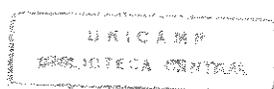


**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ADSORÇÃO DE INSULINA EM RESINA
TROCADORA DE ÍON UTILIZANDO
LEITOS FIXOS E FLUIDIZADOS**

JOEL MESQUITA CRUZ
Orientador: **CESAR COSTAPINTO SANTANA**

CAMPINAS - SP - BRASIL
1997



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ADSORÇÃO DE INSULINA EM RESINA
TROCADORA DE ÍON UTILIZANDO
LEITOS FIXOS E FLUIDIZADOS**

JOEL MESQUITA CRUZ

Orientador: CÉSAR COSTAPINTO SANTANA

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia Química da UNICAMP como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química; área de
concentração: Engenharia de Processos**

**CAMPINAS - SP - BRASIL
1997**

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	C889a
V.	Es.
TOMBO BC/	30441
PRCC.	281.197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO R.B.	11,00
DATA	23/09/97
N.º CPD	

CM-00098730-1

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

C889a Cruz, Joel Mesquita
Adsorção de insulina em resina trocadora de íon
utilizando leitos fixos e fluidizados / Joel Mesquita Cruz.-
-Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Cesar Costapinto Santana.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Insulina. 2. Insulina - Purificação. 3. Adsorção. 4.
Troca iônica. I. Santana, Cesar Costapinto. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Esta versão corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo Engenheiro Químico Joel Mesquita Cruz e aprovada pela banca examinadora em 27 de fevereiro de 1997.

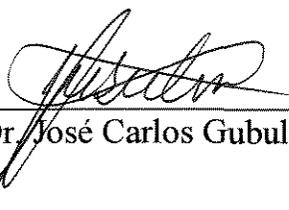
A handwritten signature in cursive script, reading "Cesar Costapinto Santana", written over a horizontal line.

Prof. Dr Cesar Costapinto Santana

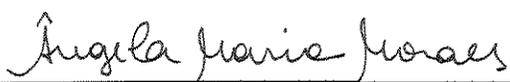
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, em 27 de fevereiro de 1997, pela Banca Examinadora constituída pelos Professores Doutores:



Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana
Orientador



Prof. Dr. José Carlos Gubulin



Profa. Dra Angela Maria Moraes

**A minha esposa Izabel pelo incentivo, carinho e companherismo
e a meus filhos Joel Júnior e Cinthia, aos quais dedico minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Ao professor Cesar Costapinto Santana pela orientação segura e otimismo ao longo deste trabalho.

Aos colegas José Antônio e Fábio, pelo desenvolvimento do método computacional utilizado na modelagem matemática abordada neste trabalho.

À professora Angela Maria Moraes por sua prestimosa ajuda na escrita final desta tese.

A BioBrás - Bioquímica do Brasil S/A (Montes Claros-MG) pelas amostras de insulina gentilmente cedidas.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

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

A Izabel Cristina Udovicc Cruz pelo apoio em todos os momentos.

A toda minha família que eu amo muito e sempre me apoiaram.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Natureza Química da Insulina	2
1.2.	Obtenção da Insulina Humana	3
1.3.	Objetivos	11
2.	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1.	Características Gerais das Proteínas	12
2.2.	Separação de Proteínas	16
2.2.1.	Fundamentos para a Separação	17
2.2.2.	Técnicas Utilizadas na Separação	20
2.3.	Adsorção em Matrizes Sólidas	22
2.3.1.	Adsorventes	24
2.3.2.	Aspectos Gerais dos Processos Cromatográficos	25
2.3.2.1.	Tipos de Cromatografia Líquida	26
2.3.2.2.	Procedimentos Cromatográficos	27
2.3.3.	Adsorção em Resinas Trocadoras de Íons	29
2.4.	Isotermas de Adsorção: Estudo do Equilíbrio de Fases	30
2.4.1.	Adsorção em Tanques Agitados	32
2.4.2.	Adsorção em Colunas	34
2.4.2.1.	Adsorção em Leitos Fixos	34
2.4.2.2.	Adsorção em Leitos Fluidizados	35

3.	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1.	Materiais Utilizados	40
3.1.1.	Adsorvato	40
3.1.2.	Adsorvente	41
3.1.3.	Solução Tamponante	42
3.1.4.	Equipamentos Utilizados	42
3.1.4.1.	Bomba Tipo Pistão	42
3.1.4.2.	Espectrofotômetros	42
3.1.4.3.	Sistema de Aquisição Contínua de Dados	43
3.1.4.4.	Outros Equipamentos	43
3.2.	Metodologias Experimentais	44
3.2.1.	Determinação da Concentração de Insulina	44
3.2.2.	Determinação da Cinética de Adsorção de Insulina em Tanques Agitados	47
3.2.3.	Adsorção de Insulina em Coluna	48
3.2.4.	Expansão de Leito de Adsorção	50
3.3.2.2.	Corridas de Adsorção e Eluição	50
4.	RESULTADOS EXPERIMENTAIS: ANÁLISE E DISCUSSÃO	52
4.1.	Experimentos em Tanques Agitados	53
4.1.1.	Efeito do pH na Adsorção da Insulina	52
4.1.2.	Determinação da Cinética de Adsorção da Insulina	54
4.2.	Experimentos em Coluna de Adsorção	57
4.2.1.	Operação em Leito Expandido	57
4.2.2.	Operação em Leito Fixo	64
4.2.3.	Comparação das Isotermas de Adsorção Obtidas pelos	67

	Diferentes Métodos Utilizados	
4.2.4.	Eluição da Insulina Adsorvida no Leito	68
5.	MODELAGEM MATEMÁTICA	74
5.1.	Formulação Matemática da Cinética em Tanques Agitados	75
5.1.1.	Modelo Cínético Simplificado	75
5.1.2.	Modelo Cínético Completo	82
5.2.	Formulação Matemática das Curvas de Ruptura em Leito Fixo	94
6.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	101
6.1	Conclusões	101
6.2	Sugestões para futuros trabalhos	102
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
	ANEXO I	109
	ANEXO II	115

LISTA DAS FIGURAS

- Figura 1.1- Estrutura primária da insulina humana. 2
- Figura 1.2 - (a) Estrutura primária da insulina suína mostrando as regiões onde a tripsina atua nos processos de clivagem, (b) Octapeptídeo sintético. 7
- Figura 1.3- Técnicas de purificação utilizadas na produção industrial de insulina (Walsh e Headon, 1994). 9
- Figura 2.1 - Representação esquemática de um aminoácido na sua forma iônica e não iônica. 13
- Figura 2.2 - Ligações peptídicas entre aminoácidos para a formação de proteínas. 13
- Figura 2.3 - Estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias de uma proteína. 15
- Figura 2.4- Efeito do pH na carga elétrica de proteína genérica. 18
- Figura 2.5 - Fenômenos de transferência de massa numa partícula porosa (Carrère, 1993). 24

- Figura 2.6 - Princípio básico da interação de uma proteína com uma resina de afinidade. 27
- Figura 2.7 - Esquema do fenômeno da troca de ânions entre uma resina e uma proteína. 29
- Figura 2.8 - Esquema do fenômeno de eluição pela adição de um ácido forte. 30
- Figura 2.9- Esquema básico de equipamentos necessários para a obtenção das curvas cinéticas e das isotermas de adsorção. 32
- Figura 2.10- Esboço ilustrativo de uma curva cinética (a) e de uma isoterma de adsorção (b). 33
- Figura 2.11- Estágios de uma separação por adsorção em leito fixo cíclico (Chase, 1984). 36
- Figura 2.12 - Vantagem da utilização da utilização da cromatografia em leito fluidizado (GBF-Scientific Report, 1993). 39
- Figura 3.1 - Esboço esquemático da adsorção de luz ultravioleta para proteínas. 45
- Figura 3.2 - Curva de calibração do detector espectrofotométrico da Shimadzu para as soluções de insulina em tampão Tris/HCl 0.05 M, pH 8.0 a.24 °C 46

- Figura 3.3 - Esquema experimental de um banho agitado. 48
- Figura 3.4 - Esquema experimental da coluna de adsorção. 49
- Figura 4.1 - Capacidade de adsorção da resina Accel Plus QMA em vários pH's das soluções de insulina em tampão TRIS/HCl 0,05 M. 53
- Figura 4.2 - Curvas cinéticas para várias concentrações de insulina. Sistema: Accel Plus QMA, tampão TRIS/HCl 0,05M pH 8,0. 54
- Figura 4.3- Isoterma de adsorção para o sistema Accel Plus QMA/insulina em tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0, operação em tanque agitado. 56
- Figura 4.4 - Teste de expansão do leito utilizando três gramas de resina em três condições distintas. 58
- Figura 4.5 - Coluna de adsorção com o pistão ajustado acima do leito expandido, mostrando duas zonas distintas e curva de ruptura obtida com e sem a zona de mistura. 59
- Figura 4.6 - Curvas de ruptura obtidas para diferentes concentrações de insulina em leito expandido. Condições operacionais: altura do leito 8,5 cm, vazão 2,0 ml/min. 60

- Figura 4.7 - Insulina aplicada no leito expandido em soluções com diferentes concentrações. Condições operacionais: altura do leito 8,5 cm, vazão 2,0 ml/min. 61
- Figura 4.8- Determinação da quantidade adsorvida por análise frontal. 62
- Figura 4.9 - Isoterma de adsorção: operação em leito expandido (altura 8,5 cm). 64
- Figura 4.10 - Curvas de ruptura obtidas para diferentes concentrações de insulina em leito fixo. Condições operacionais: altura do leito 3,7 cm, vazão 2,0 ml/min. 65
- Figura 4.11 - Isoterma de adsorção: operação em leito fixo (altura 3.7 cm). 66
- Figura 4.12 - Isoterma de adsorção a 24 °C para a insulina na resina Accel Plus QMA. 67
- Figura 4.13 - Adsorção e eluição de proteínas em resinas trocadoras de íons. 68
- Figura 4.14 - Esquema experimental para a adsorção, lavagem e eluição da insulina, respectivamente. 69

- Figura 4.15 - Eluição da insulina adsorvida na resina Accel Plus QMA com solução tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0 e NaCl a várias concentrações. 70
- Figura 4.16 - (a) Curva de ruptura para adsorção de solução de concentração 0,825 mg/ml. (b) Curva de lavagem e eluição da insulina com obtenção de uma solução concentrada de 45,82 mg/ml. 72
- Figura 4.17 - (a) Curva de ruptura para adsorção de solução de concentração 0,202 mg/ml. (b) Curva de lavagem e eluição da insulina com obtenção de uma solução concentrada de 27,16 mg/ml. 73
- Figura 5.1- Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0.183$ mg/mL. 78
- Figura 5.2 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0.188$ mg/mL. 78
- Figura 5.3 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0.203$ mg/mL. 79
- Figura 5.4 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0.230$ mg/mL. 79

- Figura 5.5 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 1.12$ mg/mL. 80
- Figura 5.6 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 2.28$ mg/mL. 80
- Figura 5.7 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 2.58$ mg/mL. 81
- Figura 5.8 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 3.211$ mg/mL. 81
- Figura 5.9 - Fenômenos de transferência de massa envolvidos na adsorção e eluição. 84
- Figura 5.10 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0.183$ mg/mL. 90
- Figura 5.11 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0.188$ mg/mL. 90
- Figura 5.12 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0.203$ mg/mL. 91
- Figura 5.13 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0.230$ mg/mL. 91

