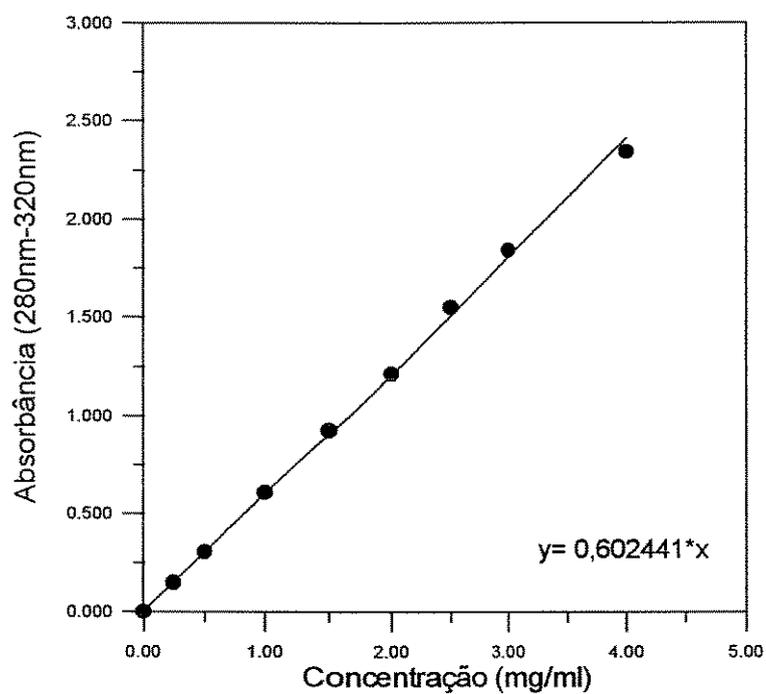


Figura 9: Curva de Calibração de BSA em tampão Tris 0,2 mol/l pH= 7,0.

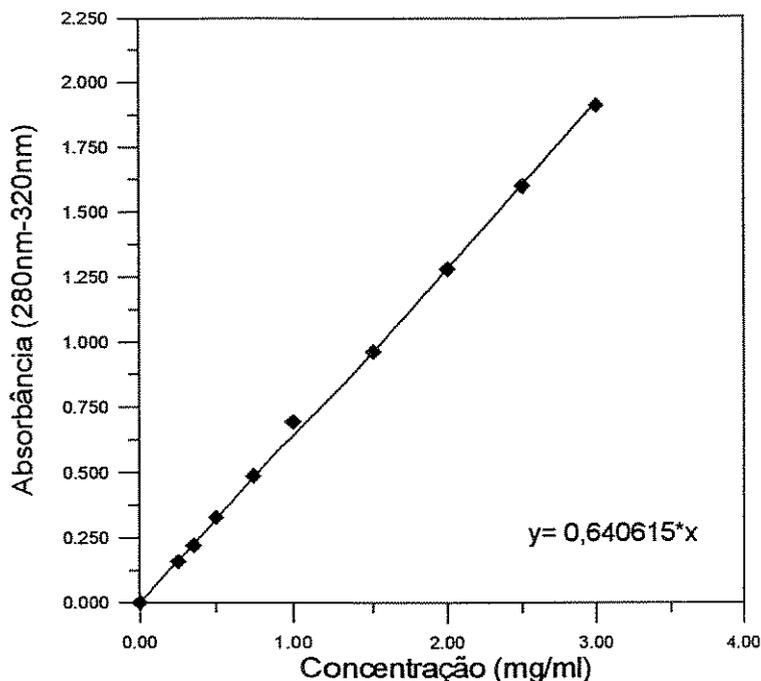


Figura 10: Curva de Calibração de BSA em tampão Tris 0,01 mol/l pH= 7,0.

3.2.2. Bomba peristáltica

Uma bomba peristáltica faz parte da montagem utilizada nos experimentos em tanque agitado - sistema com monitoramento contínuo. A sua função era bombear uma dada quantidade de solução de BSA contida em um béquer para passar através de um monitor de UV e retornar ao sistema novamente (béquer). Como a faixa de trabalho da bomba utilizada era desconhecida, foi necessário calibrá-la. Para isto, utilizou-se água destilada como fluido de calibração e o procedimento utilizado foi o seguinte: o botão referente à escala de velocidade da bomba foi colocado na 1ª posição. Um béquer seco foi pesado e sua massa anotada. A bomba foi ligada e deixou-se o sistema em funcionamento durante 5 minutos. Após isto, desligou-se a bomba e o béquer foi novamente pesado. Por diferença, obteve-se a massa bombeada durante os 5 minutos e conseqüentemente a vazão mássica. Considerando que a massa específica da água é igual a 1 g/cm^3 , calculou-se a vazão volumétrica. O mesmo procedimento foi utilizado para as demais posições no botão de velocidade, tendo-se então a calibração da bomba. Dessa maneira, pôde-se definir a faixa de trabalho. Nos experimentos em tanque agitado a vazão utilizada foi da ordem de 5 ml/min (Horstmann e Chase, 1989).

3.2.3. Registrador

Um registrador também faz parte da montagem utilizada nos experimentos em tanque agitado e ele também está presente na montagem dos experimentos na coluna de adsorção. A sua função foi registrar o sinal emitido pelo monitor de UV. Este sinal varia entre 0 - 1 V correspondendo à linha-base e à escala completa do papel do registrador, respectivamente. Uma fonte de tensão foi utilizada para a calibração. A cada tensão fornecida, o registrador marcava no papel a quantas divisões correspondia. Acoplado ao registrador, havia um multímetro que acompanhava o sinal emitido pelo monitor. Na realidade, os resultados da leitura das absorbâncias no monitor foram obtidos sob a forma de tensão lida no multímetro.

3.2.4. Sistema em estudo

A calibração do sistema em estudo foi uma maneira de obter uma relação entre uma dada concentração de solução de proteína e a tensão equivalente (lida no multímetro acoplado ao registrador). Para a realização dessa calibração, utilizou-se a montagem dos experimentos em tanque agitado (vide Figura 13), apesar dessa calibração também servir para a análise dos resultados da coluna de adsorção. O procedimento utilizado foi o seguinte: o monitor de UV foi colocado numa determinada faixa de sensibilidade. Um béquer contendo o tampão foi acoplado ao sistema (montagem experimental - sistema com monitoramento contínuo). A bomba foi acionada e o monitor foi zerado através de uma tecla que faz com que o monitor considere o tampão como o branco e conseqüentemente a linha-base no registrador começou a ser delineada. Um béquer com solução de BSA de concentração bem baixa foi acoplado ao sistema. Monitorou-se a tensão até alcançar um valor estacionário; após isto, substituiu-se esta solução de BSA por uma outra solução de BSA e o mesmo procedimento foi utilizado. Obteve-se assim uma curva do tipo tensão versus concentração para uma dada faixa de sensibilidade do monitor. A faixa de concentrações das soluções de BSA utilizadas para a calibração foi de 0,1 à 7,0 mg/ml preparadas em tampão Tris 0,02 mol/l pH=7,0 e de 0,5 à 5,0 mg/ml para o tampão Tris 0,03 mol/l pH=7,0. Não foi necessário calibrar o sistema em estudo utilizando os tampões Tris 0,2 e 0,01 mol/l pH=7,0 porque nesse caso não havia um monitoramento

contínuo da tensão (as amostras eram retiradas de tempos em tempos para posterior análise no espectrofotômetro).

As condições operacionais adotadas foram:

- temperatura do banho na faixa de 296 à 298 K (23 à 25° C).
- velocidade de agitação do banho de aproximadamente 175 rpm.
- vazão da bomba peristáltica em torno de 5 ml/min.

A calibração do sistema foi feita para cada faixa de sensibilidade do monitor para que fosse verificado em que faixa o sistema de trabalho deveria ser posicionado. Essa faixa de sensibilidade é expressa em AUFS (*Absorbance Units Full Scale*) e varia entre 0,01 e 2,0, sendo que 0,01 AUFS é a faixa mais sensível. Pelos valores de tensão obtidos para a faixa de concentrações utilizadas, a faixa de 1,0 AUFS é a mais indicada para se trabalhar, pois ela varreu praticamente toda a escala do registrador de 0 a 1 V.

A seguir, são apresentadas as curvas obtidas com as calibrações do sistema em estudo, assim como suas respectivas expressões.

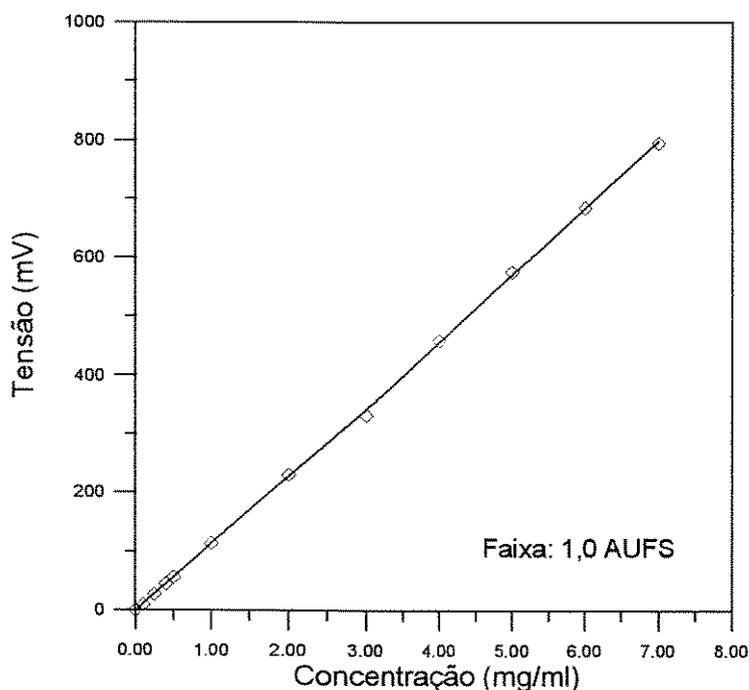


Figura 11: Curva de Calibração do sistema utilizando o tampão Tris 0,02 mol/l pH=7,0 para a preparação das soluções de BSA.

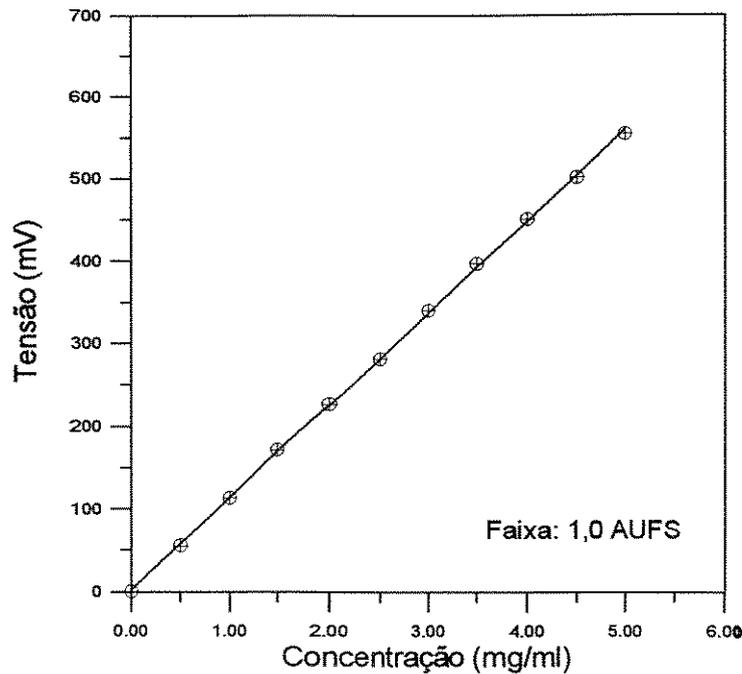


Figura 12: Curva de Calibração do sistema utilizando o tampão Tris 0,03 mol/l pH=7,0 para a preparação das soluções de BSA.

Para a Figura 11, tem-se a seguinte expressão:

$$C(\text{mg/ml}) = \frac{T(\text{mV}) + 1,08041}{114,187} \quad (2)$$

Para a Figura 12, tem-se:

$$C(\text{mg/ml}) = \frac{T(\text{mV}) - 1,77273}{111,691} \quad (3)$$

As expressões acima serão utilizadas para a análise dos resultados obtidos.

São descritas a seguir as metodologias utilizadas para a execução do presente trabalho. Com relação ao primeiro método citado (experimentos em tanques agitados), estão associadas as metodologias do sistema com monitoramento contínuo, monitoramento não contínuo e dos testes de equilíbrio na adsorção. Com relação ao segundo método (experimentos em colunas de adsorção), estão associadas as

metodologias dos testes de expansão do leito e das corridas de adsorção em colunas com leitos fixo e fluidizado.

3.3. Metodologias Experimentais

3.3.1. Experimentos em Tanques Agitados

3.3.1.1. Sistema com monitoramento contínuo

Esse sistema teve como objetivo a obtenção de curvas cinéticas. Os dados de equilíbrio para a obtenção das respectivas isotermas de adsorção foram obtidos através de testes de equilíbrio. O sistema estudado foi a resina Accell Plus QMA com a proteína BSA. Cada experimento foi feito com uma dada concentração inicial da solução de proteína. Esse sistema continha: um béquer de 250 ml contendo a solução de interesse, um monitor de ultravioleta para leitura da absorbância a 280 nm, um registrador conectado ao monitor de UV, uma bomba peristáltica para circular a solução pelo sistema, mangueiras de silicone que serviam como conexão entre os equipamentos e um banho agitado. A Figura 13 mostra a montagem experimental que utilizou esses componentes. Um filtro foi acoplado à mangueira que saía do béquer, contendo solução, para evitar a passagem de resina pelo sistema, pois isso poderia acarretar em um entupimento do mesmo e também em uma leitura errada da absorbância pelo monitor de UV devido à turbidez.

O procedimento experimental adotado envolveu as seguintes etapas:

1. 100 ml de tampão foram colocados no béquer de 250 ml que fazia parte do sistema. A agitação do banho foi acionada juntamente com a bomba peristáltica. Foi dado o auto-zero no monitor de UV, lembrando que a pena do registrador devia ser abaixada nesse momento e o andamento do papel devia ser acionado. O multímetro que estava acoplado ao registrador foi ligado e acusou uma tensão nula.
2. Após ser verificada a presença de uma linha-base no registrador (em torno de 15 minutos após o início da corrida), trocou-se o béquer contendo o tampão por outro contendo 100 ml de solução de BSA. Com essa solução acoplada ao sistema, a bomba foi novamente ligada e a solução circulou por 15 minutos, verificando-se no

registrator a presença de um patamar ao final deste período (e no multímetro, um valor estacionário).

3. Acrescentou-se uma dada massa de resina, sob agitação, e acionou-se o cronômetro (nesses experimentos foram utilizadas 500 mg de resina para um volume de solução de proteína de 100 ml).
4. Com o sistema em funcionamento, monitorou-se a corrida para que de tempos em tempos pudesse ser feita a leitura da tensão no multímetro. Através da calibração do sistema em estudo feita previamente, determinou-se o valor da concentração correspondente a cada tensão lida, dando origem assim à curva cinética.
5. O sistema foi desligado quando o registrator voltou a marcar um patamar e o multímetro atingiu um valor estacionário.

As condições operacionais foram:

- vazão da bomba peristáltica em torno de 5 ml/min.
- velocidade de avanço do papel do registrator: 12 cm/h e 30 cm/h.
- velocidade de agitação do banho de aproximadamente 175 rpm.
- temperatura do banho na faixa de 296 à 298 K (23 à 25° C).

A única condição operacional modificada ao longo dos experimentos foi a velocidade de avanço do papel do registrator. Isto não interferiu nos resultados obtidos, pois o monitoramento do sistema foi feito através do multímetro (leitura da tensão) e não no que estava sendo registrado no papel do registrator.

3.3.1.2. Sistema com monitoramento não-contínuo

No referido sistema foram retiradas amostras de tempos em tempos e depois foi feita a análise no espectrofotômetro para a obtenção da respectiva curva cinética. Os dados de equilíbrio para a construção da isoterma de adsorção foram obtidos através do mesmo experimento, utilizando-se a última amostra retirada. O sistema estudado foi a resina Q-Sepharose Fast Flow com a proteína BSA. A montagem experimental utilizada continha um banho termostático (o mesmo existente na montagem do sistema com monitoramento contínuo), erlenmeyers de 250 ml para as soluções de proteína, seringas de plástico para retirada das amostras e um espectrofotômetro. Filtros descartáveis foram utilizados na retirada das amostras.

O procedimento experimental consistiu em um banho agitado com temperatura e velocidade controladas contendo nove erlenmeyers. Nos erlenmeyers foram adicionadas determinadas massas da resina Q-Sepharose Fast Flow à soluções de BSA, com concentrações iniciais diferentes, contidas em tais recipientes. As massas utilizadas foram: aproximadamente 300 mg para 100 ml de solução de BSA em tampão Tris 0,2 mol/l pH= 7,0 e aproximadamente 1140 mg para 110 ml de solução de BSA em tampão Tris 0,01 mol/l pH=7,0.

As condições operacionais foram:

- velocidade de agitação do banho de aproximadamente 200 rpm.
- temperatura do banho na faixa de 296 à 298 K (23 à 25°C).

A retirada das amostras foi feita em intervalos distintos (na primeira hora de corrida foram retiradas amostras de 10 em 10 minutos, depois de meia em meia hora e assim por diante). Utilizou-se seringas descartáveis contendo mangueiras de plástico na sua extremidade para facilitar a retirada das amostras. Essas amostras foram filtradas através de pequenos filtros descartáveis antes de serem colocadas em tubos de ensaio para posterior análise. Elas foram analisadas no espectrofotômetro com um comprimento de onda de 280 nm (Stoscheck, 1990). Como medida de precaução, efetuou-se a leitura das amostras também à 320 nm, pois uma vez que a proteína não absorve neste comprimento de onda, qualquer eventual absorbância lida deve ser devido à presença de impurezas e este valor deve então ser subtraído da leitura à 280 nm. Curvas de calibração foram necessárias para a determinação das concentrações das amostras a partir das absorbâncias lidas (vide tópico 3.2.1.).