- Figura 5.14 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 1.12$ mg/mL. 92
- Figura 5.15 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 2.28$ mg/mL. 92
- Figura 5.16 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 2.58$ mg/mL. 93
- Figura 5.17 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 3.211$ mg/mL. 93
- Figura 5.18 - Curvas de ruptura para leito fixo ($C_0 = 2.62$ mg/ml) e fluidizado ($C_0 = 2.53$ mg/ml) ajustadas pelo modelo de Thomas. 97
- Figura 5.19 - Curvas de ruptura para leito fixo ($C_0 = 2.06$ mg/ml) e fluidizado ($C_0 = 1.95$ mg/ml) ajustadas pelo modelo de Thomas. 97
- Figura 5.20 - Curvas de ruptura para leito fixo ($C_0 = 1.16$ mg/ml) e fluidizado ($C_0 = 1.01$ mg/ml) ajustadas pelo modelo de Thomas. 98
- Figura 5.21 - Curvas de ruptura para leito fixo ($C_0 = 3.0$ mg/ml) e fluidizado ($C_0 = 3.0$ mg/ml) ajustadas pelo modelo de Thomas. 98

Figura 5.22 - Curvas de ruptura para leito fixo ($C_o = 1.76$ mg/ml) e fluidizado ($C_o = 1.73$ mg/ml) ajustadas pelo modelo de Thomas. 99

Figura 5.23 - Curvas de ruptura para leito fixo ($C_o = 0.52$ mg/ml) e fluidizado ($C_o = 0.57$ mg/ml) ajustadas pelo modelo de Thomas. 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Rendimento e enriquecimento na recuperação de proteínas utilizando resinas trocadoras de íons em leitos fluidizados (resultados recentes) (GBF-Scientific Report, 1993). 38

Tabela 4.1 - Dados utilizados para a construção da isoterma de adsorção do sistema Accel Plus QMA/insulina em tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0. 56

Tabela 4.2 - Quantidade de insulina adsorvida por massa de resina em várias concentrações de soluções de insulina utilizando leito fluidizado. 63

Tabela 4.3 - Quantidade de insulina adsorvida por massa de resina Accel Plus QMA para várias concentrações de soluções tamponada com TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0 utilizando leito fixo. 66

Tabela 5.1 - Valores dos coeficientes de adsorção (k_1) e dessorção (k_2) calculados a partir do modelo (Equação 5.6). 82

Tabela 5.2 - Valores de Biot mássico (Bi_m), coeficiente de difusão intrapartícula (D_{ef}) e coeficiente convectivo de transferência de massa externo (k_f). 94

NOMENCLATURA

A = absorvância

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

Bi_m = número de Biot de massa definido pela Equação (5.25)

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_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 (ml/mg.min)

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

K_d = constante de dissociação (mg/ml)

K_f = coeficiente convectivo 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-ads)

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

q_m = quantidade máxima adsorvida na fase sólida (mg/g-res)

R = raio da partícula sólida (m)

r = variável espacial (radial) (m)

t = variável temporal (min)

v = volume de adsorvente (ml)

V = volume de líquido no tanque agitado (ml)

V_m = volume morto do sistema (ml)

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

W = massa de adsorvente (g)

x = variável espacial (radial) adimensional

Símbolos Gregos:

ρ = massa específica do fluido (g/cm^3)

ε = coeficiente de extinção da proteína (Equação 3.1)

ε_p = porosidade do leito

τ = variável temporal adimensional

RESUMO

A insulina é uma proteína de baixo peso molecular útil no tratamento da diabete. A insulina é obtida tradicionalmente do tecido pancreático suíno e bovino, e através de modificações químicas para transformá-la em insulina humana. Uma das atuais fontes importantes de insulina humana consiste na produção através de bactérias e de técnicas de DNA recombinante. Uma vez que as impurezas contidas nas preparações de insulina provocam forte resposta imunológica nos pacientes, uma etapa de primordial importância na produção deste composto é a sua purificação. A adsorção e eluição em resinas são métodos particularmente adequados para a obtenção e recuperação eficiente com altos níveis de purificação dessa biomolécula.

A utilização de leitos fixos e fluidizados de partículas contendo grupos funcionais baseados na troca iônica apresenta altas capacidades de adsorção com cinética favorável. A ampliação de escala do processo bem como o desenvolvimento de novos adsorventes trazem a necessidade da obtenção de dados de processo como a determinação de isotermas de adsorção, de curvas cinéticas e também de curvas de ruptura (curvas de "breakthrough") e de eluição.

No presente trabalho foram determinadas as isotermas de adsorção utilizando experimentos em tanques agitados e em coluna de adsorção (leito fixo e leito expandido), bem como as curvas cinéticas e de ruptura para diversas concentrações de insulina utilizando-se a resina Accel Plus QMA como adsorvente. Foi feito um estudo do efeito do pH da solução tamponante na adsorção da insulina, observando-se que a máxima adsorção ocorre no pH 8.0. Foram comparadas curvas de ruptura para leitos fixos e fluidizados bem como determinadas as concentrações do produto após a lavagem e eluição com solução de cloreto de sódio. Verifica-se que o processo de adsorção e eluição conduz a fatores de enriquecimento da ordem de 50 com rendimento de 80% na recuperação da biomolécula.

Utilizando-se um modelo matemático simplificado e um modelo mais completo, obteve-se os parâmetros de transferência de massa convectivo e difusivo para sistemas de tanques agitados. As curvas de ruptura em leito fixo foram ajustadas satisfatoriamente utilizando-se o modelo matemático desenvolvido por Thomas (1964)

ABSTRACT

Insulin is a low molecular weight protein widely used in the treatment of diabetes mellitus. Insulin preparations have traditionally been obtained from suine and bovine pancreatic tissue extracts chemically converted into human insulin. Human insulin may also be produced through recombinant DNA technology. Since impurities normally present in insulin preparations can cause serious immunological response, the use of adequate purification process is of fundamental importance in insulin production. In this context, process involving insulin adsorption on resins and the subsequent elution are suited for the recovery of highly purified insulin preparations.

The use of fixed and fluidized beds containing ion exchangers is particularly suited for insulin purification, presenting high adsorptive capacity and favorable kinetic properties. The need for scaling up purification process and the development of new adsorbents involve the attainment of data related to adsorption isotherms as well as data concerning to the kinetic behavior of the system.

In this work, experiments with insulin were carried out in order to assess the feasibility of the use of fluidized beds for the recovery and purification of this protein by adsorption on the ion exchanger resin Accel Plus QMA. Initially, the effect of the pH of the buffering solution was studied to determine the conditions of maximum insulin adsorption on the resin. The results indicated that maximum insulin adsorption achieved at pH 8,0. Data for the adsorption isotherms in stirred tanks, in fixed and fluidized beds were obtained, as well as the kinetic and the breakthrough curves for several initial concentrations. The performance of both fixed and fluidized beds were compared concerning to the breakthrough curves presented and to the recovery of the product after its elution with sodium chloride solution. It was verified that the adsorption and elution process in fluidized bed can lead to enrichment factors of 50, with yields of 80% on insulin recovery.

The convective and diffusive mass transfer parameters were calculated through the use for two different kinetic models for stirred tanks. The breakthrough curves were satisfactorily adjusted using a mathematical model developed by Thomas (1964).

CAPÍTULO 1

1- INTRODUÇÃO

A insulina é um hormônio peptídico secretado pelas células betas das ilhotas de Langerhans do pâncreas e exerce efeito regulador importante no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas (Brobeck, 1976). É um hormônio de transporte de glicose e aminoácidos para o interior das células. Estimula ainda o transporte de vários íons, tais como o potássio, através da membrana plasmática (Smith et al., 1985).

A descoberta da insulina está intimamente ligada ao conhecimento da natureza do diabetes mellitus, uma doença resultante da deficiência parcial ou absoluta desse hormônio. Esta doença crônica é caracterizada pela elevação do nível de glicose no sangue e presença de glicose na urina (Brobeck, 1976).

Em 1922, Banting e Best isolaram a insulina do pâncreas e conseguiram reverter as alterações metabólicas do diabetes. Em 1950, Sanger e colaboradores estabeleceram a seqüência completa dos aminoácidos da insulina. Esse trabalho inaugurou uma nova era química das proteínas, levando a descobertas excitantes na síntese química de proteínas biologicamente ativas (Brobeck, 1976).

1.1 - Natureza Química da Insulina

A insulina é uma molécula globular, tem um peso molecular de cerca de 5700 daltons e consiste de duas cadeias polipeptídicas, A (21 peptídeos) e B (30 peptídeos), unidas por duas pontes dissulfídicas de cistina, como mostra a Figura 1.1. Uma terceira ponte dissulfídica na cadeia A forma um anel dissulfídico intracadeia (Smith et al., 1985).

Este hormônio contém uma alta proporção de resíduos hidrofóbicos e prontamente se associa em solução para formar dímeros, e sobre certas condições, polímeros (Smith et al., 1985).

A atividade da insulina parece estar intimamente relacionada com uma peculiar forma tridimensional, determinada por sua estrutura primária de aminoácidos. A forma tridimensional da insulina é estabelecida pelas ligações de dissulfeto e a perda da sua atividade biológica ocorre quando essa ligação é quebrada (desnaturação) por calor excessivo ou exposição a bases e álcalis, mesmo que não haja alteração na estrutura de aminoácidos. Essas pontes dissulfídicas são também biologicamente importantes, e sua ruptura por agentes redutores resultará em perda quase total da potência da insulina (Brobeck, 1976).

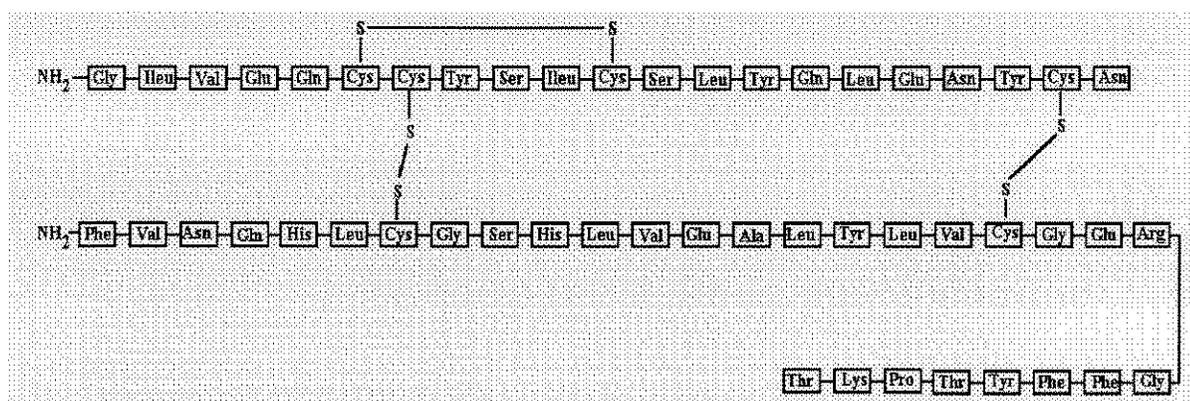


Figura 1.1- Estrutura primária da insulina humana.

A insulina é normalmente armazenada como um hexâmero, consistindo de seis moléculas de insulina estabilizadas por dois átomos de zinco. A adição de pequena quantidade de zinco no processo de purificação da insulina resulta na formação de cristais com características romboidais, com unidades básicas consistindo de um hexâmero com duas moléculas de zinco.

A insulina obtida de várias fontes diferentes são similares, embora não idênticas em toda seqüência de aminoácidos. Um aspecto inalterado é a posição das pontes dissulfídicas em todas as espécies de insulina até hoje identificadas, apresentando o mesmo número de aminoácidos no peptídeo cíclico da cadeia. A seqüência de aminoácidos das cadeias A e B de diferentes espécies são geralmente muito similares. A insulina de porco difere da insulina humana em somente um aminoácido: a threonina para espécie humana e a alanina para o espécie suína (posição 30 da cadeia B). A insulina bovina difere do hormônio humano em apenas três aminoácido, enquanto a insulina da ovelha difere em quatro aminoácidos (Walsh e Headon., 1994).

1.2 - Obtenção da Insulina Humana

Como já mencionado anteriormente, a insulina é produzida nas ilhotas de Langerhans situadas no pâncreas. Estas células compreendem apenas 1 a 2% do tecido pancreático, tendo a função de excretar principalmente três hormônios polipeptídicos: insulina, glucagon e somatostina. Cerca de 60% das células destas ilhotas produzem insulina, 25% produzem glucagon e 10% produz somatostina (Smith et al., 1985).

A insulina é um hormônio peptídico produzido inicialmente como proinsulina na membrana do retículo endoplasmático rugoso das células beta das ilhotas de Langerhans. A proinsulina é uma molécula onde tem-se uma cadeia de 34 peptídeos (peptídeo C) unindo o começo da cadeia A ao final da cadeia B. A proinsulina é então convertida em insulina em vesículas secretórias do complexo de Golgi. A conversão envolve uma clivagem proteolítica da molécula de proinsulina resultando em uma molécula de insulina e uma de peptídeo C (Walsh e Headon, 1994).

A preparação da insulina administrada em pacientes diabéticos foi por um longo tempo obtida dos tecidos pancreático suínos e bovinos saudáveis. A insulina suína pode ser considerada levemente mais vantajosa em relação à insulina bovina, devido sua seqüência de aminoácidos ser muito semelhante da insulina humana, e por isso esta causa menos reações imunológicas.

A purificação da insulina para fins terapêuticos foi realizada pela primeira vez na década de 20. Tal purificação consistia na extração da insulina do pâncreas do porco ou do boi, utilizando uma solução de álcool e ácido. A insulina obtida era muito impura. A insulina foi cristalizada pela primeira vez em 1926, mas o processo de cristalização era pouco entendido, o que impossibilitava os pesquisadores de cristalizar a insulina do extrato bruto do tecido pancreático. Os cristais eram isolados e posteriormente sujeitos a uma recristalização para diminuir o teor elevado de contaminantes. A insulina preparada desta maneira era chamada de insulina convencional. Embora tal processo de cristalização resultasse em uma grande purificação da insulina, tal método é considerado relativamente ineficiente para os padrões atuais. A obtenção de insulina convencional continha também moléculas de insulina modificada, tal como argenino-

insulina, desamido-insulina, ésteres de insulina e dímeros de insulina, todos formados durante o processo de extração com a solução álcool - ácida. Moléculas como o peptídeo C, a proinsulina e outros peptídeos vaso-ativo intestinais como o glucagon e a somatostatina eram encontrados em grandes quantidades no produto final. A insulina assim obtida era mantida em pH ácido para minimizar a proteólise da molécula de insulina e sua conseqüente desnaturação.

Estes contaminantes presentes na insulina convencional afetavam adversamente a insulina final, e freqüentemente causavam complicações clínicas quando administrada a pacientes diabéticos. Os contaminantes eram geralmente imunogênicos. Este fato torna-se bastante relevante se considerarmos que os pacientes diabéticos necessitam de várias injeções diariamente durante toda sua vida. Administração repetida desses contaminantes podem promover uma forte resposta imunológica. As reações imunológicas pode provocar uma inflamação e destruição do tecido ao redor do local da aplicação.

A insulina obtida de porco provoca uma resposta imunológica fraca quando administrada em seres humanos. Apesar disto, anticorpos anti-insulina são freqüentemente detectados no sangue de diabéticos. A presença de tal anticorpo de neutralização provoca um aumento cada vez maior da dose administrada para se conseguir o efeito biológico desejado.

Atualmente o processo de recristalização de insulina é acoplado a etapas de purificação por cromatografia para reduzir o nível de contaminantes tradicionalmente associados com a obtenção da insulina. A filtração em gel foi a primeira técnica utilizada, a qual efetivamente separava a insulina de contaminantes de alto peso molecular, tais como as enzimas proteolíticas e dímeros de insulina. Os contaminantes eluídos com a insulina,

tais como desamido-insulina e arginino-insulina, normalmente estavam dentro de uma limitada significância clínica. A insulina é eluída da coluna de filtração em gel em um pico. A insulina obtida por esta técnica de purificação é denominada frequentemente como insulina de pico simples.

Por razões econômicas, as colunas de filtração em gel são normalmente de grande porte. Muitos fabricantes utilizam um conjunto de colunas para o processo ser economicamente viável. O volume total das colunas chega a 100 litros. O volume da amostra a ser aplicada é da ordem de 2 litros, podendo ser obtidas até 50 gramas de insulina purificada. Uma corrida simples tem a duração de 7 horas. Uma etapa adicional de cromatografia pode ser realizada para diminuir ainda mais o nível de contaminantes presentes. O técnica da cromatografia de troca iônica é freqüentemente utilizada para este propósito. De acordo com os padrões atuais, o conteúdo de proinsulina não deve exceder a 10 ppm e os contaminantes com alto peso molecular não devem exceder a 1%.

Desde os anos 70, muitos métodos foram desenvolvidos para a produção em larga escala de insulina humana. Vários métodos como as sínteses químicas da molécula de insulina, embora possíveis, são economicamente impraticáveis. Outros métodos provaram ser econômico e tecnicamente possíveis. Dentre eles estão a modificação enzimática da insulina suína e a insulina produzida por microrganismos recombinantes, com modificações utilizando técnicas de engenharia genética.

A insulina humana foi pela primeira vez produzida por modificação enzimática no início dos anos 70. A insulina humana difere da insulina suína em apenas um aminoácido, como pode ser notado comparando-se as Figuras 1.1 e 1.2. O aminoácido encontrado no resíduo 30 da cadeia B é a alanina no porco e a treonina na insulina humana. O tratamento da insulina suína

com tripsina resulta em uma clivagem da cadeia B entre os resíduos 22 e 23 (e também entre as posições 29 e 30), e a remoção de um octapeptídeo da cadeia B. Um octapeptídeo sintético semelhante, com a treonina no resíduo 8 é então adicionado à molécula clivada pelo tratamento com tripsina. Este processo então converte insulina suína em insulina humana. A insulina produzida por este método é utilizada até os dias atuais (Walsh e Headon., 1994).

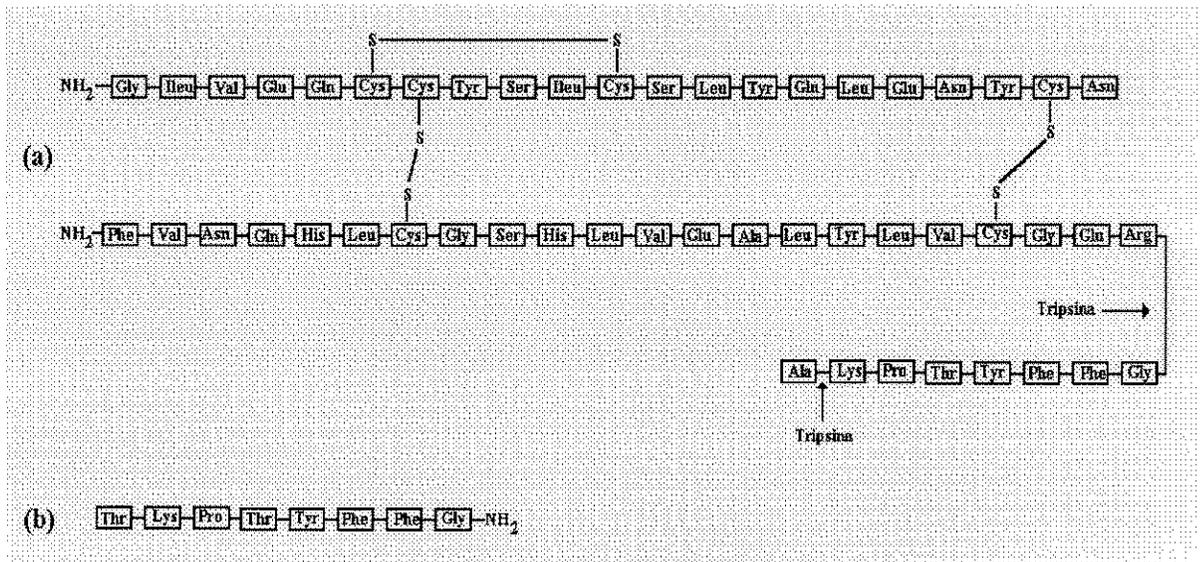


Figura 1.2 - (a) Estrutura primária da insulina suína mostrando as regiões onde a tripsina atua nos processos de clivagem. (b) Octapeptídeo sintético.

Este hormônio humano pode ser produzido ainda utilizando a tecnologia do DNA recombinante. A insulina foi o primeiro produto produzido por esta tecnologia, pelas indústrias farmacêuticas Eli-Lilly e aprovado, em 1982, para uso clínico (Dimarchi e Long., 1993). O sucesso

da produção de insulina utilizando microrganismos assegurou que os futuros suprimentos de insulina não dependeriam mais dos tecidos pancreáticos de animais comercialmente abatidos para o consumo humano. A quantidade de insulina obtida de um porco é suficiente para um paciente diabético por apenas três dias. A produção de insulina por microrganismos recombinantes elimina também um risco acidental de transmissão de doenças viróticas de tecidos pancreáticos infectados para o paciente.

A primeira insulina produzida pela tecnologia da engenharia genética foi produzida através da inserção no cDNA do código para a produção das cadeias A e B em células de *Escherichia coli*. As cadeias A e B são então purificadas através de diferentes sistemas e seqüencialmente acopladas através das pontes dissulfídicas. Esta proteína pode também ser produzida pela introdução do código para a produção de proinsulina humana em *Escherichia coli*. A proinsulina assim produzida, pode então ser convertida em insulina pela remoção enzimática do polipeptídeo de conexão (peptídeo C). Este método de produção tem sido mais comumente utilizado comparado com o método de produção das cadeias separadamente. Isto ocorre principalmente devido ao fato de ser necessário apenas uma simples fermentação e subsequente esquema de purificação. A insulina humana recombinante é produzida atualmente em largas escalas, com biorreatores com volume da ordem de 50 mil litros utilizados em cada ciclo de produção. Esta proteína humana pode ser produzida também por sistemas de levedura recombinante.

Embora a insulina produzida por métodos recombinantes seja idêntica ao hormônio nativo, algumas impurezas presentes na preparação do microrganismo ainda são encontradas. Entretanto, modernos métodos de

purificação de proteínas minimizam o nível de tais impurezas no produto final.

Um número de técnicas adicionais são ainda empregados para elevar mais o nível de pureza da insulina produzida. Tais técnicas incluem as cromatografia de interações hidrofóbicas de fase reversa (HPLC). Um fluxograma da produção industrial de insulina recombinante é mostrado na Figura 1.3.

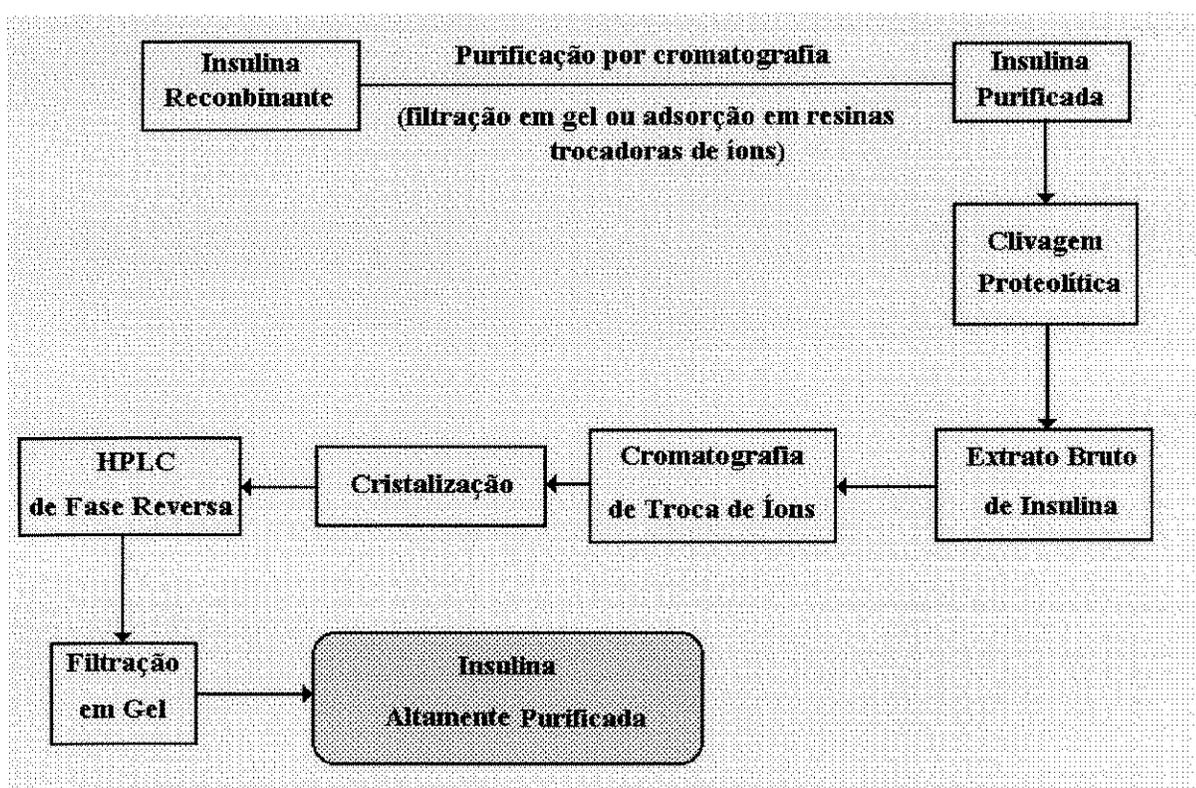


Figura 1.3- Técnicas de purificação utilizadas na produção industrial de insulina (Walsh e Headon., 1994).