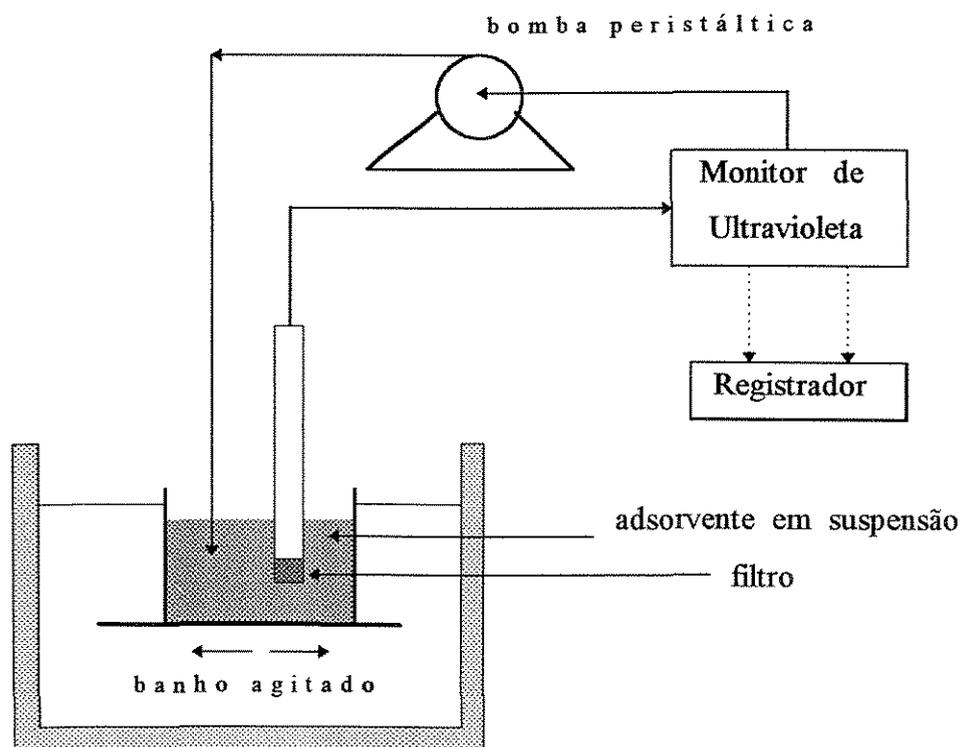


Figura 13: Montagem utilizada nos experimentos em tanque agitado - sistema com monitoramento contínuo.

3.3.1.3. Testes de equilíbrio

O teste de equilíbrio consistiu na obtenção da isoterma de adsorção para cada sistema em estudo, a partir de dados de equilíbrio. O sistema estudado foi a resina Accell Plus QMA com a proteína BSA. Cada teste durou aproximadamente 60 horas e foi realizado no banho agitado apresentado na Figura 13. As condições operacionais adotadas foram:

- temperatura do banho na faixa de 296 à 298 K (23 à 25°C).
- velocidade de agitação do banho de aproximadamente 175 rpm.

O procedimento experimental seguiu as seguintes etapas: foram preparadas soluções de BSA com concentrações iniciais diferentes. O volume de solução contido em cada béquer foi de 100 ml. As soluções foram colocadas no banho agitado e adicionou-se 500 mg de resina em cada béquer. Deixou-se o sistema em funcionamento durante aproximadamente 60 horas. Após esse tempo, foi feita a coleta das amostras com a agitação do banho ainda ligada para garantir que as amostras

fossem retiradas de uma solução/suspensão homogênea. Foram retiradas amostras de 1,5 ml (em triplicata) de cada béquer com o uso de seringas descartáveis e mangueiras de plástico. Antes delas serem colocadas nos tubos *Eppendorf*, elas foram filtradas utilizando-se filtros descartáveis para reter a resina. Essas amostras foram analisadas no espectrofotômetro (comprimento de onda de 280 nm) e com o auxílio das curvas de calibração feitas previamente foi possível obter os valores das concentrações de equilíbrio para cada sistema estudado. Não houve necessidade de centrifugação das amostras contidas nos tubos devido à utilização das unidades filtrantes.

3.3.2. Experimentos em Colunas de Adsorção

3.3.2.1. Testes de expansão do leito

O teste de expansão do leito consistiu na obtenção de uma relação entre a vazão aplicada e a altura do leito. Essa metodologia está associada aos experimentos em colunas de adsorção. O único sistema estudado foi a resina Accell Plus QMA com a proteína BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0. No presente trabalho, foram feitos dois testes de expansão devido à utilização de duas bombas distintas. O procedimento experimental adotado em cada teste será descrito mais adiante. A montagem utilizada para a realização dos testes de expansão está representada na Figura 14. Os equipamentos que fazem parte dessa montagem são: uma coluna de vidro, uma bomba (inicialmente utilizou-se uma peristáltica e depois uma de pistão), dois recipientes para armazenamento das soluções (tampão e de proteína), um monitor de ultravioleta, um registrador e uma balança. No caso dos testes de expansão, somente a coluna de vidro, a bomba, a balança e um dos recipientes para armazenamento de solução foram necessários. A coluna utilizada nos experimentos tem 1,6 cm de diâmetro e 20 cm de altura e possui um pistão que regula a altura desejada do leito. Essa altura é medida através de uma régua fixada na parede externa da coluna. O leito era constituído de uma dada massa de adsorvente (aproximadamente 3,3 g para todos os experimentos) que era empacotado seco. Deixava-se a solução tampão passar pela coluna, a uma dada vazão e com fluxo ascendente para possibilitar uma estabilização do sistema constituído de adsorvente e solução tampão. Essa passagem de solução pelo leito (para

provocar a estabilização do mesmo) durava trinta minutos pelo menos e o posicionamento do pistão na coluna era aleatório. Após esse tempo, deixava-se a resina repousar por alguns minutos e voltar a condição de leito empacotado (agora já contendo a solução tampão). A altura apresentada pelo leito após o seu assentamento correspondia à altura do leito fixo. Para a massa de resina empacotada na coluna essa altura foi de 3,4 cm. A partir desse ponto, a coluna já estava pronta para a realização do teste de expansão em si. O pistão era posicionado no topo da coluna. Como já foi dito antes, foram realizados dois testes de expansão devido à utilização de duas bombas diferentes na coluna de adsorção: primeiramente uma bomba peristáltica e depois uma bomba pistão. O procedimento experimental adotado em cada um dos casos é descrito logo abaixo.

- **Utilizando a bomba peristáltica:**

Conforme já foi dito antes, o teste de expansão consistiu na variação da vazão fornecida pela bomba ocasionando uma elevação do leito (expansão). O objetivo do teste foi obter uma curva do tipo altura (cm) versus vazão (ml/min) ou velocidade superficial (cm/h) que foi calculada a partir da vazão e da área da seção transversal da coluna. O procedimento adotado foi o seguinte: com a coluna já preenchida e equilibrada com o adsorvente e a solução tampão, o botão de escala de velocidade da bomba foi colocado em uma dada posição e a bomba foi acionada. No caso da bomba peristáltica utilizada, fez-se necessário a medida da vazão fornecida para cada valor na escala de velocidade. Foi feita a coleta de material na saída da coluna, em um recipiente previamente pesado, durante 10 minutos e pesou-se o recipiente, obtendo-se assim, por diferença, a vazão mássica e conseqüentemente a vazão volumétrica uma vez que a massa específica do fluido era conhecida. Deixou-se a bomba em funcionamento durante mais 20 minutos e a altura correspondente a dada vazão foi anotada. Tomou-se então uma nova posição do botão de escala de velocidade e o mesmo procedimento foi adotado, obtendo-se assim um novo valor para a altura do leito. Esse procedimento foi adotado até a altura do leito atingir o pistão.

- **Utilizando a bomba pistão:**

O procedimento adotado foi semelhante ao do teste de expansão com a bomba peristáltica, exceto que não havia a necessidade de medir a vazão.

A realização do teste de expansão teve como objetivo principal definir a vazão que se devia trabalhar para se ter uma dada altura do leito. Nos experimentos realizados, trabalhou-se com o leito fixo e com duas alturas distintas para a condição de leito fluidizado.

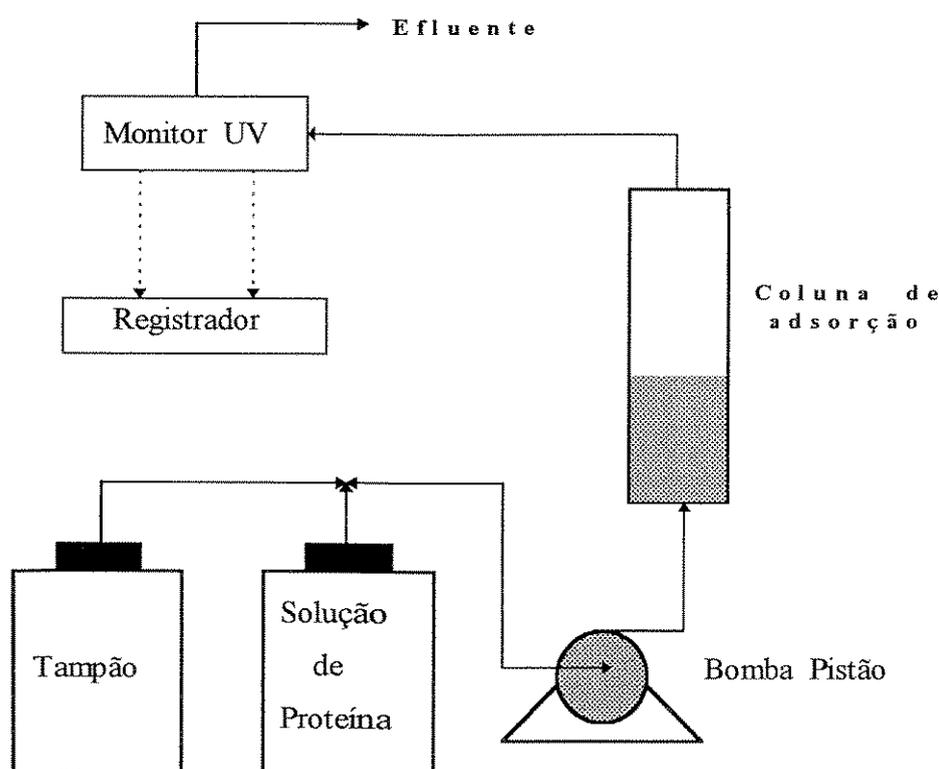


Figura 14: Montagem utilizada nos experimentos em coluna de adsorção: leitos fixo e fluidizado.

3.3.2.2. Corridas de adsorção

As corridas de adsorção foram realizadas em colunas com leitos fixo e fluidizado. Os objetivos desses experimentos foram: obtenção de curvas do tipo *breakthrough* (C/C_0 versus volume injetado, onde C é a concentração da solução na saída da coluna e C_0 é a concentração inicial da solução) para sistemas com

concentrações iniciais diferentes e obtenção de isothermas de adsorção. A montagem experimental utilizada nessas corridas encontra-se representada na Figura 14.

Nessa metodologia, foram estudadas soluções de BSA (proteína de interesse) com concentrações iniciais diferentes em três situações: leito fluidizado com duas alturas diferentes e leito fixo. O sentido do fluxo foi sempre ascendente para possibilitar a fluidização do leito, no caso dos experimentos em leito fluidizado.

As variáveis operacionais foram:

- vazão inicial da bomba, peristáltica e pistão (ml/min).
- altura do leito (cm).
- velocidade de avanço do papel do registrador (cm/h).

O monitor de ultravioleta foi colocado na faixa de 1,0 AUFS, da mesma maneira que nos experimentos em tanque agitado. O pistão da coluna foi posicionado exatamente sobre o leito de resina no caso do leito fixo e posicionado na altura de interesse no caso do leito fluidizado. Os valores de tensão lidos ao longo dos experimentos foram convertidos em valores de concentração através da calibração do sistema em estudo feita previamente e ilustrada na Figura 11. Já as massas lidas foram convertidas em volumes injetados através da massa específica do tampão determinada no laboratório ($\rho = 1,1145 \text{ g/cm}^3$).

As corridas realizadas com o leito fluidizado obedeceram os seguintes passos:

1. Estabilizou-se a coluna contendo resina previamente pesada (e de massa similar a utilizada nos testes de expansão) com o tampão de trabalho (Tris 0,02 mol/l pH=7,0) durante trinta minutos pelo menos.
2. Foi dado o auto-zero no monitor de UV, abaixou-se a pena do registrador e ligou-se o avanço do papel.
3. Esperou-se alguns minutos para que fosse verificada a presença da linha-base no registrador.
4. Parou-se rapidamente a bomba para trocar os recipientes, possibilitando assim que a solução de proteína fosse bombeada.
5. Ligou-se novamente a bomba para provocar a passagem da solução de interesse pelo leito.

6. O cronômetro foi acionado e começou a ser feita a coleta do material efluente da coluna num recipiente contido sobre uma balança.
7. Começou-se finalmente a monitorar a tensão lida no multímetro (acoplado ao registrador) e a monitorar a massa na saída da coluna (com a ajuda da balança) de tempos em tempos.

Ao longo dos experimentos com leito fluidizado, a vazão fornecida pela bomba teve que ser alterada para garantir uma expansão constante do leito. As alturas em que os experimentos foram realizados foram 6,6 e 10,1 cm. O posicionamento do pistão na coluna era equivalente à altura escolhida para a expansão.

As corridas realizadas com o leito fixo diferiram das com leito fluidizado em relação à dois fatores:

1. O posicionamento do pistão era exatamente sobre o leito empacotado e não a uma dada distância do leito.
2. A vazão de trabalho não foi alterada ao longo dos experimentos.

Em seguida, são apresentadas as descrições e especificações dos equipamentos e materiais utilizados em todos os testes experimentais.

3.4. Equipamentos e Materiais utilizados

3.4.1. Equipamentos

- Agitador magnético modelo 263 - Fanen;
- Balança analítica marca Mettler AJ150;
- Balança semi-analítica modelo BG1000 - Gehaka;
- Banho agitado marca Shaker Bath - Lab Line;
- Banho ultrasônico T14 - Thornton;
- Bomba peristáltica Cole-Parmer Masterflex (cabeçote 7013-20 e mangueira de silicone número 13);
- Bomba pistão modelo P-6000 - Pharmacia;
- Bomba de vácuo modelo 141 2VO n° 720P - Primar;
- Bomba de vácuo 27,5 in Hg modelo GH-4VB - Thomas Industries Inc.;

- Espectrofotômetro modelo U200 - Hitachi;
- Monitor de Ultravioleta modelo Econo UV Monitor - Bio-Rad;
- Multímetro digital modelo MIC- 2200A - Re-Som Eletrônica LTDA;
- pHmetro Delta 340 - Mettler;
- Registrador modelo RF102 - ECB (Equipamentos Científicos do Brasil).

3.4.2. Materiais: vidraria e diversos

- Balões volumétricos;
- Béqueres;
- Coluna de vidro modelo XK- 16/20 - Pharmacia;
 - dimensões da coluna (cm): 1,6 x 20.
 - área da seção transversal da coluna (cm²): 2,01.
- Erlenmeyers;
- Espátula;
- Frascos de vidro com capacidade para 2,5 litros e 1,0 litro;
- Filtro proveniente de uma coluna de filtração de plástico 7121-03 J.T. Baker (utilizado no sistema contínuo);
- Mangueiras de plástico com adaptador numa das extremidades para conexão à seringas descartáveis;
- Mangueiras de silicone tamanho 13 - Masterflex;
- Pipetas Pasteur;
- Pipeta automática Eppendorf 100 µl- 1000 µl;
- Ponteiras plásticas para pipeta automática;
- Provetas;
- Seringas descartáveis de 5 ml - Plastipak;
- Tubos de ensaio;
- Tubos Eppendorf 1500 µl;
- Unidades filtrantes Millex com 0,22 µm de diâmetro de poro JBR6 100 21 - Millipore.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS: ANÁLISES E DISCUSSÕES

Neste capítulo, são apresentados os resultados experimentais obtidos, assim como as análises e discussões. As expressões utilizadas para os cálculos são apresentadas ao longo do capítulo, de acordo com a necessidade.

4.1. Experimentos em Tanques Agitados

Experimentos iniciais foram realizados no banho agitado com a metodologia do sistema com monitoramento não contínuo (vide Capítulo 3). O sistema estudado foi a resina Q-Sepharose Fast Flow com a proteína BSA. As curvas cinéticas obtidas para cada sistema são apresentadas a seguir.

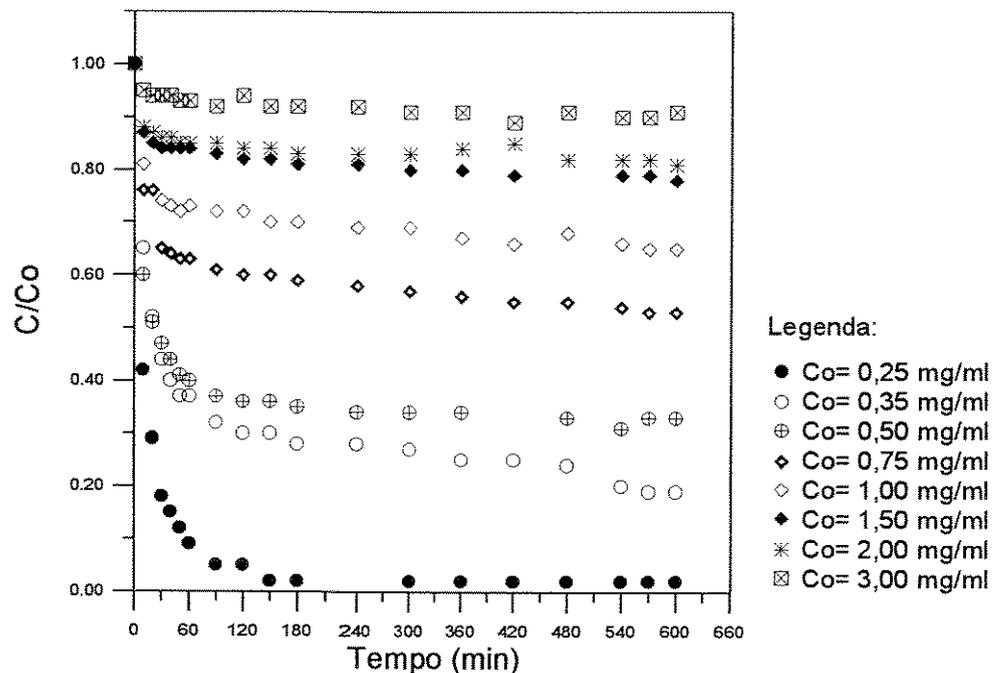


Figura 15: Curvas cinéticas obtidas para várias concentrações iniciais de BSA. Sistema: Q-Sepharose Fast Flow/BSA em tampão Tris 0,2 mol/l pH= 7,0.

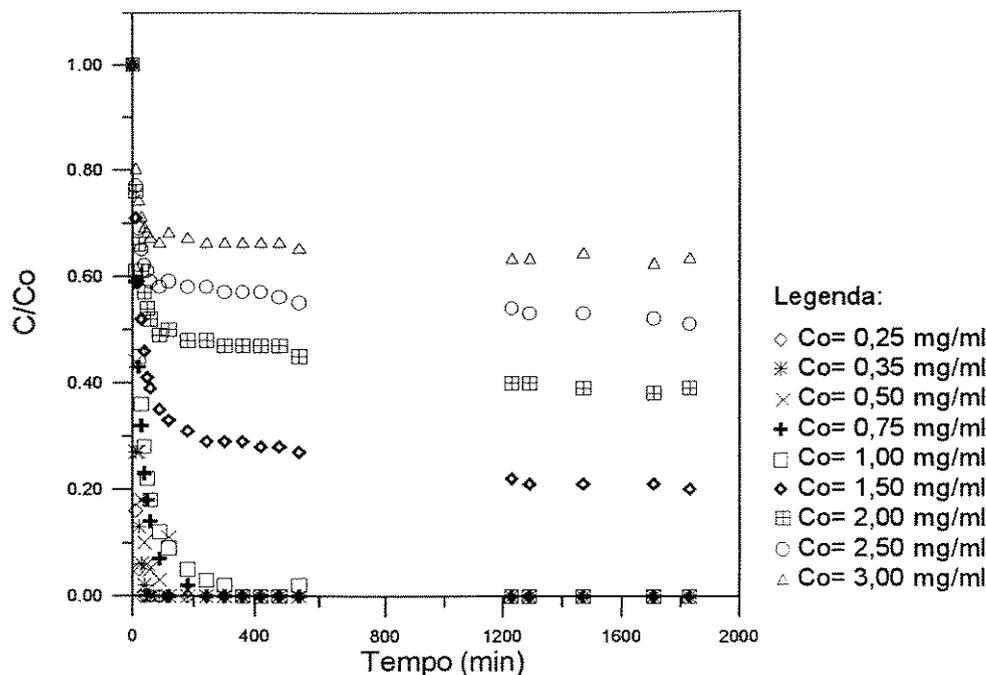


Figura 16: Curvas cinéticas obtidas para várias concentrações iniciais de BSA. Sistema: Q-Sepharose Fast Flow/BSA em tampão Tris 0,01mol/l pH= 7,0.

As condições operacionais adotadas nesses experimentos são descritas no Capítulo 3. Para o cálculo das concentrações das amostras (a partir dos valores de absorbância lidos no espectrofotômetro) referentes as curvas cinéticas apresentadas na Figura 15, utilizou-se a curva de calibração correspondente a Figura 9. Para as curvas cinéticas apresentadas na Figura 16, utilizou-se a curva de calibração correspondente a Figura 10. As Figuras 9 e 10 são apresentadas no Capítulo 3.

O adsorvente, no caso a Q-Sepharose Fast Flow, possui uma capacidade máxima de adsorção (parâmetro q_m na equação 1 - Capítulo 2) que representa o quanto o adsorvente é capaz de reter de adsorbato (a proteína BSA, no caso). Este valor é independente da quantidade de adsorbato existente em contato com o adsorvente. Foram utilizadas soluções de BSA com concentrações iniciais diferentes (0,25 à 3,00 mg/ml) e o comportamento obtido na adsorção dessas soluções é apresentado nas curvas cinéticas mostradas nas Figuras 15 e 16.

As curvas cinéticas referentes ao sistema Q-Sepharose Fast Flow/BSA em tampão Tris 0,2 mol/l pH= 7,0 são mais definidas (bem separadas, apresentando patamares distintos) que as curvas referentes ao mesmo sistema em tampão Tris 0,01 mol/l pH= 7,0. Nas curvas do sistema Tris 0,01 mol/l, há uma maior sobreposição dos

dados. Isso provavelmente ocorreu devido à maior capacidade de adsorção com o uso de um tampão com baixa força iônica. Segundo a literatura (Leaver, Conder e Howell, 1990), quanto maior a força iônica do tampão, menor será a adsorção devido à competitividade entre a proteína e os íons cloreto, no caso, existentes em solução. Nas curvas obtidas com o tampão Tris 0,01 mol/l (Figura 16), verifica-se que para concentrações baixas os valores das concentrações das soluções chegam a ser zero, evidenciando a completa adsorção da proteína pelo adsorvente, justificando assim a sobreposição das curvas. Nas curvas obtidas com a força iônica Tris 0,2 mol/l, isso já não acontece.

As comparações feitas no parágrafo anterior se relacionam apenas com a forma das curvas cinéticas obtidas, não interessando o tempo de contato entre adsorbato e adsorvente. Para o primeiro sistema, o experimento teve uma duração de 22 horas, mas os resultados apresentados (curvas cinéticas - Figura 15) só levaram em consideração as primeiras 10 horas de corrida. Isso foi feito porque não foram retiradas amostras durante este intervalo (10 h e 22 h). Como os valores encontrados para as concentrações das amostras após as 22 h de corrida foram semelhantes aos já obtidos após as 10 h, resolveu-se interromper o experimento nesse momento (após as 22 h), assumindo que o equilíbrio já havia sido atingido. Esses valores de concentração obtidos com 22 h de corrida foram utilizados para a obtenção da isoterma de adsorção do sistema em questão. Já para o segundo sistema, o experimento teve uma duração de 30,5 horas. Como a força iônica do tampão utilizado nesse sistema era menor do que a do sistema anterior, a adsorção foi maior.

Novos experimentos foram realizados no banho agitado, agora utilizando a metodologia do sistema com monitoramento contínuo (vide Capítulo 3). O sistema estudado nesse caso foi a resina Accell Plus QMA com a proteína BSA. A seguir, são apresentadas as curvas cinéticas obtidas.

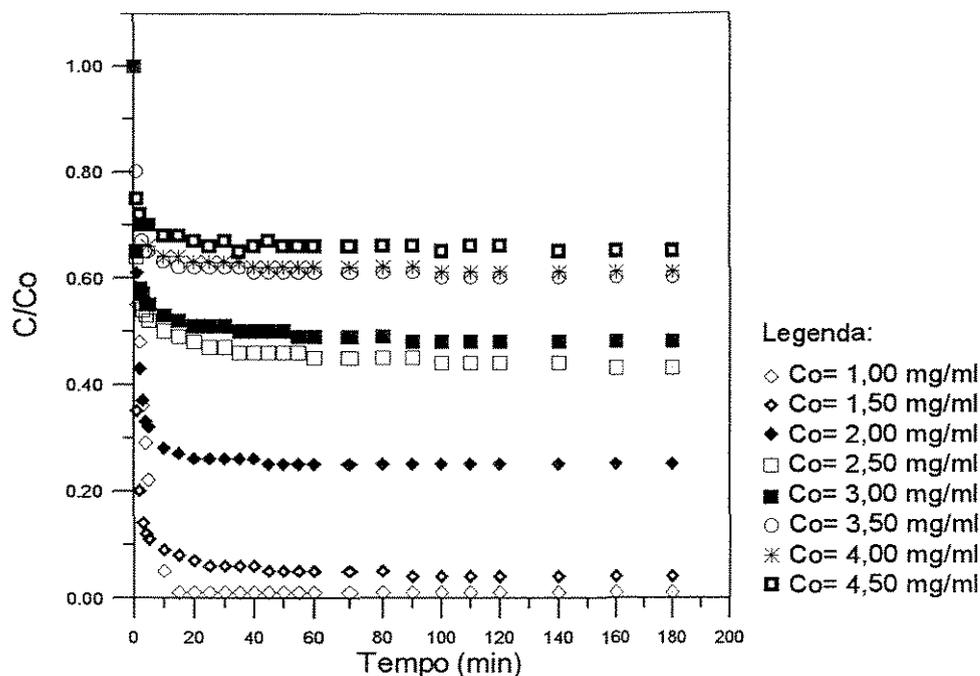


Figura 17: Curvas cinéticas obtidas para várias concentrações iniciais de BSA. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

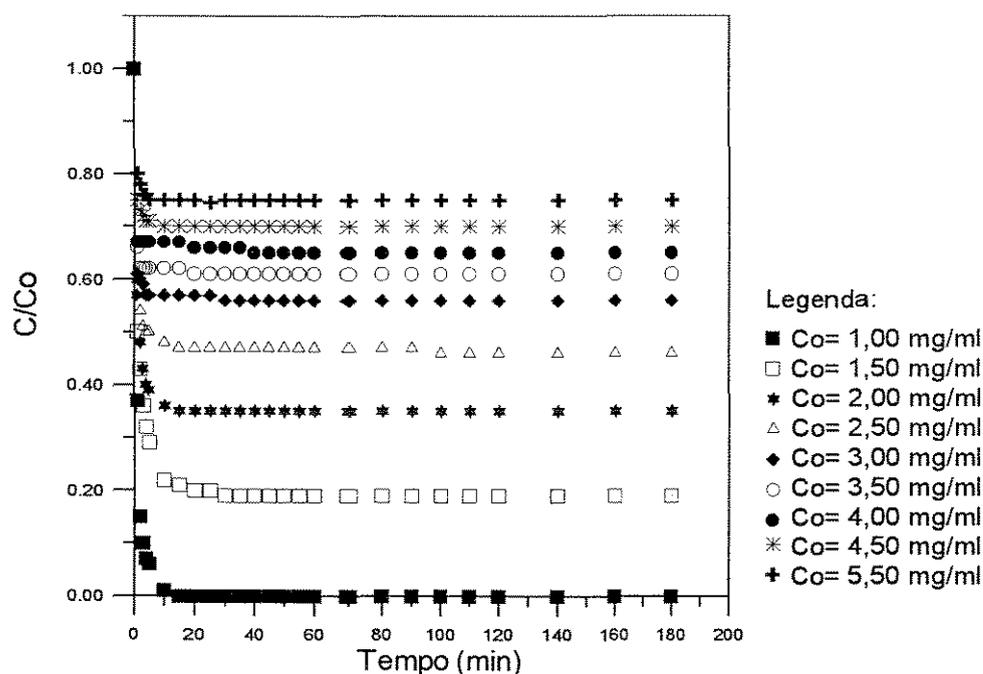


Figura 18: Curvas cinéticas obtidas para várias concentrações iniciais de BSA. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

As condições operacionais adotadas nesses experimentos foram:

- vazão da bomba peristáltica de aproximadamente 5 ml/min.

- velocidade de agitação do banho em torno de 175-200 rpm.
- temperatura do banho na faixa de 296 à 298 K (23 à 25°C).
- velocidade de avanço do papel do registrador variando entre 12 e 30 cm/h.

A velocidade de agitação do banho ficou em torno de 175-200 rpm devido à limitação do próprio sistema. Tentou-se trabalhar com uma agitação maior para garantir que toda a resina ficasse suspensa em solução, mas não foi possível, porque uma maior agitação levava ao aparecimento de um número considerável de bolhas que interferia na leitura da absorbância pelo monitor de UV. Para evitar o aparecimento de bolhas provenientes das próprias soluções, todos os tampões utilizados foram degaseificados com o uso de um banho ultrasônico e de uma bomba de vácuo.

Os dados de tensão lidos ao longo dos experimentos foram convertidos em dados de concentração a partir das expressões (2) e (3) referentes ao sistema estudado com o tampão Tris 0,02 mol/l e 0,03 mol/l pH= 7,0, respectivamente. Essas expressões foram obtidas das calibrações dos sistemas em estudo que encontram-se nas Figuras 11 e 12 apresentadas no Capítulo 3. Com os dados de concentração, pôde-se então construir as curvas cinéticas que são apresentadas nas Figuras 17 e 18. Essas curvas também apresentam patamares bem definidos como as curvas apresentadas na Figura 15. Esses patamares se devem aos diferentes valores de concentrações iniciais das soluções de BSA estudadas. Quanto maior a concentração da solução, menor será a adsorção, pois a resina possui sua capacidade máxima de adsorção. Esse tipo de informação é importante no dimensionamento de adsorvedores, visando a otimização da quantidade de proteína a ser adsorvida.

Os experimentos citados acima tiveram uma duração total de três horas, tempo suficiente para a completa obtenção da curva cinética. Verificou-se que com aproximadamente vinte minutos de corrida, já havia sido atingido praticamente um patamar na curva C/C_0 versus tempo (min), evidenciando uma rápida adsorção do sistema em estudo.

Os sistemas Accell Plus QMA/BSA e Q-Sepharose Fast Flow/BSA foram estudados em solução tampão Tris com concentrações diferentes para que fosse possível avaliar a influência da força iônica no fenômeno da adsorção. A seguir, são

apresentadas duas curvas obtidas para uma mesma concentração inicial de BSA nos dois tampões estudados: Tris 0,02 e 0,03 mol/l pH= 7,0.

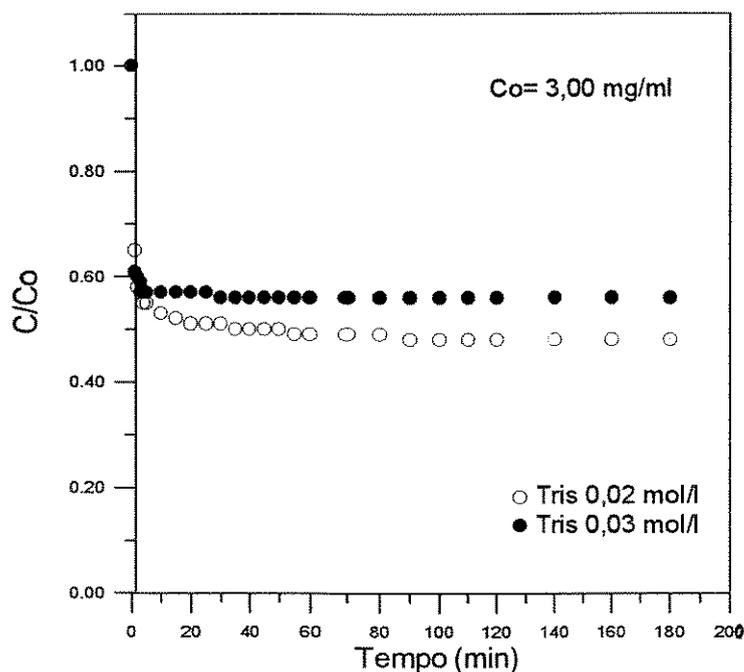


Figura 19: Curvas cinéticas obtidas para uma dada concentração inicial da solução de BSA nos tampões especificados acima, com pH= 7,0 e a resina Accell Plus QMA.

Pelas curvas apresentadas na Figura 19, pode-se concluir que para um tampão com força iônica menor (Tris 0,02 mol/l, no caso), a adsorção da proteína pela resina de troca iônica é maior, levando a uma curva com um patamar mais baixo.

Após terem sido apresentadas todas as curvas cinéticas obtidas com os sistemas em estudo, faz-se necessário agora apresentar as respectivas isotermas de adsorção que representam o equilíbrio para cada sistema estudado.

Para o sistema Q-Sepharose Fast Flow/BSA, as isotermas de adsorção foram construídas a partir dos resultados dos experimentos no sistema com monitoramento não contínuo. Já para o sistema Accell Plus QMA/BSA, as isotermas foram obtidas a partir dos testes de equilíbrio (Capítulo 3) e também a partir dos dados cinéticos, para posterior comparação.

Segundo a literatura (Draeger e Chase, 1990; Horstmann e Chase, 1989), a isoterma de Langmuir ajusta-se bem na adsorção de proteínas em resinas trocadoras de íons. A sua expressão encontra-se no Capítulo 2, Equação (1). O objetivo na

construção da isoterma de adsorção para cada sistema em estudo é a obtenção dos parâmetros q_m e k_d que caracterizam o sistema em termos da capacidade de adsorção de um dado adsorvente em contato com uma certa proteína. Como definido anteriormente, q_m é a quantidade máxima adsorvida na fase sólida e k_d é a constante de dissociação que descreve o equilíbrio. Para o cálculo da quantidade de proteína adsorvida na fase sólida, q^* , utilizou-se a seguinte expressão:

$$q^* = \frac{(c_o - c^*)V_{sol}}{m_{ads}} \quad (4)$$

Na Equação (4), c_o é a concentração inicial da solução de proteína (mg/ml), c^* é a concentração de proteína na fase líquida em equilíbrio (mg/ml), V_{sol} é o volume de solução utilizado (ml) e m_{ads} é a massa de adsorvente utilizada (g). Dessa forma, q^* é expressa em mg de proteína por g de adsorvente. Essa equação foi obtida através de um balanço de massa na fase líquida.

As massas de adsorvente utilizadas encontram-se tabeladas a seguir e o volume de solução foi de 100 ml e 110 ml para os tampões Tris 0,2 e 0,01 mol/l pH= 7,0.

Tabela 2: Dados das massas do adsorvente Q-Sepharose Fast Flow utilizadas nos experimentos do sistema com monitoramento não contínuo.

Co (mg/ml)	Massa de adsorvente (g)	
	Tris 0,2 mol/l	Tris 0,01 mol/l
0,25	0,3087	1,1314
0,35	0,3376	1,1291
0,50	0,3153	1,1334
0,75	0,3156	1,1356
1,00	0,3096	1,1318
1,50	0,3042	1,1384
2,00	0,3217	1,1347
2,50	-	1,1393
3,00	0,3054	1,1397

A seguir, são apresentadas duas tabelas contendo os dados utilizados para a construção das isotermas de adsorção para o sistema em questão.

Tabela 3: Dados utilizados para a construção da isoterma de adsorção do sistema Q-Sepharose Fast Flow/BSA em tampão Tris 0,2 mol/l pH= 7,0.

Co (mg/ml)	c* (mg/ml)	q* (mg de BSA/g de ads)
0	0	0
0,25	0,005	79,37
0,35	0,0665	83,98
0,50	0,165	106,25
0,75	0,375	118,82
1,00	0,65	113,05
1,50	1,155	113,41
2,00	1,62	118,12

Tabela 4: Dados utilizados para a construção da isoterma de adsorção do sistema Q-Sepharose Fast Flow/BSA em tampão Tris 0,01 mol/l pH= 7,0.

Co (mg/ml)	c* (mg/ml)	q* (mg de BSA/g de ads)
0	0	0
1,50	0,30	115,95
2,00	0,77	119,24
2,50	1,28	117,79
3,00	1,74	121,61

Os dados de c^* e q^* referentes as concentrações iniciais de BSA entre 0,25 e 1,00 mg/ml não foram apresentados na Tabela 4 porque foram todos nulos, não contribuindo dessa forma na construção da respectiva isoterma.