Apesar da introdução de etapas adicionais de purificação diminuir o rendimento global do processo, estas aumentam a pureza final do produto. Os níveis de pureza excedem 98% com um rendimento global aceitável

economicamente. A cromatografia líquida de alta performance/pressão em fase reversa (RP-HPLC) é uma potente técnica de purificação. Esta técnica de cromatografia é capaz de isolar a insulina de um grande número de contaminantes, muito dos quais as cromatografias convencionais não removiam. Por exemplo, esta técnica consegue distinguir entre várias moléculas de insulina as que diferem em apenas um aminoácido. Esta pode também detectar várias formas de insulina modificada tais como as desamido-insulina e polímeros de insulina. Colunas RP-HPLC de grande escala, com volumes em torno de 80 litros, são construídas para facilitar as purificações industriais. Tais colunas podem ser utilizadas para purificar várias centenas de gramas de insulina em uma simples corrida. A HPLC e FPLC (cromatografia de pressão rápida) são também utilizados extensivamente em escala analítica para a produção de insulina de alta pureza. Estas cromatografias são comumente utilizadas em processos de controle de qualidade da insulina produzida industrialmente, devido à sua rapidez e sensibilidade.

Quando injetada diretamente no sangue, a insulina tem um tempo de meia vida de apenas poucos minutos, o que torna o controle do diabetes extremamente difícil. A administração de injeções subcutânea provoca um efeito mais prolongando do hormônio, pois este é lançado mais lentamente na corrente sanguínea. A insulina pode também ser formulada de muitas maneiras para prolongar o efeito da mesma. Um exemplo é a complexação da insulina com a protamina, que retarda a circulação do hormônio no sangue. Outro método de aumento do tempo de meia vida é a adição de zinco na preparação para promover a formação de cristais de insulina zíncica que são mais lentamente lançados na corrente sanguínea. As insulinas de curta ação são ativas por cerca de 8 horas, sendo que o pico da

atividade hormonal observada em tal caso se encontra entre 3 a 4 horas. As insulinas de longa ação, tais como a insulina protamínica e a insulina zíncica, têm ação por cerca de 36 horas (Walsh e Headon, 1994).

1.3 - Objetivos

A utilização de leitos fixos e fluidizados de partículas contendo grupos funcionais baseados na troca iônica apresenta altas capacidades de adsorção com cinética favorável. A ampliação de escala do processo bem como o desenvolvimento de novos adsorventes trazem a necessidade da obtenção de dados de processo como a determinação de isotermas de adsorção, de curvas cinéticas e também de curvas de ruptura (curvas de “breakthrough”) e de eluição.

O objetivo deste trabalho foi o estudo da adsorção de soluções de insulina diluídas na resina Accel Plus QMA, com a obtenção das isotermas de equilíbrio, das curvas cinéticas e dos parâmetros de transferência de massa envolvidos na adsorção nesta resina.

Pretendeu-se com os estudos de adsorção em leito fixo e fluidizado verificar o desempenho das duas maneiras de operação do leito e fazer-se um estudo matemático, utilizando modelos da literatura.

CAPÍTULO 2

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Características Gerais das Proteínas

As proteínas são os principais componentes do peso seco de organismos vivos e são compostas de polímeros de aminoácidos na forma de longas cadeias. A palavra proteína foi usada pela primeira vez por Jöns J. Berzelius em 1838, para salientar a importância dessa classe de moléculas e deriva da palavra grega proteios, que significa “da primeira classe”.

A grande maioria das proteínas é constituída por um repertório de 20 aminoácidos comuns formando cadeias de até milhares de aminoácidos. Cada aminoácido é distinguido por uma cadeia lateral característica que pode ser apolar, polar carregada (hidrofílica) ou polar não carregada. Na Figura 2.1 é mostrado a fórmula estrutural de um aminoácido na sua forma não iônica e iônica. A forma Zwitterion do aminoácido é caracterizada por um número de cargas positivas e negativas iguais, de tal forma que no global o peptídeo ou a proteína se encontra neutra eletricamente. Na Figura 2.2 é mostrada a fórmula estrutural geral de um polipeptídeo (tetrapeptídeo) típico que constitui as proteínas.

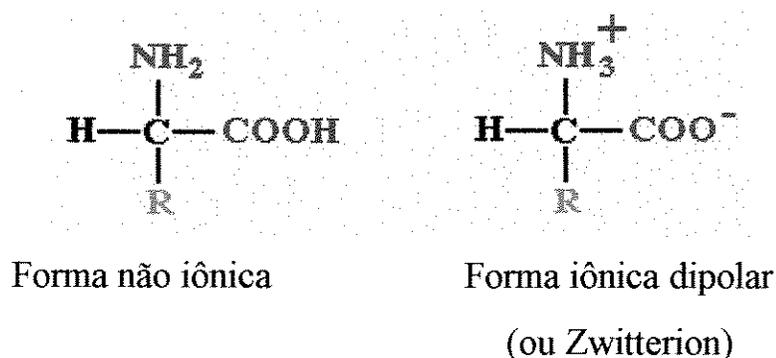


Figura 2.1 - Representação esquemática de um aminoácido na sua forma iônica e não iônica.

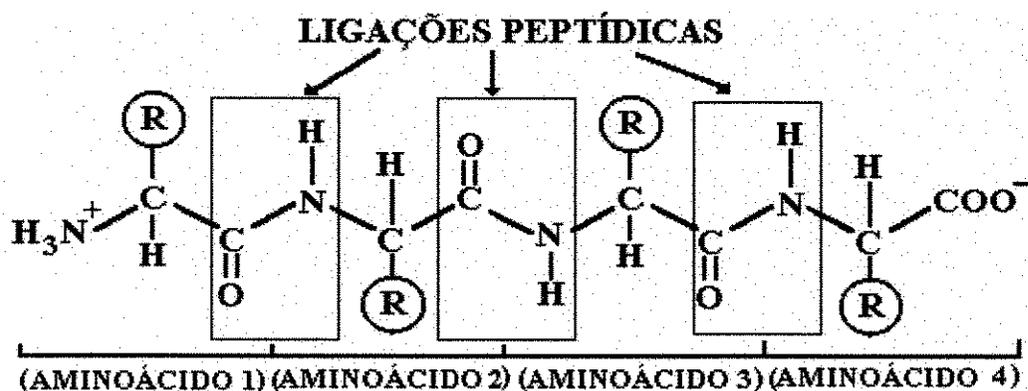


Figura 2.2 - Ligações peptídicas entre aminoácidos para a formação de proteínas.

A ligação peptídica mostrado na Figura 2.2 é rígida e planar. O posicionamento destes aminoácidos e sua sequência de resíduos na cadeia lateral define a estrutura da proteína, como está esquematizada na Figura 2.3. A conformação de uma proteína é determinada por suas estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias de acordo com a classificação seguinte (Stryer, 1988):

●Estrutura Primária:

Os aminoácidos individuais são acoplados por uma ligação amídica formando uma cadeia que é denominada 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 malha 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 como a insulina. A estrutura terciária é mantida pelas interações específicas entre os diferentes resíduos de aminoácidos, usualmente nas regiões das cadeias laterais, causadas por uma variedade de forças incluindo as ligações de hidrogênio, dissulfeto e hidrofóbicas além de ligações com pontes salinas.

●Estrutura Quaternária:

O arranjo de cadeias polipeptídicas em múltiplas cadeias compostas de subunidades 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 do tipo dissulfeto.

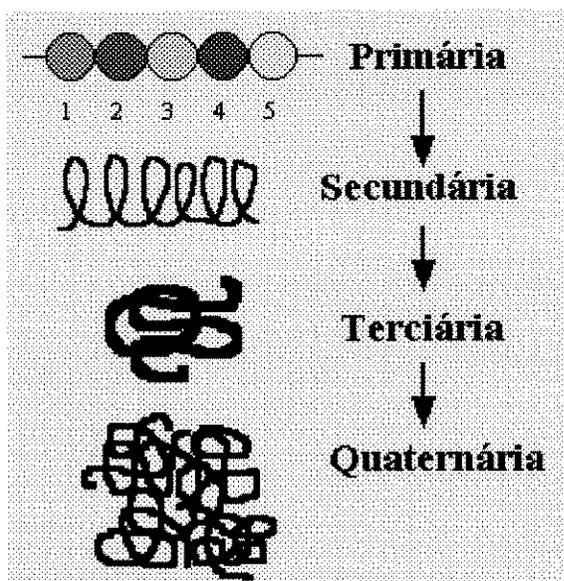


Figura 2.3 - Estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias de uma proteína.

A conformação global de uma proteína é a combinação das estruturas acima mencionadas, sendo ditada pela sequência 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 e toxinas
- Sustentação mecânica: colágeno, elastina e proteínas das membranas
- Armazenamento: caseína, ferritina e ovalbumina
- Transporte: hemoglobina, albumina, mioglobina e transferrina
- Mobilidade: miosina e actina
- Proteção imunológica: anticorpos e interferon (Stryer, 1988).

A fragilidade das estruturas protéicas em relação a perda de atividade biológica (desnaturação), bem como o conhecimento de que qualquer tipo de célula individualmente pode conter milhares de proteínas além de ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos e outros componentes, torna os processos de purificação de proteínas extremamente difícil. Fatores tais com pH, força iônica e temperatura podem afetar a atividade da proteína. O pH e temperaturas devem ser mantidos tão próximos quanto possível do ambiente natural da proteína. A maioria das proteínas é estável a temperaturas abaixo de 40 °C.

Considerando porém a combinação de técnicas clássicas de separação acopladas a modernos métodos cromatográficos de alta resolução e as técnicas eletroforéticas é possível atingir níveis de purificação bastante elevados apesar das dificuldades encontradas (Sofer e Nystron, 1989).

2.2 - Separação de Proteínas

Uma enorme variedade de biomoléculas são produzidas ou simplesmente separadas de extratos brutos. Atualmente diversas biomoléculas são produzidas geneticamente como a insulina, os hormônios do crescimento humano e bovino e interferon. Outras proteínas são ainda produzidas com modificações químicas, como é o caso da insulina suína transformada em insulina humana. O produto final dos processos de engenharia genética, modificações químicas e extração direta é um extrato bruto contendo uma infinidade de proteínas. Por isso é necessário conhecer bem a proteína de interesse e suas principais propriedades que serão exploradas na separação e purificação da mesma (Belter et al. 1988).