Com os dados de c^* e q^* apresentados, pôde-se então construir as isotermas de adsorção equivalentes.

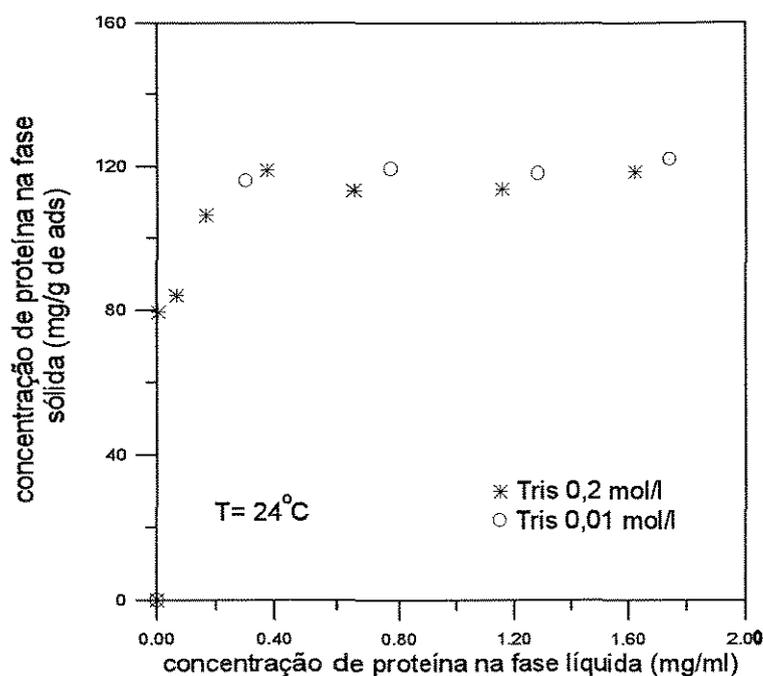


Figura 20: Isotermas de adsorção para o sistema Q-Sepharose Fast Flow/BSA nos referidos tampões com pH= 7,0.

Pode ser observado pela Figura 20 que não há uma clara diferença entre as isotermas de adsorção obtidas para o mesmo sistema utilizando somente soluções tampões com concentrações diferentes. Nesse caso, somente através da determinação dos parâmetros das isotermas, é possível verificar a influência da força iônica no meio. Segundo o artigo de Leaver, Conder e Howell (1990), a concentração de sal no sistema tem um profundo efeito sobre a distribuição da proteína entre as fases. Quando a força iônica é maior, há um maior número de íons cloreto em solução competindo com a proteína, levando a uma menor adsorção. Isso significa que o valor de q_m será menor.

Os parâmetros q_m e k_d de cada isoterma foram obtidos através de um programa computacional de regressão não linear utilizando o método Simplex. A seguir, é apresentada uma tabela contendo os valores obtidos.

Tabela 5: Valores obtidos para os parâmetros q_m e k_d . Sistema: Q-Sepharose Fast Flow/BSA.

Tampão Tris 0,2 mol/l pH= 7,0			Tampão Tris 0,01 mol/l pH= 7,0		
q_m (mg/g de ads)	k_d (mg/ml)	coeficiente de determinação	q_m (mg/g de ads)	k_d (mg/ml)	coeficiente de determinação
110,51	0,0023	0,9373	120,96	0,0131	0,9994

Pelos valores de q_m apresentados na Tabela 5, verifica-se uma pequena influência da força iônica no meio, com um desvio de 9,5% no valor para o tampão de força iônica maior.

Nos testes de equilíbrio realizados com o sistema Accell Plus QMA/BSA para a obtenção das isotermas, o volume de solução utilizado foi de 100 ml, a massa de adsorvente foi de 500 mg e a duração foi de aproximadamente 60 horas (mais detalhes vide Capítulo 3). A faixa de concentrações utilizadas foi de 1,00 à 4,50 mg/ml para as soluções de BSA preparadas em tampão Tris 0,02 mol/l e de 1,00 à 5,00 mg/ml para os tampões Tris 0,03 e 0,05 mol/l pH= 7,0. Os valores das concentrações de equilíbrio, c^* , foram obtidas através dos valores das absorbâncias das amostras, com o auxílio das curvas de calibração das soluções de BSA previamente feitas. Para o sistema utilizando o tampão Tris 0,02 mol/l, utilizou-se a curva equivalente a Figura 6, para o Tris 0,03 mol/l, utilizou-se a Figura 7 e finalmente para o tampão Tris 0,05 mol/l, utilizou-se a curva equivalente a Figura 8. Com essas informações, foi possível calcular os respectivos valores de q^* através da expressão (4) mostrada anteriormente.

Além das isotermas de adsorção obtidas através dos testes de equilíbrio, foram construídas também as isotermas para os mesmos sistemas estudados, utilizando os dados cinéticos obtidos com os experimentos no sistema com monitoramento contínuo com duração de 3 horas. O cálculo de q^* nesse caso também foi feito utilizando a expressão (4).

A seguir, são apresentadas as tabelas com os dados de equilíbrio e também as isotermas correspondentes para o sistema Accell Plus QMA/BSA nos tampões Tris 0,02; 0,03 e 0,05 mol/l pH= 7,0.

Tabela 6: Dados utilizados para a construção das isotermas de adsorção do sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

Co (mg/ml)	Dados cinéticos		Teste de equilíbrio	
	c* (mg/ml)	q* (mg/g de ads)	c* (mg/ml)	q* (mg/g de ads)
0	0	0	0	0
1,00	0,01	198	0,005	199
1,50	0,06	288	0,11	278
2,00	0,50	300	0,55	290
2,50	1,09	282	1,04	292
3,00	1,43	314	1,56	288
3,50	2,09	282	2,04	292
4,00	2,44	312	2,49	302
4,50	2,94	312	2,87	326

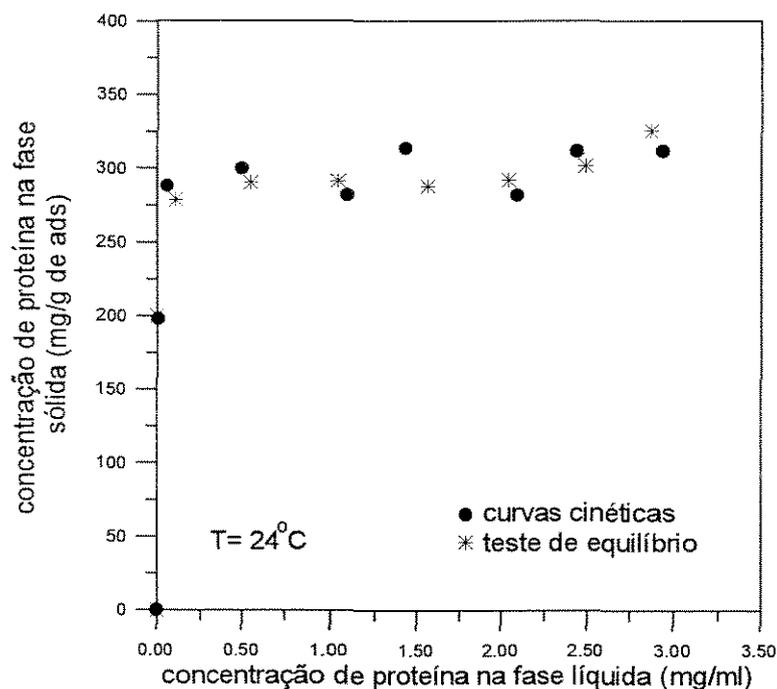


Figura 21: Isotermas de adsorção para o sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

As isotermas de adsorção apresentadas na Figura 21 seguem o comportamento do tipo Langmuir. É interessante notar que essas curvas possuem uma elevação brusca

na região inicial do gráfico. Mesmo para concentrações bem baixas, a quantidade de proteína adsorvida (q^*) é bastante elevada, indicando uma alta afinidade entre o adsorvente e a proteína em estudo.

Da mesma forma que no sistema estudado anteriormente, utilizou-se um programa computacional de regressão não linear para a determinação dos parâmetros q_m e k_d da isoterma. Uma tabela apresentando os valores desses parâmetros para o sistema em questão é apresentada a seguir.

Tabela 7: Valores obtidos para os parâmetros q_m e k_d . Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

Dados cinéticos			Teste de equilíbrio		
q_m (mg/g de ads)	k_d (mg/ml)	coeficiente de determinação	q_m (mg/g de ads)	k_d (mg/ml)	coeficiente de determinação
302,66	0,0051	0,9854	297,04	0,0025	0,9854

Os valores de q_m obtidos com as duas sistemáticas de cálculo (dados cinéticos até 3 horas e teste de equilíbrio com aproximadamente 60 horas) conduziram essencialmente aos mesmos resultados. Isso significa que o equilíbrio é atingido rapidamente. Isso pode ser explicado pelos baixos valores obtidos para a constante de dissociação, k_d , que representa a razão entre a constante de dessorção e a de adsorção. Valores pequenos para k_d significam que a constante de adsorção é bem maior do que a constante de dessorção, indicando que a adsorção ocorre rapidamente e que conseqüentemente o equilíbrio também é atingido rapidamente.

Tabela 8: Dados utilizados para a construção das isotermas de adsorção do sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

Co (mg/ml)	Dados cinéticos		Teste de equilíbrio	
	c* (mg/ml)	q* (mg/g de ads)	c* (mg/ml)	q* (mg/g de ads)
0	0	0	0	0
1,00	0,005	199	0,02	196
1,50	0,28	244	0,27	246
2,00	0,69	262	0,68	264
2,50	1,16	268	1,17	266
3,00	1,69	262	1,69	262
3,50	2,12	276	2,15	270
4,00	2,60	280	2,64	272
4,50	3,14	272	-	-
5,50	4,10	280	-	-

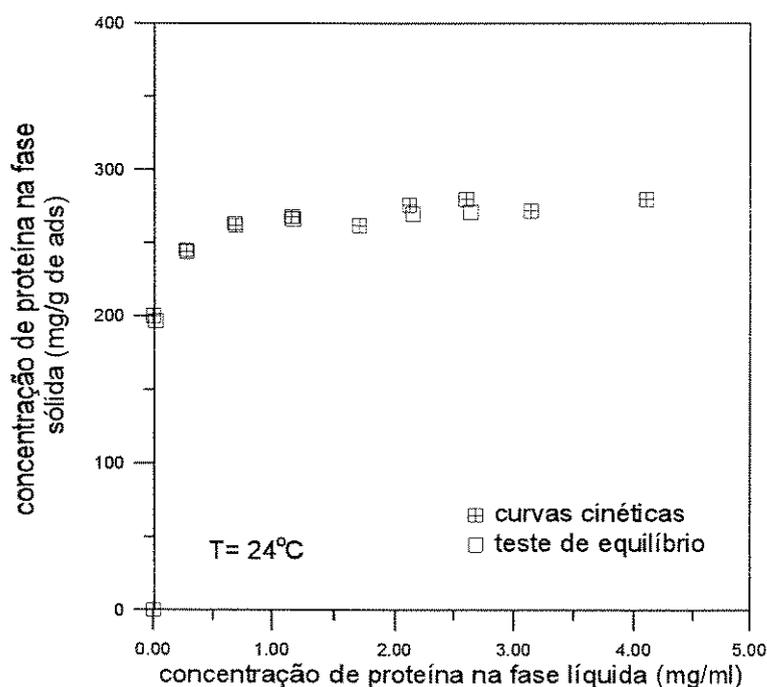


Figura 22: Isotermas de adsorção para o sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

Os parâmetros das isotermas foram obtidos através do procedimento já citado.

Tabela 9: Valores obtidos para os parâmetros q_m e k_d . Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

Dados cinéticos			Teste de equilíbrio		
q_m (mg/g de ads)	k_d (mg/ml)	coeficiente de determinação	q_m (mg/g de ads)	k_d (mg/ml)	coeficiente de determinação
268,55	0,0018	0,9858	265,95	0,0073	0,9959

Os valores de q_m obtidos para o sistema em questão foram bem próximos (indicando que o equilíbrio foi atingido com apenas 3 horas de corrida) e inferiores aos obtidos para o sistema que trabalhou com o tampão Tris 0,02 mol/l. Isso é explicado pelo fato da força iônica do tampão utilizado no sistema em questão ser maior (Tris 0,03 mol/l), levando dessa forma, a uma menor adsorção.

Tabela 10: Dados utilizados para a construção das isotermas de adsorção do sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,05 mol/l pH= 7,0.

Co (mg/ml)	Teste de equilíbrio	
	c^* (mg/ml)	q^* (mg/g de ads)
0	0	0
1,00	0,18	164
1,50	0,56	188
2,00	1,06	188
2,50	1,43	214
3,00	1,87	226
3,50	2,43	214

Verifica-se que para todos os casos (vide Tabelas 3, 4, 6, 8 e 10) à medida que se aumenta a concentração de proteínas, a quantidade de proteína não-adsorvida aumenta, indicando que o conveniente é se trabalhar com soluções diluídas.

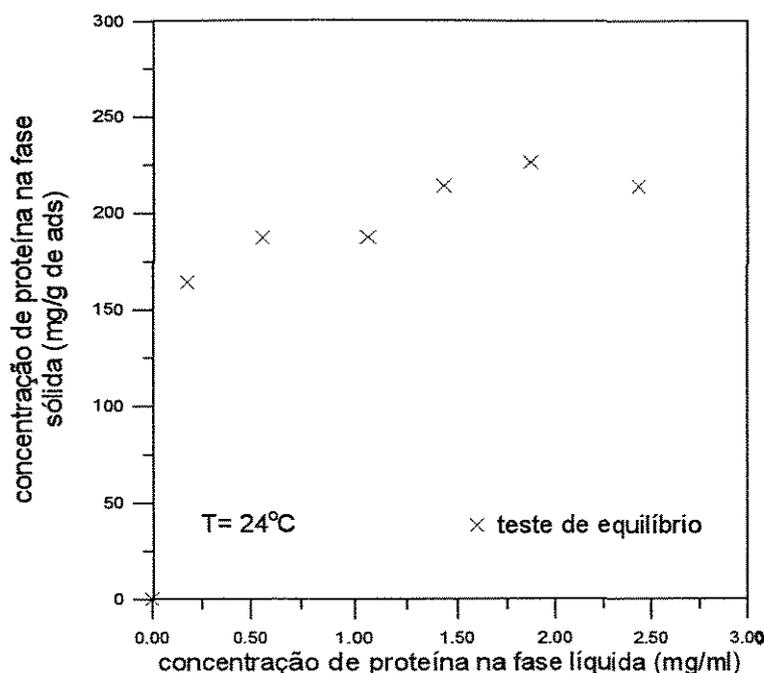


Figura 23: Isoterma de adsorção para o sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,05 mol/l pH= 7,0.

Tabela 11: Valores obtidos para os parâmetros q_m e k_d . Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,05 mol/l pH= 7,0.

Teste de equilíbrio		
q_m (mg/g de ads)	k_d (mg/ml)	coeficiente de determinação
219,02	0,0679	0,9826

O valor de q_m encontrado para o sistema em questão foi inferior tanto ao obtido para o sistema com tampão Tris 0,02 mol/l (Tabela 7), como para o sistema com tampão Tris 0,03 mol/l (Tabela 9). Isso é justificado pela influência da força iônica sobre o fenômeno da adsorção.

A Figura 24 que é apresentada a seguir corresponde a todas as isotermas de adsorção juntas, obtidas através dos testes de equilíbrio para o sistema estudado: Accell Plus QMA/BSA nos tampões Tris 0,02; 0,03 e 0,05 mol/l pH= 7,0. A influência da força iônica no fenômeno da adsorção é evidenciada pelas diferenças entre as curvas apresentadas.

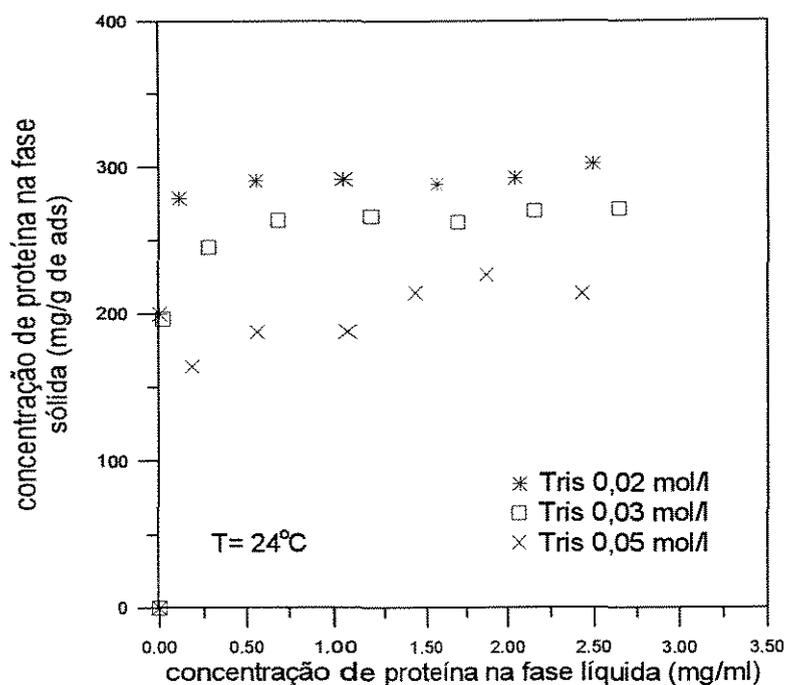


Figura 24: Isotermas de adsorção para o sistema Accell Plus QMA/BSA nos referidos tampões com pH= 7,0. (resultados dos testes de equilíbrio)

4.2. Experimentos em Coluna de Adsorção

Antes da realização dos experimentos na coluna de adsorção para a obtenção das curvas de *breakthrough* e das isotermas de adsorção, foram realizados testes de expansão do leito. Através desses testes, foi possível definir as vazões de trabalho para cada situação em que se desejava trabalhar. Mais detalhes são apresentados no Capítulo 3 no tópico 3.3.2.1.. As curvas são apresentadas como altura do leito (cm) versus velocidade superficial (cm/h). Para o cálculo das velocidades superficiais a partir das vazões volumétricas, foi utilizada a área da seção transversal da coluna que corresponde a 2,01 cm².

A seguir, são apresentadas as curvas equivalentes aos testes de expansão realizados com a bomba peristáltica e a bomba de pistão, respectivamente. Para a realização desses testes de expansão utilizou-se o tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0 como fluido.

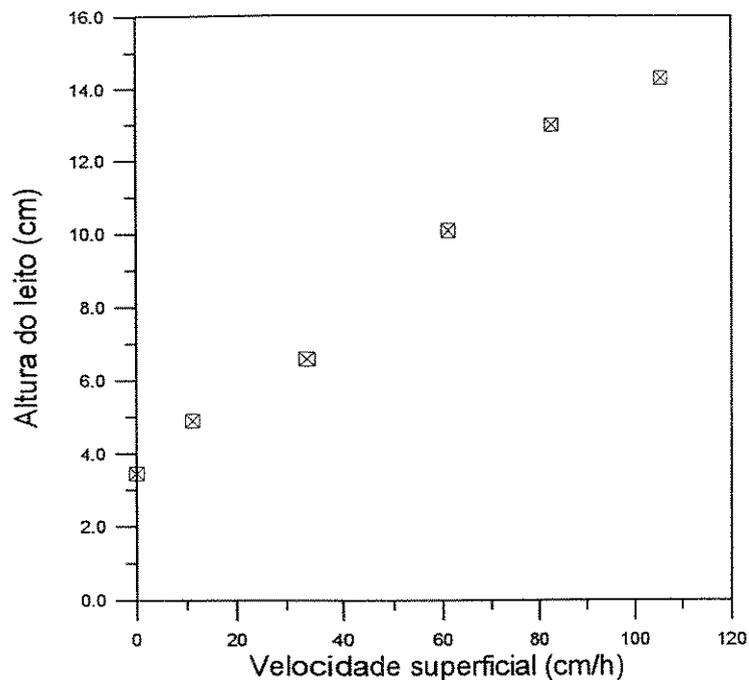


Figura 25: Teste de expansão do leito realizado com a bomba peristáltica.

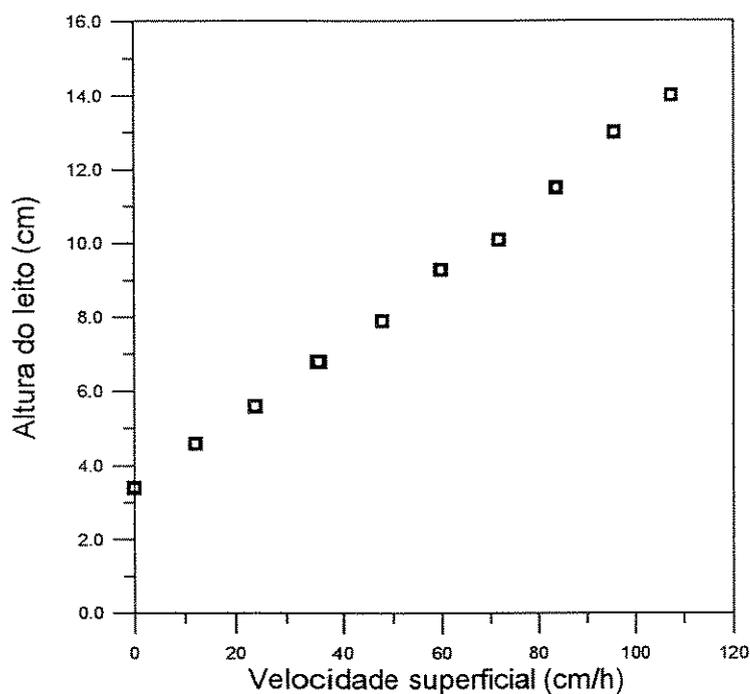


Figura 26: Teste de expansão do leito realizado com a bomba de pistão.

Nas corridas realizadas na coluna de adsorção com leitos fixo e fluidizado, apenas o sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0 foi estudado. Foram utilizadas concentrações iniciais das soluções de BSA na faixa de 0,5 à 4,00 mg/ml. A altura do leito fixo empacotado com a massa de adsorvente estipulada

(3,3 g) foi de 3,4 cm e as alturas do leito adotadas para a fluidização foram: 6,6 e 10,1 cm. As velocidades superficiais necessárias para a fluidização foram estimadas a partir dos testes de expansão (vide Figuras 25 e 26). Mais detalhes são apresentados no Capítulo 3 no tópico 3.3.2.2..

Experimentos iniciais foram realizados utilizando uma bomba peristáltica para circular a solução de proteína pelo sistema. Ao longo dos experimentos com leito fluidizado, constatou-se uma grande dificuldade para manter a expansão do leito com o uso dessa bomba, logo ela foi substituída por uma outra do tipo pistão. A bomba pistão utilizada forneceu valores de vazão mais confiáveis do que os obtidos através da bomba peristáltica.

Uma curva de *breakthrough* típica apresenta uma forma do tipo degrau. Inicialmente, a concentração de proteína na saída da coluna (aonde é feito o monitoramento) é nula e a curva toca no eixo das abscissas, indicando que a resina está adsorvendo toda a proteína que passa pelo leito. Após algum tempo, a resina começa a atingir a saturação, iniciando-se a passagem de proteína não adsorvida pelo leito. Verifica-se nesse momento a elevação brusca da curva, até o ponto em que a resina já se encontra saturada e a concentração da solução na saída da coluna passa a ser a concentração inicial da solução utilizada.

Durante as corridas com leito fluidizado, a vazão fornecida pela bomba foi alterada para garantir a expansão do leito. No caso do leito fixo, esse procedimento não foi necessário. Conseqüentemente, os experimentos com o leito fixo foram muito mais longos do que os respectivos com o leito fluidizado (Para $C_0 = 1,00$ mg/ml, a corrida com leito fixo durou aproximadamente 12 horas, enquanto que a com leito fluidizado ($h = 10,1$ cm) durou apenas 2,6 horas).

Alguns problemas operacionais dificultaram a realização dos experimentos. A fluidização do sistema nem sempre foi boa durante as corridas. Algumas vezes havia um acúmulo de resina no topo da coluna, dificultando uma homogeneização do leito.

As curvas de *breakthrough* obtidas para diferentes concentrações iniciais das soluções de BSA em diferentes alturas do leito são apresentadas a seguir.

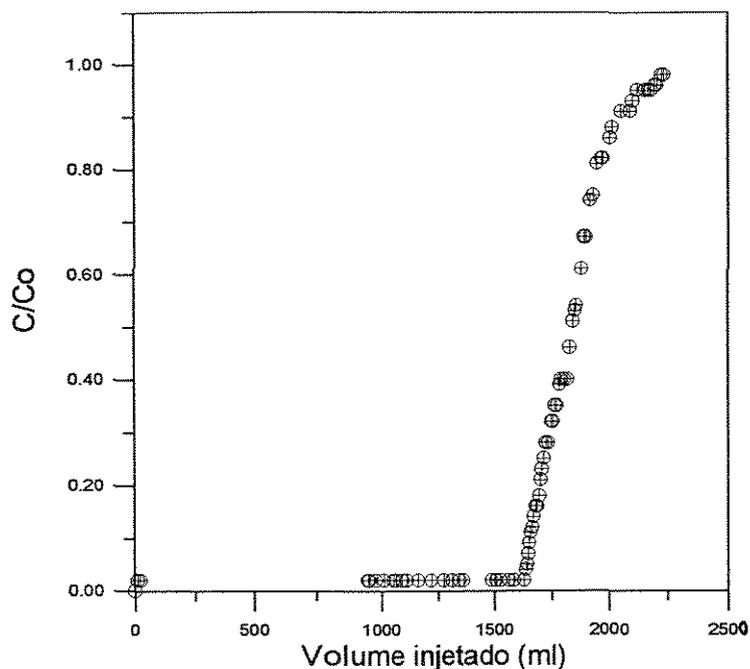


Figura 27: Curva de *breakthrough* obtida para leito fixo ($h = 3,4$ cm). Solução de BSA com concentração inicial igual à $0,50$ mg/ml.

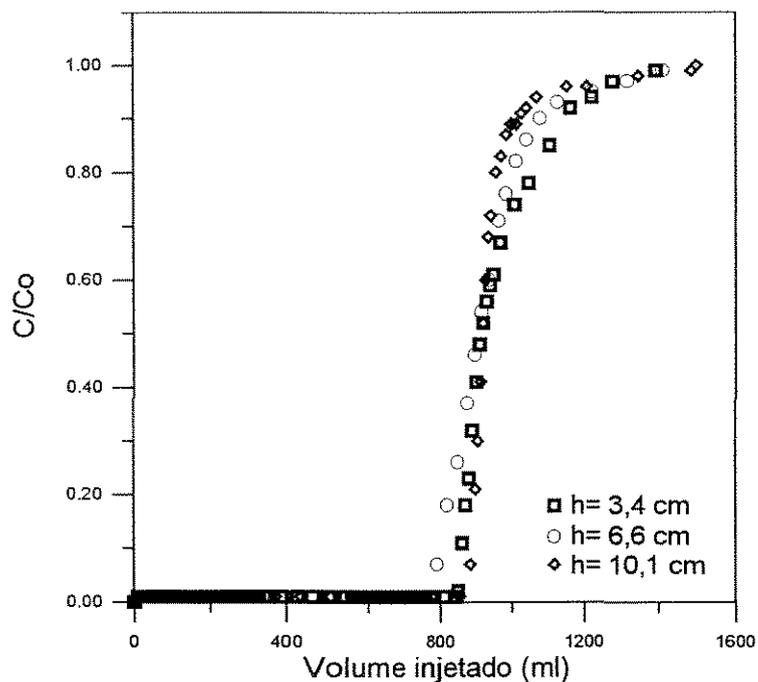


Figura 28: Curvas de *breakthrough* obtidas para diferentes alturas do leito. Solução de BSA com concentração inicial igual à $1,00$ mg/ml.

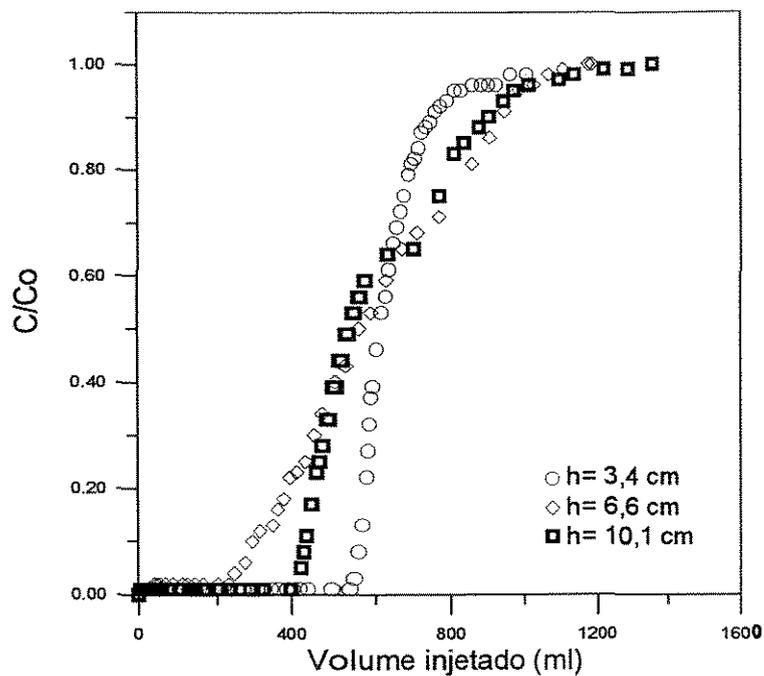


Figura 29: Curvas de *breakthrough* obtidas para diferentes alturas do leito. Solução de BSA com concentração inicial igual à 1,50 mg/ml.

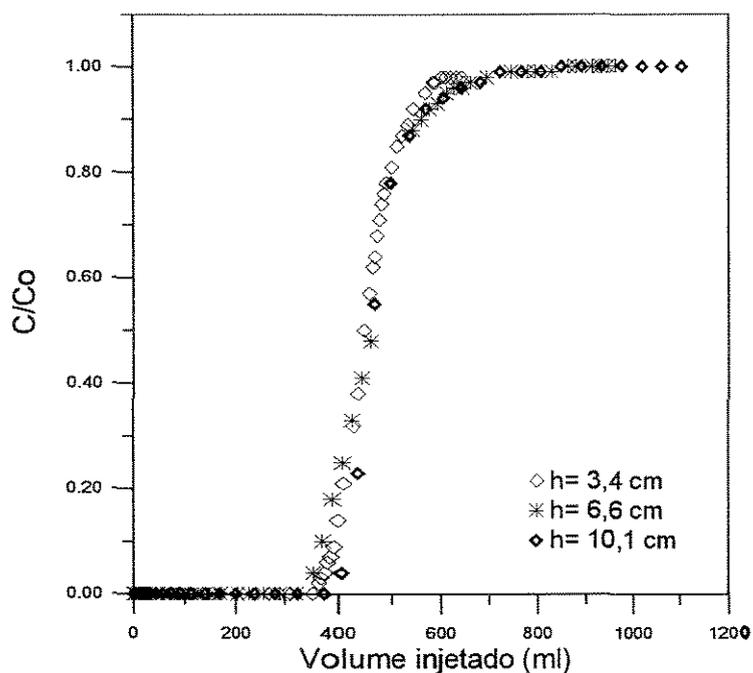


Figura 30: Curvas de *breakthrough* obtidas para diferentes alturas do leito. Solução de BSA com concentração inicial igual à 2,00 mg/ml.

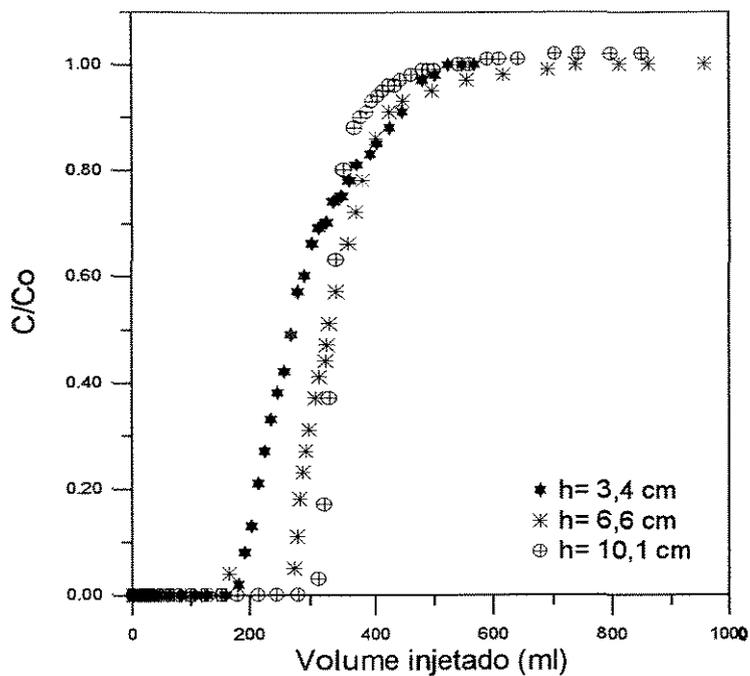


Figura 31: Curvas de *breakthrough* obtidas para diferentes alturas do leito. Solução de BSA com concentração inicial igual à 3,00 mg/ml.

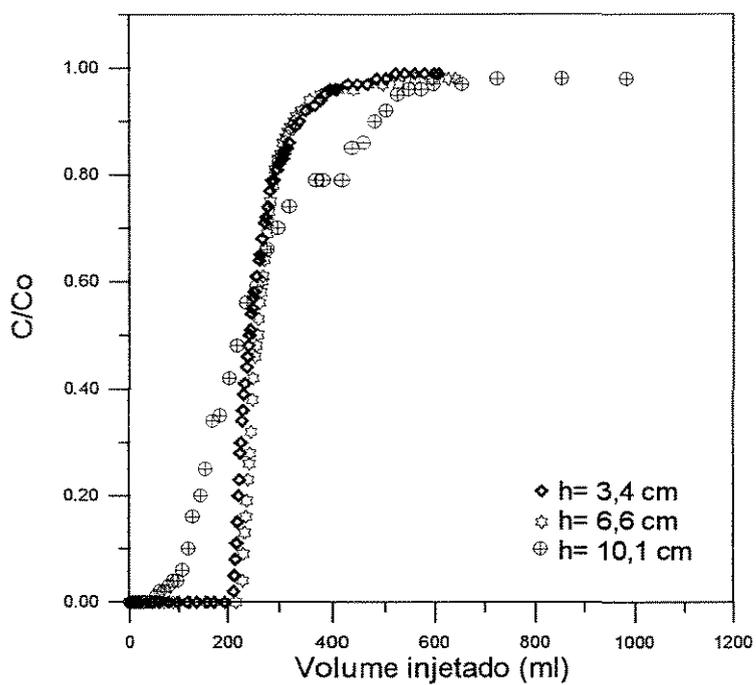


Figura 32: Curvas de *breakthrough* obtidas para diferentes alturas do leito. Solução de BSA com concentração inicial igual à 4,00 mg/ml.

Pode-se observar através das curvas apresentadas que à medida que se aumenta a concentração de BSA, o ponto de ruptura (ponto onde começa a elevação brusca da curva - *breakthrough*) é mais rapidamente atingido.

Após a obtenção de várias curvas de *breakthrough* para concentrações iniciais diferentes das soluções de BSA com diferentes alturas do leito, foi possível partir para a obtenção das respectivas isothermas de adsorção.

A técnica geralmente empregada para a determinação das isothermas de adsorção utilizando uma coluna cromatográfica é a de análise frontal, apresentada anteriormente no tópico 2.3.2. (Capítulo 2). O método de cálculo que permite a obtenção da isoterma se baseia nas considerações que se seguem e se baseia no trabalho de James et al (1954):

A coluna previamente equilibrada com solução tampão é percolada por uma solução de concentração c_o . Conforme a Figura 33 (apresentada a seguir), o equilíbrio é atingido quando a concentração na saída da coluna é c_o . Por um balanço de massa integral a concentração q^* do soluto adsorvido na fase estacionária e que está em equilíbrio com c_o é dada por:

$$q^* = \frac{c_o (V_f - V_m) - \int_{V_m}^{V_f} C dV}{m_{ads}} \quad (5)$$

Na Equação (5), a integral representa a área sob a curva de um gráfico de concentração da solução efluente em função do volume de solução injetada, enquanto que V_f corresponde ao volume injetado até que C seja igual a c_o na solução efluente. V_m é o volume morto do sistema, correspondente ao volume ocupado inicialmente pela solução nos tubos de entrada e no interior da coluna.