2.2.1 -Fundamentos para a Separação

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

- Tamanho:

O peso molecular das proteína varia em uma faixa muito ampla, desde alguns milhares até milhões. Por exemplo, o peso molecular da insulina é de 5.700 Dáltons enquanto o da hemocianina é de 6.700.000 Dáltons. O peso molecular médio da maioria das proteínas está na faixa de 4000 a 80000 Dáltons, sendo as proteínas maiores compostas de sub unidades. A proteína globular hemoglobina tem 574 aminoácidos dispostos em 4 cadeias com peso molecular total de 64.500 Dáltons. Estas 4 cadeias se enovelam na forma aproximadamente esférica com diâmetro de 64 Angstrons. Como comparação, um aminoácido simples como a alanina tem aproximadamente 5 Angstrons.

- Forma:

A forma das proteínas pode variar desde linear (proteínas fibrosas) a formas aproximadamente esféricas (proteínas globulares). Essa propriedade é altamente influenciada pelos aspectos físicos (temperatura) e químicos (pH, força iônica e tipo de solvente e tampão) do ambiente onde se encontra a proteína.

•Carga:

As soluções protéicas possuem comportamento de ácido-base devido aos terminais amino e carboxílicos presente nas proteínas. Em alguns casos cadeias laterais carregadas acentuam ainda mais este caráter anfôtero. A carga líquida da proteínas depende fortemente do pH do meio. O pH onde as cargas positivas e negativas se equivalem é chamado de ponto isoelétrico (pI) e é característico de cada proteína. Para valores de pH superiores ao pI a proteína se encontra carregada negativamente, e para valores inferiores ao pI, a proteína se encontra carregada positivamente. A Figura 2.4 mostra esquematicamente uma proteína no pI, e o efeito do pH na carga da mesma.

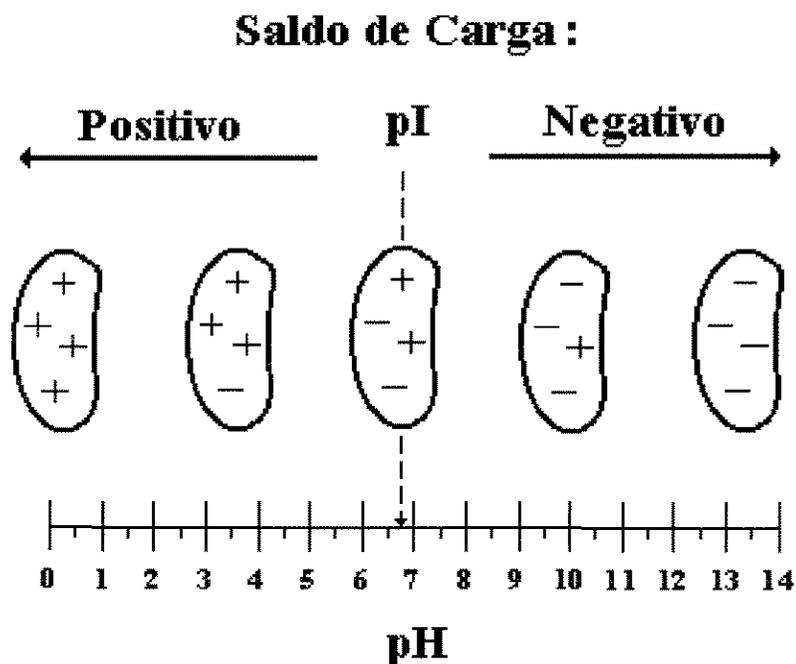


Figura 2.4- Efeito do pH na carga elétrica de uma proteína genérica.

- 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 pois são repelidos pelas moléculas polares da água. A interação de cadeias laterais apolares com essas regiões hidrofóbicas é 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:

A maior parte dos resíduos iônicos dos aminoácidos está localizada na superfície da molécula da proteína (ao contrário dos grupos hidrofóbicos). 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 em um ambiente definido e quaisquer mudanças nas condições (tipo de solvente ou tampão, força iônica e temperatura) pode causar uma precipitação diferenciada.

- Função:

A estrutura única de cada proteína determina a sua função ou atividade, bem como a sua bio-especificidade 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.

2.2.2 - Técnicas Utilizadas na Separação

São numerosas as técnicas envolvidas na separação de proteínas, ocorrendo normalmente uma sequência das mesmas quando se visa a obtenção de um produto final. Precipitação, eletroforese, cristalização, extração e adsorção em matrizes sólidas são alguns exemplos dessas técnicas. Será dado um enfoque maior sobre o estudo da adsorção em matrizes sólidas, pois esse é o objeto de estudo do presente trabalho.

•Precipitação:

É um dos métodos mais antigos para a separação de proteínas. Após a precipitação, as proteínas são geralmente separadas por centrifugação, flotação e filtração. Alguns métodos distintos de precipitação são:

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

Os dois maiores inconvenientes desse método são as contaminações por traços residuais dos precipitados e a dificuldade de atingir níveis elevados de purificação, apesar da precipitação por afinidade dar bons resultados (Santana, 1994).

- 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 porém mais recentemente desenvolvidas membranas que conseguem separação de proteínas que possuem pesos moleculares que diferem por uma fator de 2 (Michaels, 1990).

- Eletroforese

As amostras contendo as proteínas a separar 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. Desta forma é possível aplicar às amostras campos elétricos em direções ortogonais, fazendo com que a eletroforese ocorra num espaço bidimensional. Uma sofisticação dessa técnica é denominada 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:

Esta técnica é utilizada mais frequentemente para purificação de proteínas específicas e não para separar misturas de proteínas.

- Extração Líquido-Líquido:

Implica na distribuição de proteínas entre duas fases líquidas devida à solubilidade preferencial em cada fase. Vários sistemas podem ser utilizados, entre eles os constituídos por fluor-carbonetos (Asenjo, 1990) e por tensoativos em solução orgânica (Michaels, 1990). Nesse último caso, a formação de micelas reversas conduz à adsorção das proteínas presentes em uma solução aquosa.

Com a inclusão dos processos cromatográfico que serão discutidos a seguir, podemos afirmar que os processos de separação discutidos acima são na atualidade os mais viáveis para a utilização em escala industrial. A análise de cada situação específica definirá a estratégia do projeto do processo de separação (Santana, 1994).

2.3 - Adsorção em Matrizes Sólidas

Apesar de existir uma variedade de técnicas de purificação de proteínas, duas técnicas são mais usualmente utilizadas: cromatografia e adsorção. As colunas cromatográficas empacotadas com resinas são largamente utilizadas pois devido a sua seletividade, proporcionam um grande aumento na pureza do produto final. Embora as colunas cromatográficas tenham uma excelente resolução, as técnicas de adsorção em batelada não devem ser esquecidas, uma vez que esta é uma técnica rápida, e assim pode ser uma técnica valiosa quando a velocidade é prioridade.

A adsorção é um fenômeno no qual um componente (o adsorbato) concentra-se sobre uma superfície (o adsorvente) sem uma mudança química. As principais forças que governam a adsorção física são as forças de Van der Waals e de polaridade. Em resinas trocadoras de íons, a interação eletrostática entre uma molécula com carga e uma carga oposta sobre o adsorvente é o que provoca esta deposição (Anônimo, 1989)

Tanto a adsorção quanto a extração são processos utilizados 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 et al., 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 externamente da solução de adsorbato para a superfície externa da partícula de adsorvente (resistência à difusão na película líquida), difusão dentro dos poros da partícula (resistência difusional) e reação química na superfície da partícula de adsorvente (resistência à reação na superfície (Horstmann e Chase, 1989). A Figura 2.5 mostra os fenômenos envolvidos na transferência de massa numa partícula porosa (Carrère, 1993).

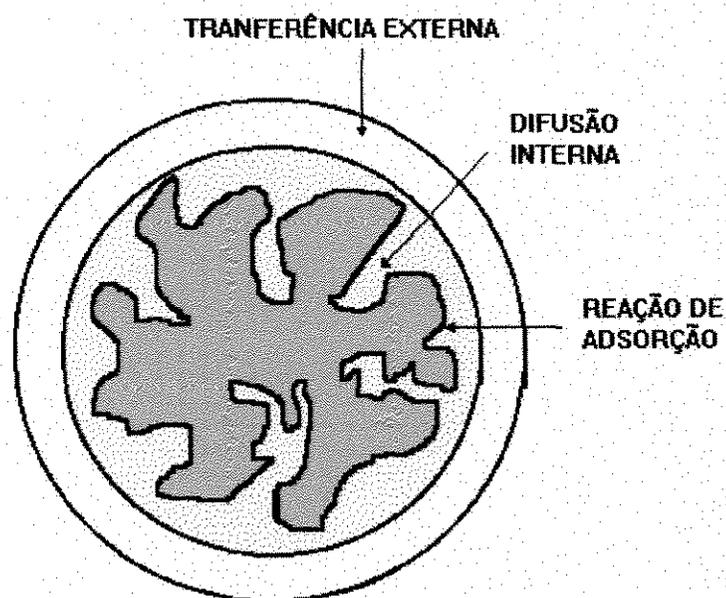


Figura 2.5- Fenômenos de transferência de massa numa partícula porosa (Carrère, 1993).

2.3.1- Adsorventes

As resinas adsorventes são estruturas altamente porosas com uma grande área superficial capaz de adsorver e dessorver uma larga variedade de espécies de proteínas diferentes, normalmente de uma maneira seletiva.

Os principais adsorventes para proteínas são resinas trocadoras de íons, materiais inorgânicos tal como os géis de fosfato de cálcio e os adsorventes com ligantes sintetizados quimicamente no qual uma ligante (o qual pode ser altamente específico para interagir com uma proteína particular) é ligado a uma matriz neutra de celulose, agarose ou uma outra variedade de polímero natural ou sintético (Scopes, 1987).

O adsorvente pode ser caracterizado através:

- da composição da resina
- da porosidade e área superficial

- da hidrofobicidade e hidrofiliabilidade
- de ligantes e grupos funcionais ligados à resina
- da estabilidade química (pH e tampão) e mecânica (pressão).

O adsorvente deve ainda ter as seguintes características: biocompatibilidade, resistência a microorganismos, esterilizabilidade, propriedades constantes e alta seletividade. Deve ser preferencialmente barato e produzido em grandes escalas por diferentes fabricantes, para se ter um preço competitivo (Anônimo, 1989).

2.3.2 - Aspectos Gerais dos processos cromatográficos.

Um leito constituído pelas partículas de resinas sólidas, percolado pelo líquido contendo proteínas (coluna cromatográfica) é a principal forma de contato para a obtenção da recuperação e da separação desses compostos. A fase sólida é denominada de fase estacionária enquanto a fase que contém a mistura a separar é a fase móvel. O princípio de separação de uma mistura consiste na existência de interações entre os constituintes da mistura e a fase estacionária, fazendo com que cada uma das espécies a ser separada seja transportada com velocidade diferente e trazendo como consequência a separação dos diversos constituintes. As técnicas cromatográficas podem ser classificadas de acordo com o objetivo da separação em:

separação analítica: o objetivo é obter uma análise qualitativa ou quantitativa da mistura.

-separação preparativa: separa-se uma substância, a qual é isolada em quantidades laboratoriais, onde se obtém alguns gramas do produto purificado.

-separação de produção: efetua-se a produção em escala semi-industrial ou mesmo industrial da biomolécula.

2.3.2.1- Tipos de Cromatografia Líquida

Os principais tipos de cromatografia líquida aplicáveis a proteínas são:

•**Cromatografia de Adsorção:** é governada por forças de van der Waals, pontes de hidrogênio, diferenças de polaridade e de momento dipolar. No caso de proteínas, essa técnica é pouco utilizada devido à sua pequena seletividade.

•**Cromatografia por Hidrofobicidade e em Fase Reversa:** é regida pelas interações hidrofóbicas. Para as proteínas prefere-se as interações hidrofóbicas mais fracas, pois evitam a desnaturação protéica.

•**Cromatografia de Afinidade:** baseia-se nas interações biológicas específicas. Um exemplo típico é a interação entre uma enzima e seu substrato. Esse método distingue-se claramente dos anteriores pela dimensão da superfície de contato, que se dá no nível de alguns aminoácidos, enquanto que nos outros métodos a área de contato pode atingir toda a superfície do polipeptídeo. Nessa metodologia de purificação, ligantes específicos como anticorpos e inibidores são adicionados às matrizes sólidas e adsorvem o produto desejado permitindo a passagem dos outros componentes. O princípio desta técnica é a transferência de um produto de uma fase original para uma outra em função de sua interação com um ligante específico que se encontra nesta segunda fase. A lavagem da coluna posteriormente à adsorção para a eluição da molécula desejada conduz a índices de purificação muito elevados

(da ordem de até dez mil vezes). A introdução de grupos ligantes é uma técnica bastante especializada, sendo descrita em manuais específicos como os da Pharmacia (uma grande produtora de resinas cromatográficas). Um esquema do princípio básico da cromatografia de afinidade é mostrado na Figura 2.6.

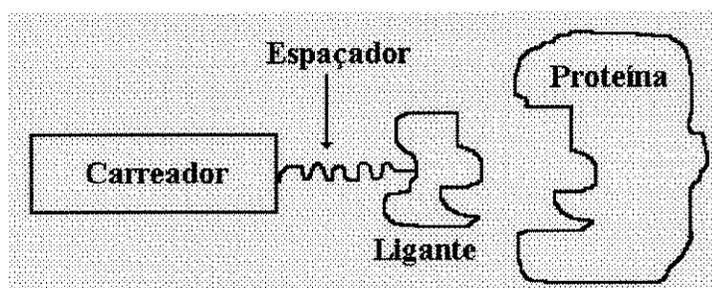


Figura 2.6 - Princípio básico da interação de uma proteína com uma resina de afinidade.

- **Cromatografia de Troca de Íons:** baseia-se nas interações iônicas e utilizam diferenças de cargas das proteínas (propriedades ácido-base). Esse tipo de processo será discutido em detalhes mais adiante devido a sua grande importância na separação de proteínas.

2.3.2.2 - Procedimentos Cromatográficos

São quatro os modos principais de operação de uma coluna cromatográfica, os quais podem ser resumidos em:

- **Método pulso ou eluição:** esse método é baseado no funcionamento da coluna cromatográfica analítica, onde uma vazão constante de um eluente

(solvente com força iônica elevada) com composição constante (isocrática) ou variável (gradiente) percola o leito de partículas. A mistura a ser purificada é injetada durante um breve intervalo de tempo e de modo periódico na entrada da coluna. Esse modo aplica-se bem a fracionamentos difíceis de quantidades limitadas de substâncias com alto valor agregado.

•**Método frontal:** esse modo é largamente utilizado na purificação de proteínas. Nesta técnica, a coluna é pré-equilibrada com um solvente de fraca força eluente e os compostos a serem purificados são introduzidos continuamente na coluna, onde são adsorvidos, enquanto as impurezas são eliminadas. A variação da concentração de adsorbato com o tempo na saída da coluna é conhecida como curva de ruptura (“breakthrough”) e a determinação da curva de ruptura para um dado sistema é chamado de análise frontal. Quando o adsorvente está saturado efetua-se a eluição (Chase, 1984; Santana, 1994).

•**Modo de deslocamento:** a coluna é pré-equilibrada com um solvente de força eluente fraca e a solução contendo a mistura de compostos a separar é injetada na coluna sendo seguida de deslocador (solvente com uma forte interação com a fase estacionária). Essa mudança de solvente permite acelerar a separação, evitando a proximidade dos picos obtidos.

•**Modo de eluição “step-wise”:** o procedimento é idêntico ao modo frontal com exceção da eluição, que é efetuada com vários solventes de forças eluentes crescentes.

2.3.3 - Adsorção em Resinas Trocadoras de Íons

As proteínas são adsorvidas nas resinas trocadoras de íons por ligações eletrostáticas 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 torna-se 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.

Pode-se tomar como exemplo o caso da troca de ânions ilustrado na Figura 2.7 onde uma proteína carregada negativamente é adsorvida em uma resina que possui o grupamento amino quaternário e íons cloreto:

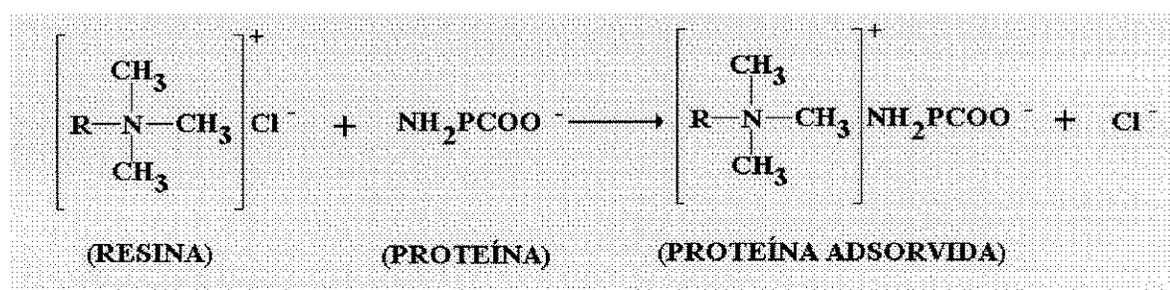


Figura 2.7 - Esquema do fenômeno da troca de ânions entre uma resina e uma proteína.

Essa etapa é denominada também de fixação da proteína. A eluição (ou dessorção) da proteína é obtida numa etapa suplementar através da

modificação do pH para um valor inferior ao pI da proteína, com adição de um ácido forte como HCl ilustrado na Figura 2.8.

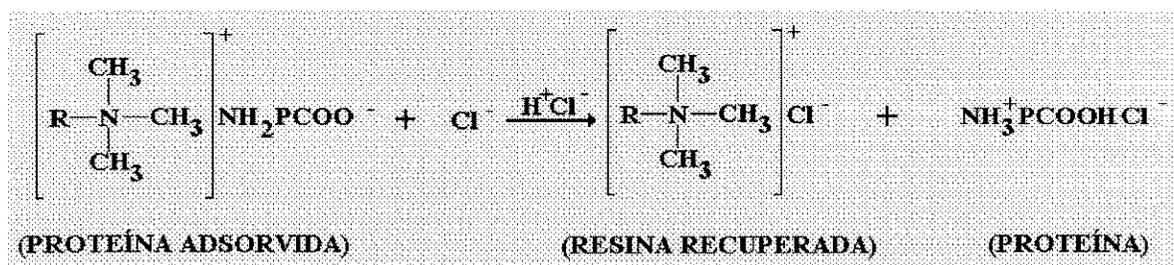


Figura 2.8 - Esquema do fenômeno de eluição pela adição de um ácido forte.

Um exemplo típico de sistema de adsorção que utiliza esse princípio é descrito por Carrère (1993), usando a resina Spherosil QMA para concentrar as proteínas lactalbumina e lactoglobulina a partir do soro de queijo. O ácido clorídrico com concentração 0,1 N foi utilizado como agente de eluição.

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 gráficos chamados de isotermas de adsorção. A função mostrada no gráfico representa, para cada concentração da solução protéica, a máxima capacidade de adsorção do adsorvente em uma dada condição de pH e 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 dada pela Equação 2.1.

$$q^* = \frac{q_m C^*}{k_d + C^*} \quad (2.1)$$

Onde:

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

q^* é a quantidade de soluto adsorvido por unidade de massa do adsorvente

q_m é a quantidade máxima adsorvida na fase sólida

k_d é a constante de dissociação definida como o inverso da concentração na fase líquida em equilíbrio com uma fase sólida contendo $q_m/2$ material adsorvido.

A capacidade máxima de adsorção de um dado adsorvente é quantificada pelo parâmetro q_m e representa o quanto o adsorvente é capaz de reter de adsorbato. Este valor independe da quantidade de adsorbato existente em contato com o adsorvente.

O modelo de Langmuir baseia-se nas seguintes hipóteses:

- a adsorção é limitada a uma monocamada
- a superfície interna do adsorvente 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 de Langmuir adapta-se com boa precisão à adsorção de proteínas em resinas trocadoras de íons (Horstmann e Chase, 1989; Draeger e Chase, 1990).

2.4.1- Adsorção em Tanques Agitados

Na adsorção em tanques agitados (em batelada) o contato entre as fases é realizado de modo a se ter um estágio de equilíbrio e desta forma obtêm-se as curvas cinéticas de adsorção.

Um esquema básico para a obtenção de curvas cinéticas consiste de um tanque agitado (homogeneizado) contendo o adsorvente e a solução de proteínas a serem adsorvidas, um espectrofômetro para a medição da absorbância da solução em função do tempo, o qual é acoplado a um sistema de aquisição de dados, e uma bomba circulando a solução pelo sistema, como é mostrado na Figura 2.9.

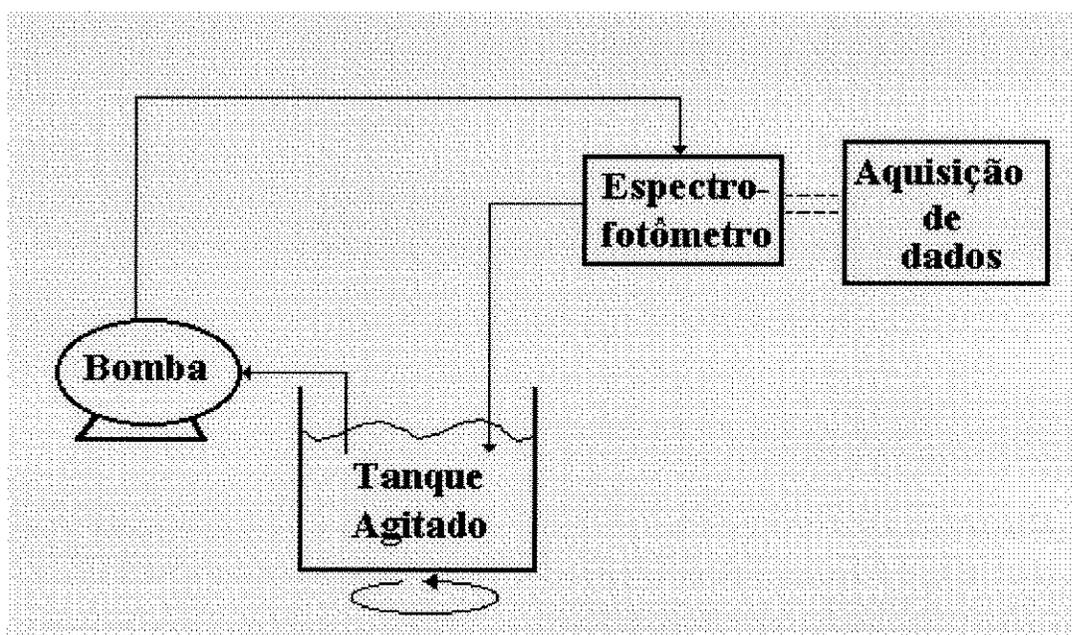


Figura 2.9 - Esquema básico de equipamentos necessários para a obtenção das curvas cinéticas e das isotermas de adsorção.