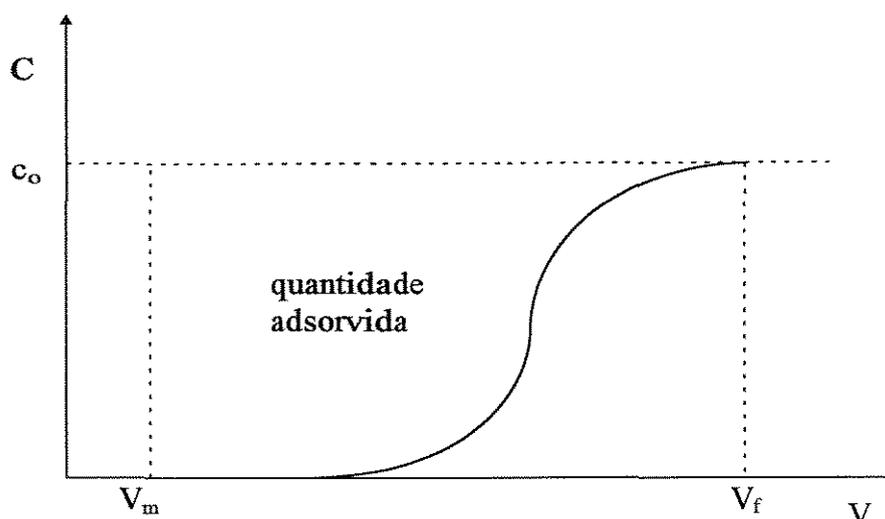


Figura 33: Determinação do equilíbrio por análise frontal.

A Figura 33 mostra o esquema de integração representativo da Equação (5). A curva de equilíbrio a uma dada temperatura (isoterma de adsorção) é portanto a função $q(c_o)$ que corresponde a q^* .

No conjunto de experimentos realizados, o valor de V_m foi desprezível diante de V_f .

Tabela 12a: Dados de volume final injetado (V_f) e da área sob a curva. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

	concentração inicial da solução de BSA, c_o (mg/ml)								
	0,50			1,00			1,50		
h_{leito} (cm)	3,4	6,6	10,1	3,4	6,6	10,1	3,4	6,6	10,1
V_f (ml)	2233,4	-	-	1391,0	1409,2	1496,3	1005,9	1173,6	1355
área	210,2	-	-	434,3	486,9	560,4	552,3	861,0	1102

Tabela 12b: Dados de volume final injetado (V_f) e da área sob a curva. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

	concentração inicial da solução de BSA, c_o (mg/ml)								
	2,00			3,00			4,00		
h_{leito} (cm)	3,4	6,6	10,1	3,4	6,6	10,1	3,4	6,6	10,1
V_f (ml)	640,5	860,9	846,8	523,0	738,3	539,9	606,5	639,3	981,6
área	373,3	789,4	745,0	696,4	1195,5	596,5	1371,6	1455,0	2854

Os dados apresentados nas Tabelas 12a e 12b referentes a área sob a curva foram obtidos através da integração da curva C (mg/ml) versus volume injetado (ml) para cada sistema estudado.

Sabendo-se que a massa de resina empacotada na coluna foi aproximadamente a mesma para todos os experimentos (3,3 g), pôde-se calcular a quantidade de proteína adsorvida por massa de adsorvente, q^* , através da Equação (5).

Tabela 13: Dados da quantidade de proteína adsorvida por massa de adsorvente, q^* . Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

Quantidade de proteína adsorvida por massa de adsorvente, q^* (mg de BSA/g de ads)			
c_o (mg/ml)	Altura do leito, h (cm)		
	3,4 (leito fixo)	6,6	10,1
0,50	273,52	-	-
1,00	288,67	278,29	282,39
1,50	288,62	271,38	280,76
2,00	273,78	281,34	286,22
3,00	263,30	307,59	308,73
4,00	318,15	332,57	323,58

Com os dados apresentados na Tabela 13, pôde-se finalmente construir as isotermas de adsorção para cada altura do leito. No caso dos experimentos na coluna de adsorção, a concentração de equilíbrio na fase líquida é dada por c_o e não por c^* como nos experimentos em tanque agitado.

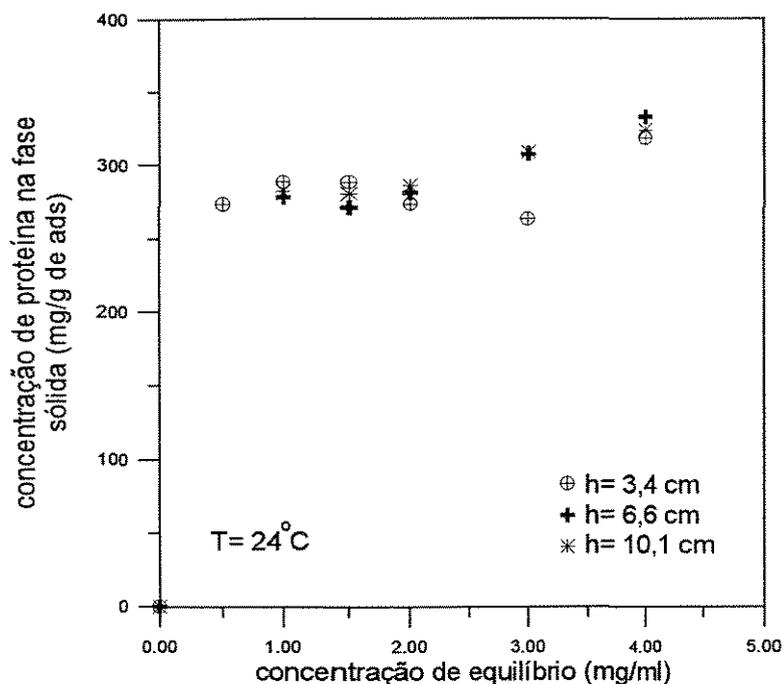


Figura 34: Isotermas de adsorção obtidas na coluna com leitos fixo e fluidizado. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

Pela Figura 34, pode-se supor que a adsorção da proteína BSA pela resina Accell Plus numa coluna de adsorção é semelhante trabalhando-se tanto com leito fixo quanto com leito fluidizado.

Os parâmetros q_m e k_d de cada isoterma foram calculados segundo o procedimento já citado.

Tabela 14: Valores obtidos para os parâmetros q_m e k_d . Sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0 - coluna de adsorção.

Altura do leito (cm)	q_m (mg/g de ads)	k_d (mg/ml)	coeficiente de determinação
3,4	291,50	0,0322	0,9762
6,6	340,31	0,2944	0,9881
10,1	330,05	0,2121	0,9943

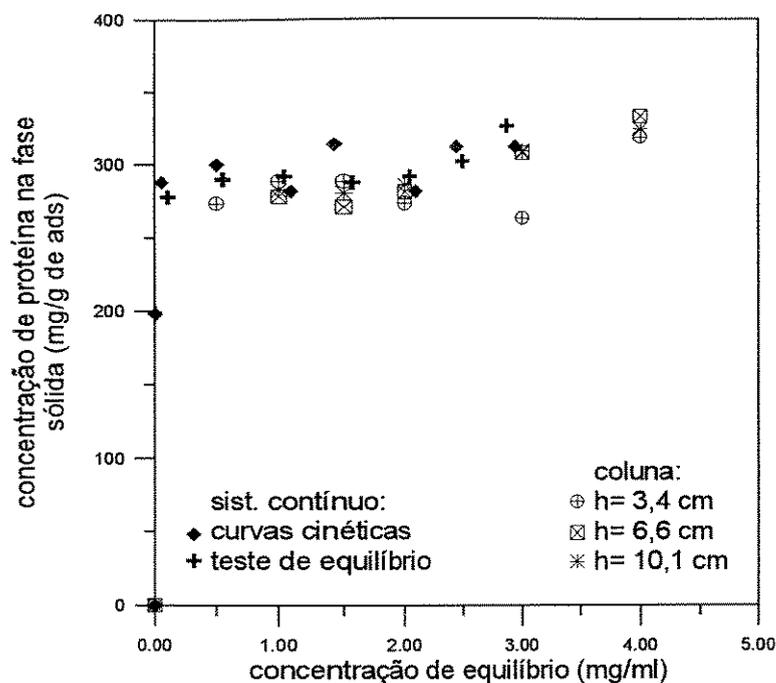


Figura 35: Isotermas de adsorção obtidas na coluna e no sistema contínuo. Sistema Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

As curvas *breakthrough* apresentadas neste trabalho correspondem à gráficos do tipo concentração versus volume injetado e foram obtidas a partir de experimentos realizados em uma coluna de adsorção. Uma curva *breakthrough* pode corresponder também a um gráfico do tipo concentração versus tempo. A seguir, é ilustrada uma curva deste tipo.

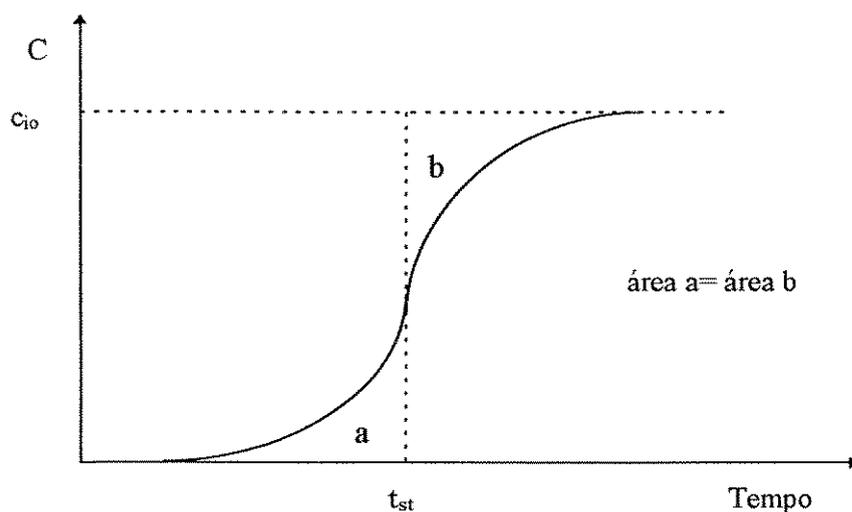


Figura 36: Curva *breakthrough* - definição do tempo estequiométrico, $(t_{st})_{teo}$.

Na Figura 36, é apresentado um novo parâmetro que caracteriza a adsorção de proteínas em colunas de adsorção - o tempo estequiométrico, t_{st} . Esse parâmetro é definido como o ponto no eixo das abscissas que gera áreas iguais de um lado e do outro da curva, como ilustrado na figura.

A determinação do tempo estequiométrico teórico é feita através de um balanço de massa na coluna de adsorção. Esse balanço corresponde à:

$$Fc_{io}t_{st} = \varepsilon c_{io} V + (1 - \varepsilon)q_{io} V \quad (6)$$

Explicitando t_{st} :

$$t_{st} = \frac{\varepsilon V}{F} + \frac{(1 - \varepsilon)q_{io} V}{c_{io} F} \quad (7)$$

Na Equação (7), tem-se que: ε é a porosidade do leito; V é o volume do leito que corresponde ao produto da área da seção transversal da coluna com a altura do leito; F é a vazão volumétrica da solução de proteína que pode ser expressa em termos da velocidade superficial (razão entre a vazão e a área da seção transversal da coluna); c_{io} corresponde a concentração na saída da coluna quando o equilíbrio é atingido e q_{io} corresponde a concentração de proteína na fase sólida em equilíbrio com c_{io} .

Fazendo-se algumas substituições, tem-se que:

$$t_{st} = \tau^* \{1 + \xi_m\} \quad (8)$$

em que:

$$\tau^* = \frac{\varepsilon h}{u_o} \quad (9)$$

$$\xi_m = \frac{(1 - \varepsilon)q_{io}}{\varepsilon c_{io}} \quad (10)$$

Na Equação (8), ξ_m é denominado de fator de capacidade e τ^* é denominado de tempo de passagem. Na Equação (9), h é altura do leito e u_o é a velocidade superficial do fluido.

A vazão fornecida pela bomba nos experimentos com leito fluidizado foi alterada ao longo dos experimentos, logo só foi possível calcular $(t_{st})_{teo}$ para os experimentos com leito fixo.

Os valores de q_{i0} foram obtidos a partir dos dados de equilíbrio e também dos dados cinéticos dos experimentos realizados em tanque agitado (vide Tabela 6). A altura correspondente ao leito fixo é de 3,4 cm, a área da seção transversal da coluna é de 2,01 cm² e a porosidade do leito foi calculada segundo a expressão:

$$\varepsilon = 1 - \frac{m_{ads}/\rho_{ads}}{Ah} \quad (11)$$

em que:

m_{ads} = massa de adsorvente (g);

ρ_{ads} = massa específica do adsorvente (g/cm³);

A = área da seção transversal da coluna (cm²);

h = altura do leito (cm).

O valor obtido para a porosidade do leito fixo foi de 0,58.

Tabela 15: Dados necessários para o cálculo de $(t_{st})_{teo}$. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0 - coluna de adsorção (leito fixo).

c_{i0} (mg/ml)	F (ml/min)	u_0 (cm/min)	q_{i0} (mg/g de ads)		q_{i0} (mg/ml)	
			equilíb.	cinética.	equilíb.	cinética.
1,00	2,10	1,045	199,0	198,0	230,8	229,7
1,50	2,10	1,045	278,7	288,0	323,3	334,1
2,00	2,12	1,055	290,4	300,0	336,9	348,0
3,00	2,07	1,03	288,0	314,0	334,1	364,2
4,00	2,10	1,045	301,8	312,0	350,1	361,9

A determinação do tempo estequiométrico experimental, $(t_{st})_{exp}$, foi feita a partir da análise das curvas de *breakthrough* obtidas nos experimentos. A seguir, é apresentada uma figura semelhante a Figura 36 mostrada anteriormente.

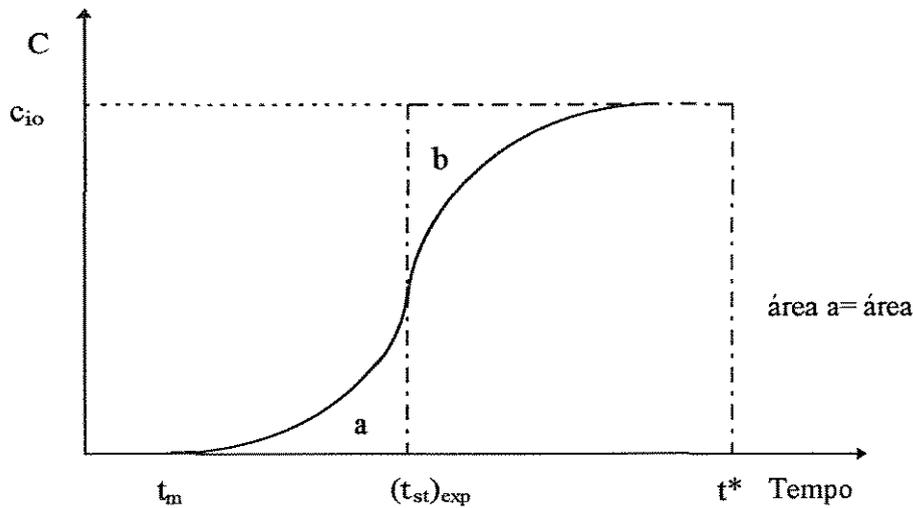


Figura 37: Curva *breakthrough* - determinação do tempo estequiométrico, $(t_{st})_{exp}$.

O tempo estequiométrico teórico é definido como o ponto no eixo das abscissas que gera áreas iguais, como mostrado na figura acima (área a = área b). A determinação experimental desse parâmetro foi feita supondo-se que existe um dado t^* tal que a área do retângulo $c_{io}(t^* - t_{st})$ (vide Figura 37) seja igual a área sob a curva de *breakthrough*. Esse t^* corresponde ao tempo em que a concentração na saída da coluna é igualada à concentração inicial da solução de proteína, c_o .

Logo:

$$c_{io} (t^* - t_{st}) = \int_{t_m}^{t^*} C dt \quad (12)$$

Como as curvas obtidas experimentalmente são dadas em concentração (mg/ml) versus volume injetado (ml) e não em tempo (min), a Equação (12) teve que ser rearranjada. Logo:

$$(t_{st})_{exp} = \frac{V^* c_{io} - \int_{V_m}^{V^*} C dV}{c_{io} F} \quad (13)$$

Na Equação (13), V^* corresponde ao volume final injetado de solução na coluna (V_f). A seguir, será apresentada uma tabela contendo os dados necessários para o cálculo de $(t_{st})_{exp}$.

Tabela 16: Dados necessários para o cálculo de $(t_{st})_{exp}$. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0 - coluna de adsorção.

c_{io} (mg/ml)	V_f (ml)	F (ml/min)	Área
1,00	1391,0	2,10	434,3
1,50	1005,9	2,10	552,3
2,00	640,5	2,12	373,3
3,00	523,0	2,07	696,4
4,00	606,5	2,10	1371,6

O tempo estequiométrico teórico, $(t_{st})_{teo}$, foi calculado utilizando-se as Equações (8) à (10) e a Tabela 15. Já o tempo estequiométrico experimental, $(t_{st})_{exp}$, foi calculado através da Equação (13) e com o auxílio da Tabela 16. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17: Valores do tempo estequiométrico teórico e experimental. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0 - coluna de adsorção com leito fixo.

c_{io} (mg/ml)	$(t_{st})_{teo}$ (min)		$(t_{st})_{exp}$
	equilíbrio	cinética	(min)
1,00	317,3	315,8	455,6
1,50	296,4	306,3	303,7
2,00	229,9	237,4	214,1
3,00	156,3	170,2	140,5
4,00	121,5	125,5	125,5

Verifica-se uma concordância razoável (desvios menores que 12%) entre os valores teóricos e experimentais da variável t_{st} , considerando-se os valores obtidos através dos testes de equilíbrio. A única excessão ocorreu para os experimentos com soluções mais diluídas ($c_{io} = 1,00$ mg/ml) onde os erros experimentais de determinação de concentração são maiores e onde o desvio obtido foi de 30,7% em relação à $(t_{st})_{exp}$.

CAPÍTULO 5

5. MODELAGEM MATEMÁTICA DA TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM TANQUES AGITADOS

5.1. Formulação Matemática

Um modelo que descreve a cinética de adsorção de proteínas em sólidos macroporosos foi apresentado por Horstmann e Chase (1989). Esse modelo inclui a transferência de massa na película líquida, a difusão nos poros da partícula (adsorvente) e também a taxa de reação na superfície. Para a construção do modelo algumas suposições foram feitas:

1. O adsorvente é feito de material poroso onde o soluto deve se difundir de uma maneira descrita pela difusividade efetiva, D_{ef} . Supõe-se que a difusividade efetiva é independente da concentração.
2. A transferência de massa para a superfície do adsorvente é governada pelo modelo de película caracterizado pelo coeficiente de transferência de massa, k_f .
3. A reação na superfície entre o adsorbato e um sítio de adsorção é descrita por uma reação reversível de segunda ordem. A adsorção é isotérmica e o comportamento de equilíbrio pode ser representado pela equação de Langmuir.
4. As partículas de adsorvente são esféricas e com tamanho uniforme.