Utilizando-se este esquema é possível obter dados de concentração de soluto na fase líquida em função do tempo, como é mostrado pela curva cinética dada na Figura 2.10-(a). Com os valores de concentração de soluto na fase líquida em equilíbrio (C^*), obtido-os para cada concentração inicial de soluto (C_0), e com a auxílio de um balanço de massa no adsorvedor, determina-se a isoterma de adsorção (que é bem ajustada pela isoterma de Langmuir para o caso de resina-proteína) (Figura 2.10-b). O balanço de massa no adsorvente é dado pela Equação 2.2, onde V é o volume de líquido e W é a massa de adsorvente utilizada. Através da isotema determina-se os parâmetros cinéticos (q_m e k_d), fundamentais na ampliação de escalas dos processos.

$$qW = V(C_0 - C^*) \quad (2.2)$$

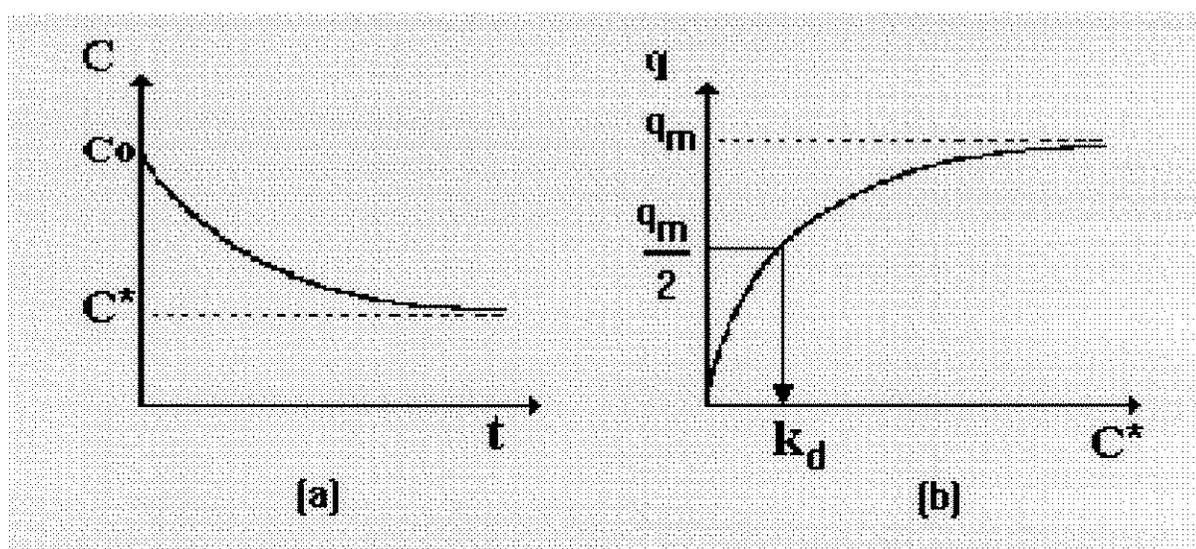


Figura 2.10 - Esboço ilustrativo de uma curva cinética (a) e de uma isoterma de adsorção (b).

Os parâmetros básicos da isoterma (curvas de equilíbrio), juntamente com os dados experimentais das curvas cinéticas em tanques agitados, permitem por exemplo, a utilização de formulações matemáticas para a obtenção dos parâmetros de transferência de massa (k_f - coeficiente de convecção externa e D_{ef} - coeficiente difusivo efetivo no adsorvente). Maiores detalhes dessa formulação matemática será apresentado no Capítulo 5.

2.4.2- Adsorção em Colunas

2.4.2.1- Adsorção em Leitos Fixos

A técnica de adsorção em leito fixo consiste da percolação de um leito empacotado em uma coluna vertical, por um fluido contendo o soluto que se deseja adsorver. Esta é a técnica de adsorção mais comumente utilizada e apresenta uma série de vantagens em relação ao tanque agitado. No início da operação, todo o soluto é adsorvido, sendo que na saída da coluna a concentração do mesmo é praticamente nula. A partir de um dado volume de soluto passado pela coluna, a resina começará a atingir sua capacidade máxima e começará a sair soluto no efluente (início do “breakthrough”). Assim que a resina atingir sua capacidade máxima, o soluto começará a passar diretamente através do leito e a concentração de soluto na saída será igual à de entrada (Belter et. al., 1988; Chase, 1984).

Após o estágio de adsorção, que é normalmente realizado até a soluto começar a sair da coluna (de 10 a 20% da concentração da solução aplicada), é realizado a lavagem. A lavagem é conduzida passando-se pelo leito apenas o solvente sem o soluto, para remover materiais adsorvidos não especificamente,

e esta é continuada até que os níveis de proteínas efluentes estejam abaixo de um nível aceitável. Após este estágio tem-se a eluição do material adsorvido no leito, que consiste na passagem do solvente com uma ou várias etapas de variação da concentração do eluente. Os picos de eluatos podem ser coletados por um sistema coletor de amostras. O último estágio consiste na regeneração da resina com o solvente indicado pelo fabricante da resina empacotada no leito ou simplesmente pela passagem do tampão utilizado na solução para reequilibrar a coluna. Desta forma, o leito está pronto para uma nova adsorção. O tempo de um ciclo e outro depende principalmente da especificidade e da capacidade da resina. A Figura 2.11 mostra um esquema dos estágios de operação de um leito fixo e da resposta do sistema em termos da variação da concentração de eluato com o tempo (Chase, 1984).

2.4.2.2- Adsorção em Leitos Fluidizados

A adsorção em leito fluidizado (expandido) é uma técnica nova para a recuperação de biomoléculas diretamente de alimentações não clarificadas em etapas anteriores. Essa técnica possibilita clarificar, capturar e concentrar uma determinada biomolécula em uma única operação. Em muitas situações de recuperação de proteínas por adsorção, o líquido inicial contém materiais particulados, tais como células e fragmentos. Desta forma, há a necessidade de uma etapa de filtração antes da adsorção em leito fixo (Pharmacia, 1991).

A utilização de leito fluidizado 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. Essa concepção tem sido explorada especialmente por fabricantes de resinas adsorventes

como a Pharmacia® e a Waters®, que têm procurado obter resinas mais densas e portanto mais apropriadas à operação com leitos fluidizados.

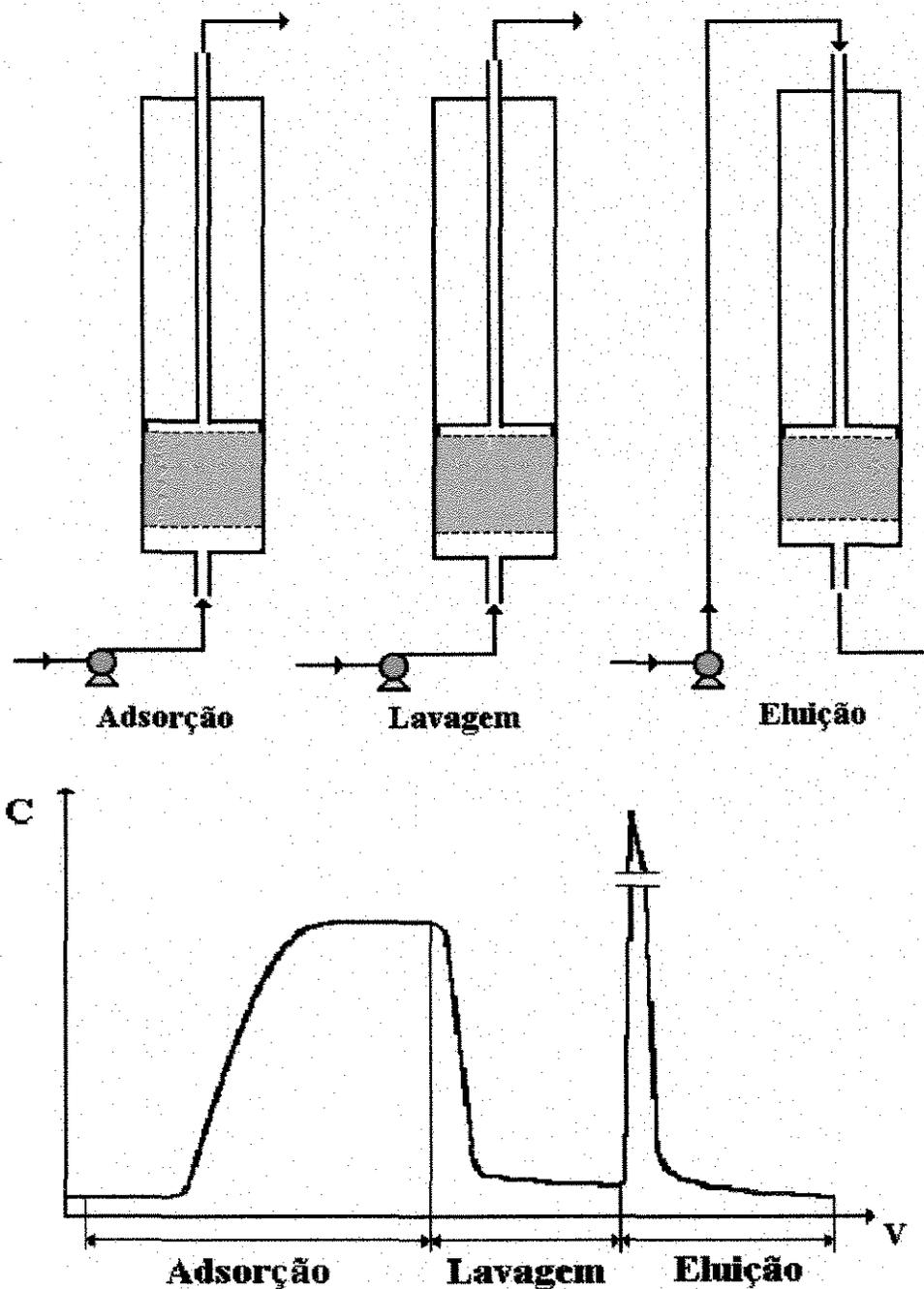


Figura 2.11- Estágios de uma separação por adsorção em leito fixo cíclico (Chase, 1984).

Os estágios da recuperação de proteínas por adsorção em leito fluidizado são basicamente os mesmos da operação em leito fixo mostrado na Figura 2.11, mas neste caso a altura do leito é maior nas etapas de adsorção e lavagem. A etapa de lavagem deve ser mais eficiente, para promover também a retirada do material particulado retido no leito. Esta etapa deve ser otimizada, para minimizar a diluição do produto (Pharmacia, 1991).

A Tabela 2.1 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 adequa bem a essa aplicação, pois sendo um sistema de porosidade global elevada, não sofre o problema da colmatagem (entupimento do meio poroso), o que resulta na economia de uma operação de separação de particulados como a filtração ou centrifugação, como mostra a Figura 2.12.

Os estudos pioneiros de Draeger e Chase (1990) e de Horstmann e Chase (1989) com proteínas modelos como a Albumina bovina (BSA) e imunoglobulina G utilizando leitos expandidos e adsorventes contendo grupos amino quaternários conduziram a um entendimento mais profundo dos efeitos de transferência de massa nos processos de adsorção, tal como a difusão intrapartícula do adsorvente e a resistência externa no meio contendo as biomoléculas. Os trabalhos de Firouztale et al. (1992) e Firouztale et al. (1994) com insulina e cefalosporina C, respectivamente, são também

importantes marcos na compreensão do fenômeno da adsorção de proteínas em resinas sólidas.

Tabela 2.1 - Rendimento e enriquecimento na recuperação de proteínas utilizando resinas trocadoras de íons em leitos fluidizados (resultados recentes) (GBF-Scientific Report, 1993).