Mais recentemente, Carrère (1993) utilizou um modelo análogo ao de Horstmann e Chase (1989) para o estudo da adsorção de proteínas em resinas trocadoras de íons.

As equações do modelo são as seguintes:

- Balanço de massa sobre uma partícula sólida (corresponde a equação diferencial que descreve a difusão do soluto (proteína) nos poros da partícula (adsorvente)):

$$\varepsilon_p \frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{ef} \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) - \frac{\partial q_i}{\partial t} \quad (14)$$

em que ε_p é a porosidade da partícula, c_i é a concentração de proteína na fase líquida no interior dos poros da partícula, q_i é a concentração de proteína na fase sólida, e t e r são as variáveis temporal e espacial (radial), respectivamente (Carrère, 1993).

A condição inicial é:

$$t = 0 \quad c_i = 0 \quad (15)$$

As condições de contorno são:

No centro da partícula:

$$r = 0 \quad \frac{\partial c_i}{\partial r} = 0 \quad (16)$$

Na superfície:

$$r = R \quad \frac{\partial c_i}{\partial r} = \frac{k_f}{D_{ef}} (c_b - c_i) \quad (17)$$

em que R é o raio da partícula.

De acordo com a Equação (17), tem-se que a taxa de transferência de massa através da película líquida está relacionada com a concentração global de proteína na fase líquida, c_b , e com a concentração de proteína na fase líquida nos poros da partícula, $c_i \big|_{r=R}$.

- Cinética de adsorção sobre a superfície dos poros (Carrère, 1993):

A cinética de adsorção pode ser escrita como:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_1 c_i (q_m - q_i) - k_2 q_i \quad (18)$$

em que k_1 e k_2 correspondem as constantes cinéticas de adsorção e dessorção, respectivamente.

Considerando a taxa de adsorção na superfície rápida, pode-se admitir que a relação entre q_i e c_i em cada instante é dada pela relação de equilíbrio representada pela isoterma de Langmuir, cuja expressão é:

$$q_i = \frac{q_m c_i}{k_d + c_i}, \text{ onde } k_d = \frac{k_2}{k_1} \quad (19)$$

Logo, pode-se expressar $\partial q_i / \partial t$ como:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \frac{dq_i}{dc_i} \frac{\partial c_i}{\partial t} \quad (20)$$

Em que:

$$\frac{dq_i}{dc_i} = \frac{q_m k_d}{(k_d + c_i)^2} \quad (21)$$

Logo, a Equação (20) fica:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \frac{q_m k_d}{(k_d + c_i)^2} \frac{\partial c_i}{\partial t} \quad (22)$$

Substituindo-se a Equação (22) na Equação (14), têm-se:

$$\varepsilon_p \frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{ef} \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) - \frac{q_m k_d}{(k_d + c_i)^2} \frac{\partial c_i}{\partial t} \quad (23)$$

Ou:

$$\left[\varepsilon_p + f'(c_i) \right] \frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{ef} \left[\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right] \quad (24)$$

em que:

$$f'(c_i) = \frac{q_m k_d}{(k_d + c_i)^2} \quad (25)$$

Adimensionalizando-se as variáveis t e r na Equação (24), têm-se:

$$\left[\varepsilon_p + f'(c_i) \right] \frac{\partial c_i}{\partial \tau} = \left[\frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} + \frac{2}{x} \frac{\partial c_i}{\partial x} \right] \quad (26)$$

$$0 \leq x \leq 1 \quad \tau > 0$$

em que:

$$x = \frac{r}{R} \quad \tau = \frac{D_{ef} t}{R^2} \quad (27)$$

Adimensionalizando-se também as variáveis t e r na condição inicial e nas condições de contorno, têm-se:

$$\tau = 0 \quad c_i = 0 \quad (28)$$

$$x = 0 \quad \frac{\partial c_i}{\partial x} = 0 \quad (29)$$

$$x = 1 \quad \frac{\partial c_i}{\partial x} = Bi_m (c_b - c_i) \quad (30)$$

em que:

$$Bi_m = \frac{k_f R}{D_{ef}} \quad (31)$$

- Balanço de massa na fase líquida com concentração global de proteína (tanque agitado) (Horstmann e Chase, 1989):

$$\frac{dc_b}{dt} = -\frac{3vk_f}{RV_l}(c_b - c_i)|_{r=R} \quad (32)$$

em que v é o volume de adsorvente e V_l é o volume de líquido.

A condição inicial da Equação (32) é:

$$t = 0 \quad c_b = c_o \quad (33)$$

Adimensionalizando-se as variáveis t e r na Equação (32), têm-se:

$$\frac{dc_d}{d\tau} = -\frac{3v}{V_l} Bi_m (c_b - c_i)|_{x=1} \quad (34)$$

Cuja condição inicial é:

$$\tau = 0 \quad c_b = c_o \quad (35)$$

5.2. Solução do modelo

De modo a analisar os resultados experimentais obtidos com as curvas cinéticas e com os dados de equilíbrio, propõe-se solucionar o modelo. Uma solução desse tipo permite obter os valores otimizados dos coeficientes k_f e D_{ef} das Equações (14) e (32).

O balanço material no adsorvente é representado por uma equação diferencial parcial (Equação 26). Essa equação foi reduzida a um conjunto de equações diferenciais ordinárias, usando-se o método de colocação ortogonal (Yao e Tien, 1992). Esse sistema, juntamente com a equação do tanque agitado, Equação 34, foram resolvidos simultaneamente, utilizando-se o método numérico de Runge Kutta de 4ª ordem. Um método de otimização não-linear multivariável (Box, 1965) foi utilizado para obter os melhores valores dos coeficientes k_f e D_{ef} .

Essa modelagem matemática implementada em um programa computacional, foi usada para ajustar o modelo às curvas cinéticas experimentais do sistema Accell Plus QMA/BSA nos tampões Tris 0,02 e 0,03 mol/l pH 7, supondo-se que a transferência de massa na película e a difusão intrapartícula são as maiores resistências à transferência de massa. O objetivo a ser alcançado com o referido ajuste foi a obtenção dos coeficientes de transferência de massa, k_f e D_{ef} para o sistema em estudo. Os parâmetros q_m e k_d utilizados na resolução do sistema de equações foram obtidos através das isotermas de adsorção apresentadas no Capítulo 4.

Nas Figuras 38 à 50, são apresentadas as curvas cinéticas experimentais e calculadas através do modelo.

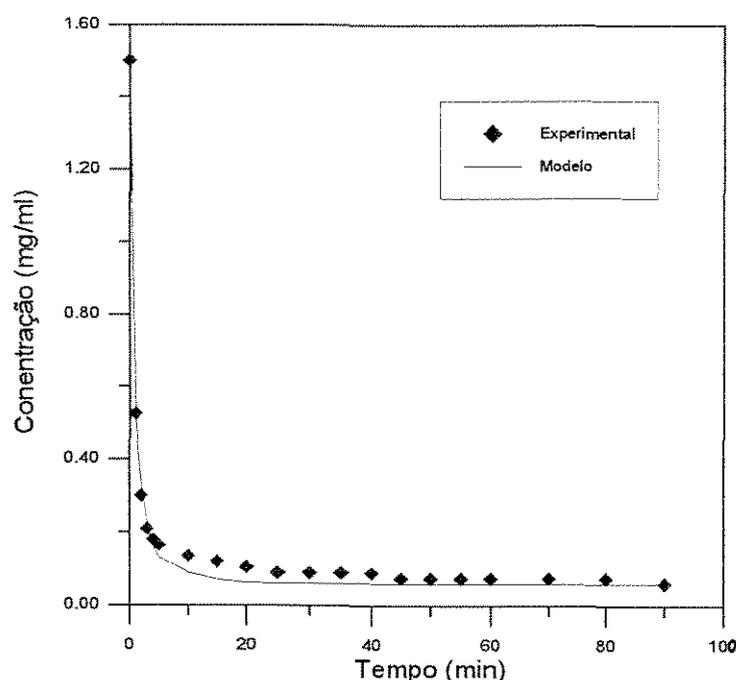


Figura 38: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_o = 1,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

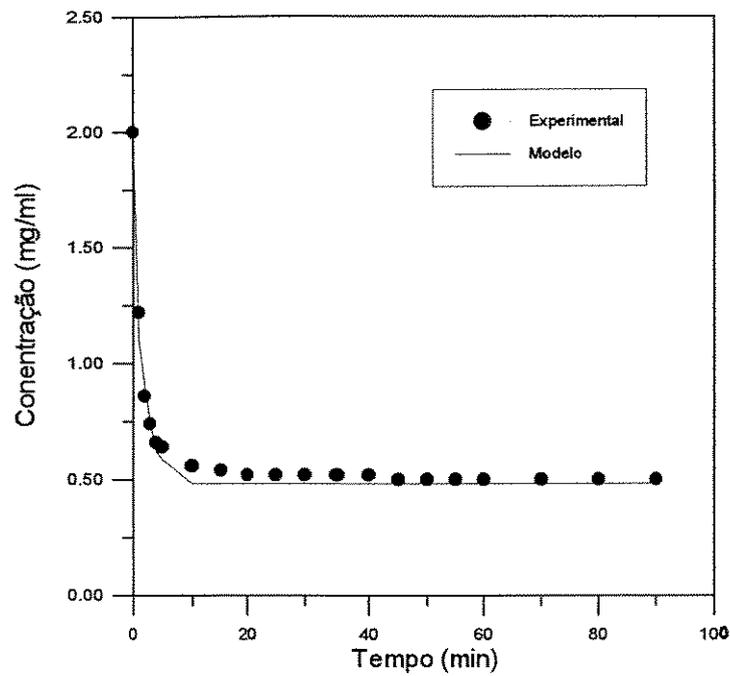


Figura 39: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 2,00$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

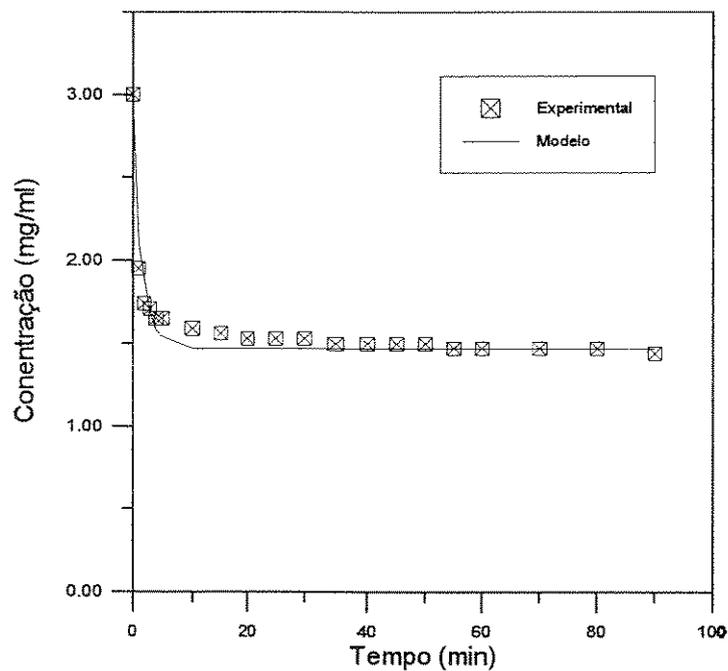


Figura 40: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 3,00$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

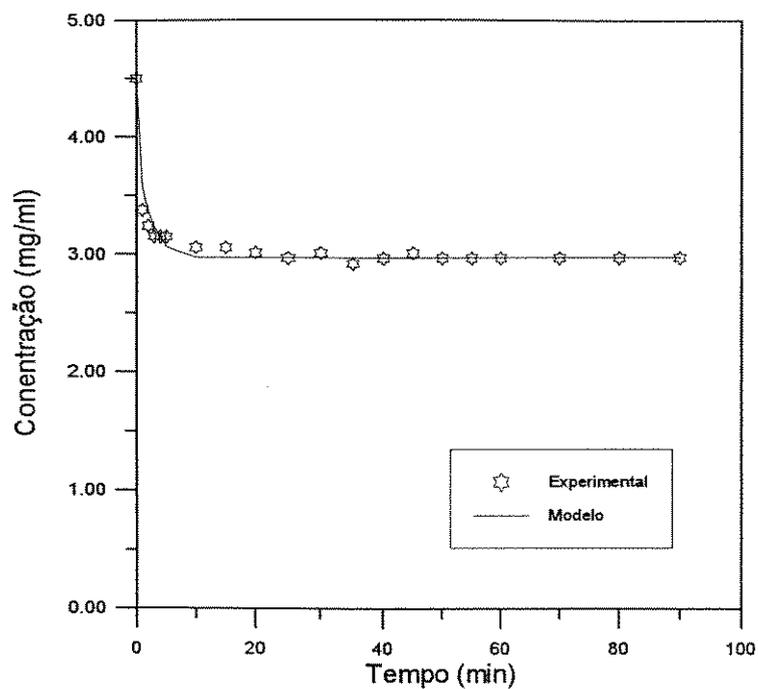


Figura 43: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 4,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

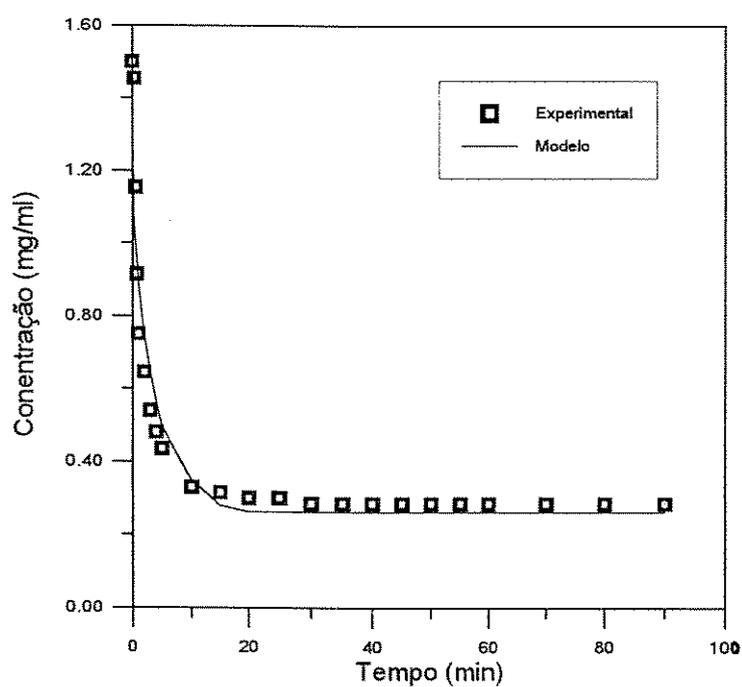


Figura 44: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 1,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

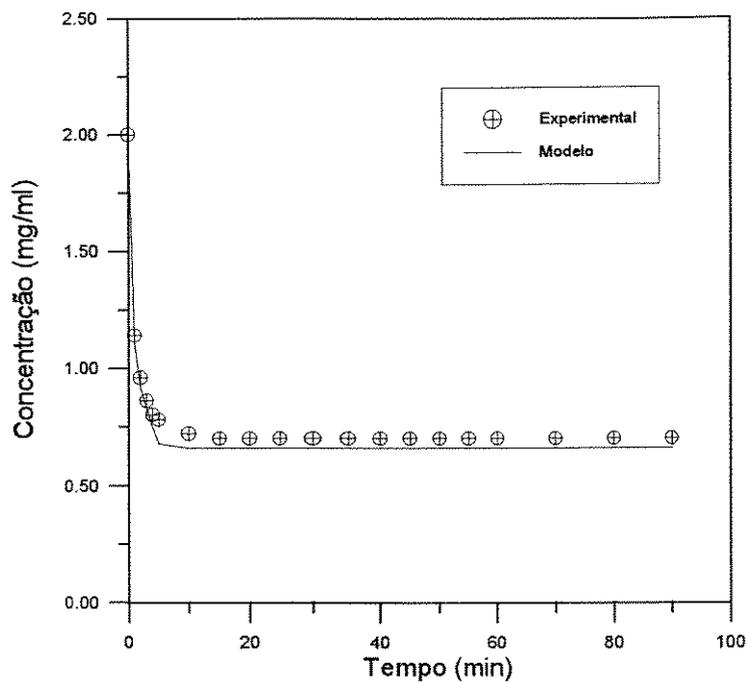


Figura 45: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 2,00$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

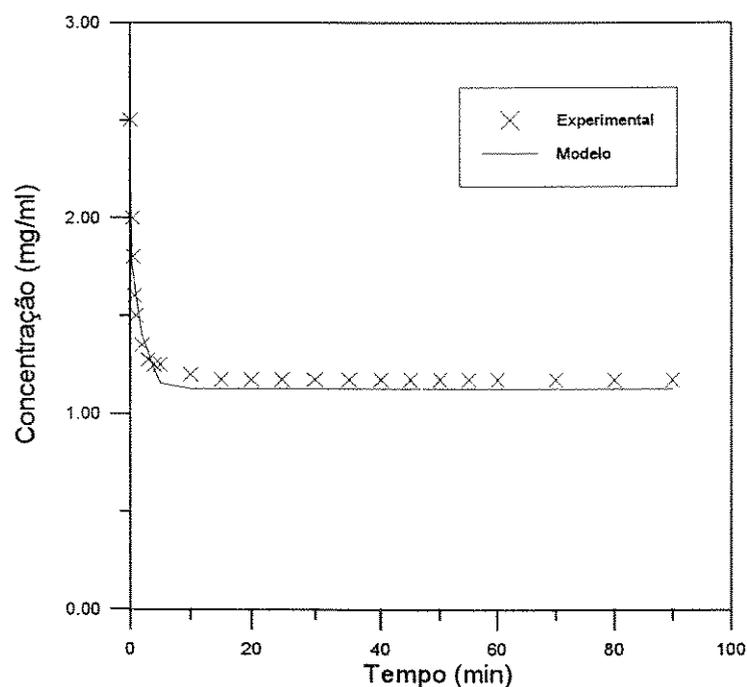


Figura 46: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 2,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

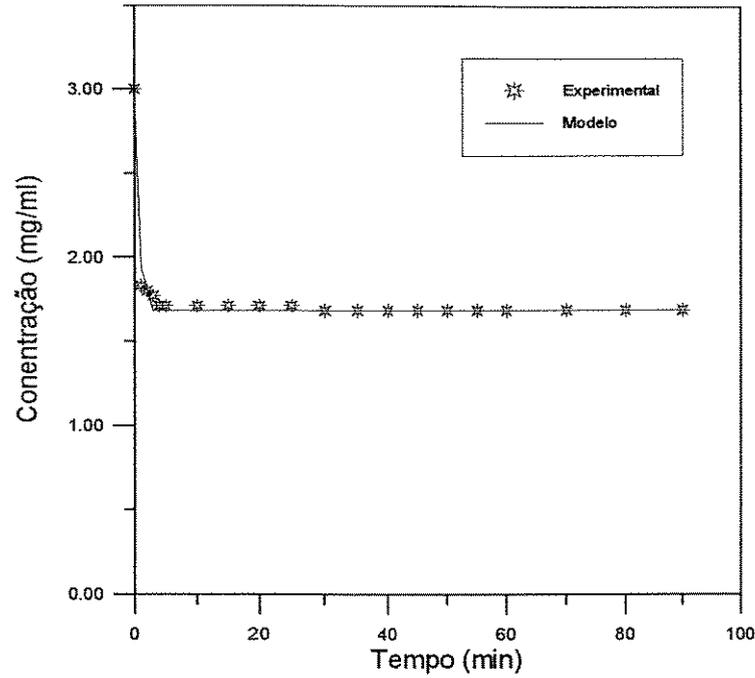


Figura 47: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 3,00$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

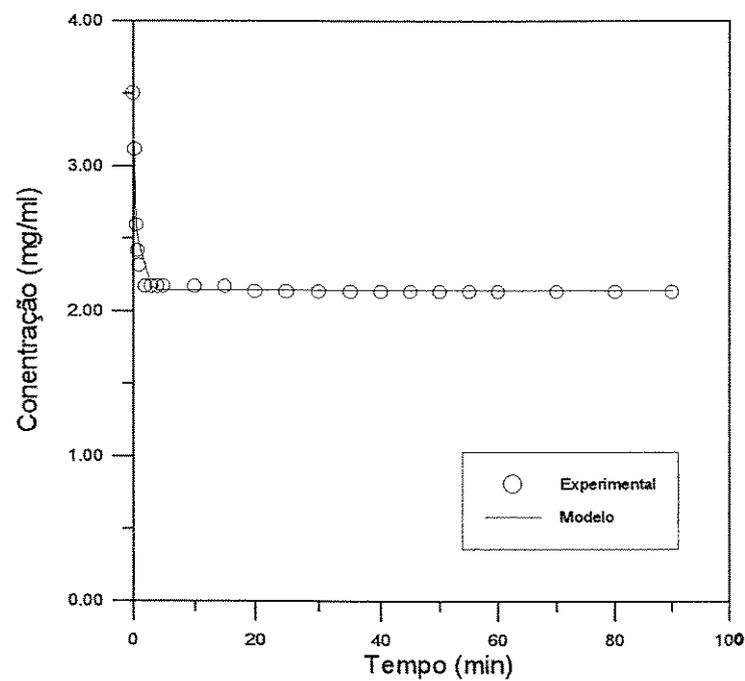


Figura 48: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 3,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

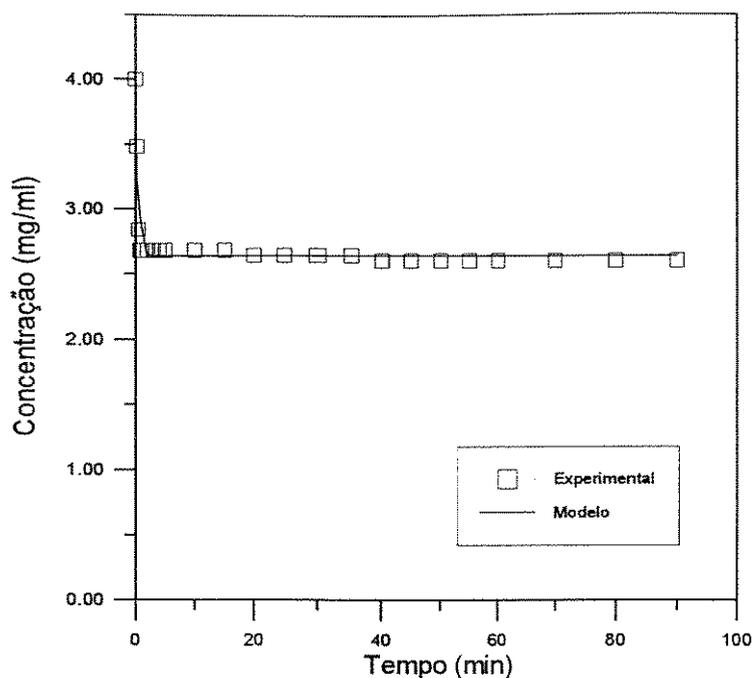


Figura 49: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 4,00$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

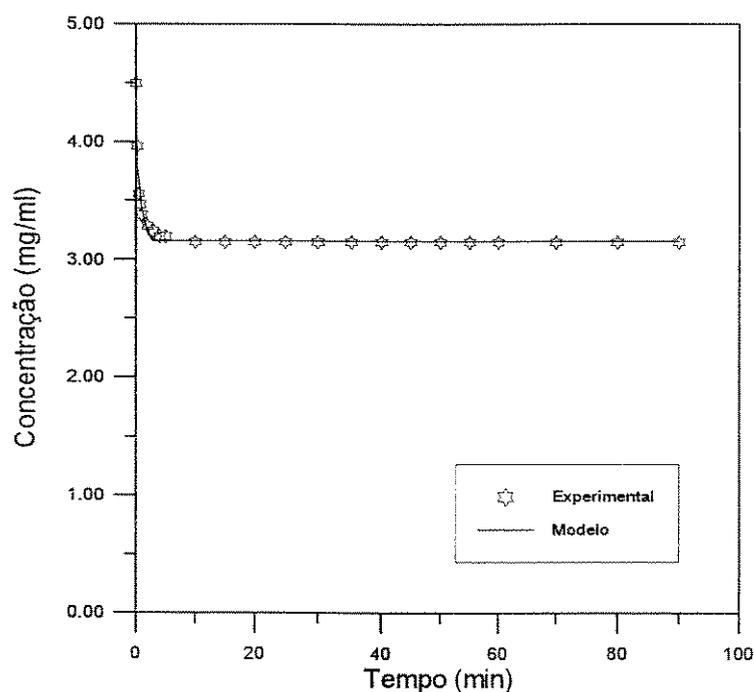


Figura 50: Curvas cinéticas experimental e calculada para $C_0 = 4,50$ mg/ml. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

Pelas Figuras 38 à 50, verifica-se que o modelo proposto por Horstmann e Chase (1989) e por Carrère (1993) se ajusta bem aos dados experimentais dos sistemas

estudados, permitindo otimizar os parâmetros que descrevem a transferência de massa do sistema. Esses parâmetros são a difusividade efetiva da proteína no interior dos poros do adsorvente, D_{ef} , e o coeficiente de transferência de massa na película líquida, k_f . Os valores obtidos para esses parâmetros estão nas Tabelas 18 e 19, para os tampões Tris 0,02 e 0,03 mol/l, respectivamente.

Tabela 18: Dados dos parâmetros k_f e D_{ef} obtidos através da modelagem. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,02 mol/l pH= 7,0.

Concentração inicial de BSA (mg/ml)	$k_f \times 10^4$ (m/s)	$D_{ef} \times 10^{11}$ (m ² /s)
1,50	20,17	15,37
2,00	6,88	6,79
3,00	4,05	3,72
3,50	0,90	2,10
4,00	0,58	1,88
4,50	2,46	2,09

Tabela 19: Dados dos parâmetros k_f e D_{ef} obtidos através da modelagem. Sistema: Accell Plus QMA/BSA em tampão Tris 0,03 mol/l pH= 7,0.

Concentração inicial de BSA (mg/ml)	$k_f \times 10^4$ (m/s)	$D_{ef} \times 10^{11}$ (m ² /s)
1,50	5,83	3,62
2,00	4,63	7,68
2,50	8,44	4,86
3,00	5,32	7,04
3,50	2,98	4,19
4,00	3,32	6,12
4,50	1,28	4,42

Pode ser verificado através dos resultados apresentados, que a difusividade efetiva varia com a concentração inicial de BSA. Esse tipo de comportamento foi verificado também no estudo de outros sistemas de adsorção utilizando esse mesmo modelo (Carrère, 1993). Não existem na literatura dados que possam ser comparados para esse sistema específico. Apenas como referência, o trabalho de Draeger e Chase (1990) determinou para o sistema Q-Sepharose Fast Flow/BSA o valor médio de $1,0 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$.

Os valores de k_f obtidos através do ajuste também variam com a concentração inicial de BSA.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. Conclusões

Dois métodos diferentes para obtenção de dados referentes à adsorção da proteína Albumina de Soro Bovino em resinas trocadoras de íons foram empregados neste trabalho: utilização de um tanque agitado com monitoramento contínuo e não contínuo e adsorção em colunas com leitos fixo e fluidizado. Métodos diferentes levaram à resultados semelhantes quanto à capacidade de adsorção da resina Accell Plus QMA.

A influência da força iônica do meio no fenômeno da adsorção foi verificada tanto no caso da resina Q-Sepharose Fast Flow como no da Accell Plus QMA. Os sistemas que trabalharam com forças iônicas menores apresentaram uma maior capacidade de adsorção.

A resina Accell Plus mostrou-se mais poderosa, em termos da capacidade de adsorção, do que a resina Q-Sepharose Fast Flow nos experimentos realizados em tanque agitado.

A semelhança encontrada entre os resultados obtidos através dos testes de equilíbrio e das curvas cinéticas comprovaram que a resina Accell Plus possui uma capacidade de adsorção bem elevada, levando o equilíbrio a ser atingido bem rapidamente. Isso significa que há uma alta afinidade entre o adsorvente e a proteína em estudo.

A realização de experimentos com leitos fixos e leitos fluidizados permitiram efetuar a comparação entre os dois diferentes métodos de operação. As curvas de *breakthrough* obtidas apresentam resultados muito semelhantes com relação à capacidade de adsorção do adsorvente na coluna. Esse fato indica que o leito fluidizado é promissor no estudo da adsorção por viabilizar o uso de soluções contendo

material particulado, sem a necessidade de uma operação prévia de filtração e/ou centrifugação que elevam os custos do processo.

A utilização de um modelo que inclui a difusão interna às partículas e a resistência à transferência de massa no meio externo às partículas permitiu a obtenção dos parâmetros que descrevem a transferência de massa no processo de adsorção em tanques agitados.

Verificou-se através dos dados de equilíbrio (isotermas de adsorção) que para todos os sistemas estudados à medida que se aumentava a concentração de proteínas, a quantidade de proteína não-adsorvida aumentava também, indicando ser mais conveniente trabalhar com soluções diluídas.

6.2. Sugestões

Para complementar os estudos efetuados sobre a adsorção da proteína Albumina de Soro Bovino em resinas trocadoras de íons, são sugeridos os seguintes tópicos de pesquisa:

1. Realização de experimentos com o mesmo sistema proteína-adsorvente em tanques agitados com variação do pH e em outros níveis de força iônica do tampão Tris.
2. Analisar o efeito da força iônica em experimentos adicionais com a coluna de leito fixo e leito fluidizado.
3. Estudar o efeito da vazão de solução aplicada às colunas de leito fixo.
4. Ampliar a modelagem matemática de modo a analisar a adsorção em colunas de leito fixo e leito fluidizado.
5. Realizar experimentos com meios fermentados contendo particulados de modo a verificar a influência dos mesmos no desempenho de leitos fluidizados na adsorção de proteínas.
6. Efetuar estudos sobre a eluição da proteína adsorvida de modo a estudar o ciclo completo adsorção-dessorção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANÔNIMO, *Expanded bed adsorption-less waste, more product and better economy*, New Developments in Process Separation Technologies - Downstream 14, Pharmacia BioProcess Technology, pp. 9-12, (1993)
- ANÔNIMO, *Guide to Protein Separations - An Introduction to Methods and Techniques*, Rainin Instrument Co. Inc., (1989)
- ASENJO, J.A., *The rational design of large scale protein separation processes*, in D.L. Pyle (Editor), Separations for Biotechnology 2, Elsevier, Barbing, pp. 519-528, (1990)
- BELTER, P.A.; CUSSLER, E.L.; HU, W.S., *Bioseparations- Downstream Processing for Biotechnology*, New York, John Wiley & Sons, (1988)
- BOX, P., *A New Method of Constrained Optimization and a Comparison with other Methods*, Computer Journal, vol. 8, pp. 42-52, (1965)
- CARRÈRE, H., *Extraction des Proteines du Lactoserum par Chromatographie d'échange d'ions en lit fluidisé*, Tese de Doutorado, Institut National Polytechnique de Toulouse, (1993)
- CHASE, H.A., *Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds*, Trends in Biotechnology, vol. 12, pp. 296-303, (1994)
- CURLING, J.M., In: *Methods in Plasma Fractionation* (Curling, J.M. Ed.), pp. 77-91, Academic Press, (1980)
- DRAEGER, N.M.; CHASE, H.A., *Protein Adsorption in Liquid Fluidized Beds - Advances in Separation Processes*, I. Chem. E. Symposium Series, no. 118, pp. 161-172, (1990)
- FIROUZTALE, E.; MAIKNER, J.J.; DEISSLER, K.C.; CARTIER, P.G., *Validation of a theoretical model for adsorption using cephalosporin C and polymeric reversed-phase resins*, Journal of Chromatography A, vol. 658, pp. 361-370, (1994)
- FIROUZTALE, E.; SCOTT, A.P.; DALVIE, S.K.; BLOHN, G.M., *Experimental and Theoretical Study of Key Parameters of Adsorption on Reverse Phase Macroporous*

- Resins*, In: New Developments in Bioseparation, AIChE Symposium Series, vol. 88, no. 290, pp. 25-33, (1992)
- FLASCHEL, E. ; WANDREY, C.; KULA, M.R., *Ultrafiltration for the separations of biocatalysts*, Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology Downstream Processing, Ed. by Fiechter, vol. 26, pp. 72-143, (1983)
- FREJ, A.K.; HJORTH, R.; HAMMARSTOM, A., *Pilot Scale Recovery of Recombinant Annexin V from Unclarified Escherichia coli Homogenate Using Expanded Bed Adsorption*, Biotechnology and Bioengineering , vol. 44, pp. 922-929, (1994)
- GESELLSCHAFT FUR BIOTECNOLOGISCHE FORSCHUNG (GBF), Scientific Report 1992, p. 113
- GESELLSCHAFT FUR BIOTECNOLOGISCHE FORSCHUNG (GBF), Scientific Report 1993, p. 167
- HANSSON, M.; STAHL, S; HJORTH, R.; UHLEN, M.; MOKS, T., *Single-Step recovery of a Secreted recombinant Protein by Expanded Bed Adsorption*, Bio/Technology, vol. 12, pp. 285-288, (1994)
- HORSTMANN, B.J.; CHASE, H.A., *Modelling the Affinity Adsorption of Immunoglobulin G to Protein A Immobilised to Agarose Matrices*, Chem. Eng. Res. Dev., vol. 67, no 03, pp. 243-254, (1989)
- JAMES, D.H.; PHILLIPS, C.S.G., *The chromatography of gases and vapors, Part III. The determination of adsorption isotherms*, J. Chem. Soc., pp. 1066-1070, (1954)
- LANGMUIR, I., *The constitution and fundamental properties of solids and liquids*, Journal of the American Chemical Society, vol. 38, pp. 2263-2295, (1916)
- LEAVER, G.; CONDER, J.R.; HOWELL, J.A., *Adsorption Isotherms of Albumin on a Cross-Linked Cellulose Chromatographic Ion-Exchanger*, I. Chem. E. Symposium Series, no 118, pp. 1-15, (1990)
- MICHAELS, A.S., *Frontiers of bioseparations technology: unsolved problems and novel process concepts* , in D.L. Pyle (Editor), Separations for Biotechnology 2, Elsevier, Barbing, pp. 3-8, (1990)

- MIRANDA, E.A.; BERGLUND, K.A., *Evaluation of Column Flotation in the Downstream Processing of Fermentation Products: Recovery of a Genetically Engineered α -Amylase*, *Biotechnology Progress*, vol. 9, pp. 411-420, (1993)
- NICOUD, R.M.; PERRUT, M., *Chromatographie d'éluition, frontale ou lit mobile simulé*, *Informations Chimie*, 328, pp. 250-255, (1991)
- PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY GUIDE, junho de 1993
- SANTANA, C.C., *Adsorptive Bubble Separation Process as Means of Reducing Surface-Active Contaminants in Industrial Wastewaters*, *Revista de Engenharia, Caderno de Engenharia Química, Número Especial*, pp. 1-74, Outubro de 1994
- SCOPE, R. K., *Protein Purification, Principles and Practice*, 2 ed., New York, Springer Verlag, (1987)
- SKUDDER, P.J., *Ion exchange in the separation of whey*, Meeting of the Society of Chemical Industry, University of Reading, June 1983
- SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, I.R.; LEFKOWITZ, R.J.; HANDLER, P.; WHITE, A., *Principles of Biochemistry - Mammalian Biochemistry*, Mc-Graw Hill Book Co, pp. 9-10, (1983)
- SOFER, G.K.; NYSTROM, L.E., *Process Chromatography, a Practical Guide*, Academic Press, London, (1989)
- STOSCHECK, C.M., *Quantitation of Protein*, in *Methods in Enzymology*, vol 182, editado por Murray P. Deutscher, Academic Press, Inc., (1990)
- THÖMES, J.; WEIHER, M.; KULA, M.R., *Expanded bed adsorption of monoclonal antibodies from whole hybridoma fermentation broth*, *New Developments in Process Separation Technologies - Downstream 17*, Pharmacia BioProcess Technology, pp. 5-7, (1994)
- WATERS ACCELL PLUS QMA AND CM BULK MEDIA GUIDE, setembro de 1987
- WHEELWRIGHT, S.M., *Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing*, Oxford University Press, (1991)
- YAO, CHUNCAI; TIEN, CHI, *Approximation of intraparticle mass transfer in adsorption processes - II. Non-linear systems*, *Chemical Engineering Science*, vol. 47, no. 2, pp. 465-473, (1992)