Produto	Organismo	Adsorvente	Rendimento	Enriquecimento
galactosidase	<i>E. coli</i>	DEAE Sephrose	90%	5.5
malte desidrogenase	<i>E. coli</i>	Blue Sephrose	80%	3.4
proteína de fusão	<i>E. coli</i>	DEAE Sephrose	90%	-
fumarase	<i>S. cerevisiae</i>	Streamline DEAE	70%	7.1
glucose 6-fosfato desidrogenase	<i>S. cerevisiae</i>	Streamline DEAE	75%	9.4

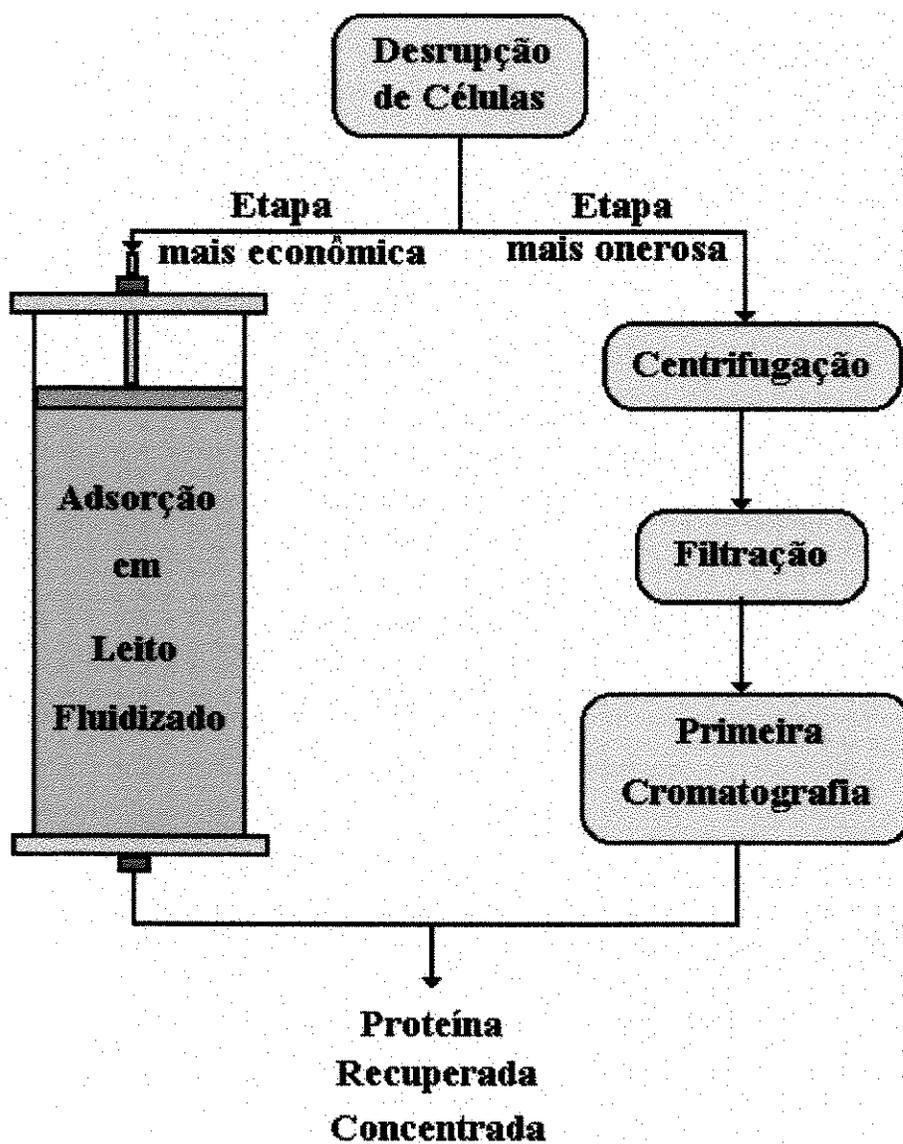


Figura 2.12 - Vantagem da utilização da utilização da cromatografia em leito fluidizado (GBF-Scientific Report, 1993).

CAPÍTULO 3

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Será abordada neste capítulo uma descrição da metodologia e dos equipamentos utilizados na determinação dos dados cinéticos e de equilíbrio, bem como das curvas de “Breakthrough”. Os experimentos foram basicamente realizados em tanques agitados e em colunas de adsorção com leito fixo e fluidizado.

3.1 - Materiais Utilizados

3.1.1 - Adsorvato

A insulina humana foi utilizada como proteína padrão nos experimentos realizados. Amostras de Insulina Zíncica humana em forma de cristais foram gentilmente doadas pela BIOBRÁS - Bioquímica do Brasil S/A, situada em Montes Claros - MG.

Encontrou-se dificuldade na preparação das soluções de insulina devido esta ser fornecida como insulina zíncica, onde seis moléculas do hormônio são estabilizadas por dois átomos de zinco. O que se obtinha no

ato da adição de uma dada massa de insulina em um dado volume, era uma solução opaca (leitosa). Após 15 horas de repouso, tinha-se uma solução translúcida, pronta para realização dos experimentos.

3.1.2 - Adsorvente

O adsorvente utilizado nos experimentos foi a resina trocadora de íon Accel Plus QMA. Este adsorvente aniônico a base de quaternário de amônio é fornecido pela Waters, uma divisão da Millipore. Esta resina é produzida por um processo de copolimerização onde há o encapsulamento de uma base rígida de sílica por uma camada de ligações hidrofóbicas e uma camada de ligações cruzadas altamente estáveis. Esta resina tem uma alta especificidade e uma excelente eficiência de recuperação de biomoléculas. A estrutura rígida e não compressível desta resina é adequada para a purificação e isolamento de proteínas e enzimas. Esta resina é comercializada na forma de um pó branco finamente dividido e seco. Suas principais características são (Waters Publications, 1987):

- Tamanho de partícula: 37 a 55 μm
- Tamanho médio dos poros: 500 Angstroms
- Massa específica das partículas secas a 22 °C: 2,32 g/ml (Araújo, 1996)
- massa específica das partículas embebidas em tampão TRIS/HCL: 1,16 g/ml
- porosidade: 60%.

3.1.3 - Solução Tamponante

Os experimentos foram realizados utilizando Tris (Tris hidroximetil amino metano) com o pH corrigido com HCl. Trabalhou-se com soluções de Tris/HCl com força iônica 50 mM. A solução foi preparada adicionando-se uma massa de 24.228 g de Tris (massa molecular- 121.14 g/gmol) em 4 litros de água destilada. Antes de completar os 4 litros de solução, adicionava-se HCl concentrado para corrigir o pH e completava-se os 4 litros.

3.1.4 - Equipamentos Utilizados

3.1.4.1 - Bomba Tipo Pistão

Foi utilizado uma bomba tipo pistão LC-10AS, parte integrante de um equipamento de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) da Shimadzu. Seus principais parâmetros de operação são:

- vazão: 0 a 9.99 ml/min com escala de 0.01 ml/min
- pressão: 10 a 400 kgf/cm² com escala de 1 kgf/cm²

3.1.4.2 - Espectrofotômetros

Dois espectrofotômetros foram utilizados:

-Hitachi U-2000 com capacidade para leitura de vários comprimentos de ondas simultaneamente na região do visível e do ultravioleta.

-Detector SPD-10AV da Shimadzu com capacidade de leitura contínua de em apenas um comprimento de onda na região do visível e do ultravioleta.

3.1.4.3 - Sistema de Aquisição Contínua de Dados

O sistema de aquisição contínua de dados analógicos consiste em uma placa (CAD10/22) de conversão do sinal analógico em digital (conversor A/D) e um software: AqDados. O AqDados é um programa que instalado em um microcomputador onde está instalado o conversor A/D, permite a coleta de sinais; visualização gráfica dos dados adquiridos em tempo real; tratamento estatístico; e armazenamento dos dados experimentais em tempo real. Com o auxílio da curva de calibração este software fazia os cálculos e os gráficos em concentração de insulina (vide Figuras 3.3 e 3.4).

3.1.4.4 - Outros Equipamentos

- banho agitado da marca Shaker Bath - Lab Line (veja Figura 3.3);
- coluna de vidro modelo XK-16/20 da Pharmacia com dimensões da coluna: 1.6 cm de diâmetro por 20 cm de altura (veja Figura 3.4);
- balança analítica marca Mettler AJ150;
- pHmetro Delta 340 da Mettler.

3.2 - Metodologias Experimentais

3.2.1 - Determinação da Concentração de Insulina

Os métodos de absorção de luz ultravioleta para a quantificação de proteínas tem várias vantagens: pode ser realizada diretamente com a amostra, sem requerer reagentes adicionais; pode ser realizado rapidamente, pois não requer incubação e a relação entre concentração de proteína e absorbância é linear, dada pela lei de Lambert-Beer como mostra a Equação (3.1).

$$A = \varepsilon \cdot C \quad (3.1)$$

onde A é absorbância lida para a concentração da solução C e ε é o coeficiente de extinção da proteína.

Sabe-se que as proteínas absorvem ativamente luz na região do ultravioleta com dois máximos, em torno de 280 e 200 nm como mostra a Figura 3.1.

Os máximos devem-se ao fato de que somente a fótons com um certo nível de energia poderem ser absorvidos por um elétron fazendo-o passar de um orbital para um outro mais energético. Utiliza-se o máximo a 280 nm o qual é caracterizado pela absorção de luz dos aminoácidos fenilalanina, triptofano, histidina e tirosina. O espalhamento da luz ultravioleta pode ocorrer quando a concentração de proteína é muito elevada (devido o movimento Browniano das moléculas) ou quando existem micropartículas insolúveis suspensas. Desta forma a absorbância resultante também leva em

conta este espalhamento.. Como se pode observar pela Figura 3.1, a 320 nm as proteínas não absorvem luz UV, mas a solução absorve por espalhamento que é a mesma quantidade absorvida a 280 nm por este efeito. Logo é comum utilizar esta técnica de determinação de proteína a 280 nm, descontando o espalhamento medido a 320 nm (Stoscheck, 1990).

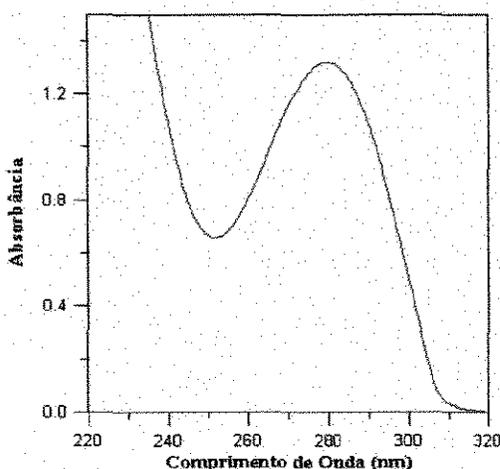


Figura 3.1 - Esboço esquemático da absorção de luz ultravioleta para proteínas.

Como trabalhou-se com soluções de insulinas diluídas na faixa de 0,2 a 3,5 mg/ml, descartou-se o espalhamento por este ser insignificante e calibrou-se o equipamento utilizando-se apenas o comprimento de onda de 280 nm. Por exemplo, o espalhamento medido pela absorção a 320 para a solução a 1,012 mg/ml foi nulo e para uma concentração de 3,5 mg/ml foi 0,18% do valor lido a 280 nm ($A^{280} = 3,753$, $A^{320} = 0,007$).

Para a calibração do detector de absorbância (detector SPD-10AV da Shimadzu), preparou-se várias soluções com concentrações diferentes de insulina. Estas soluções eram injetadas no equipamento (com auxílio da

bomba tipo pistão) a mesma e determinava-se a absorvância a 280 nm, como mostra a curva de calibração dado pela Figura 3.2.

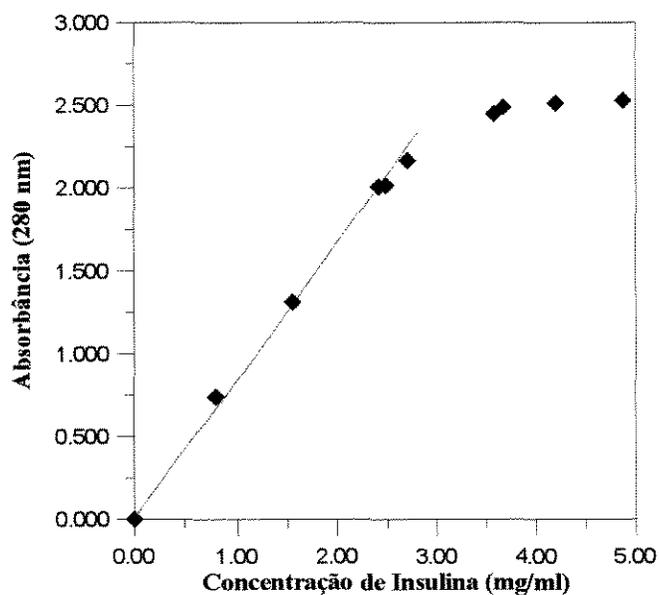


Figura 3.2 - Curva de calibração do detector espectrofotométrico da Shimadzu para as soluções de insulina em tampão Tris/HCl 0.05 M, pH 8.0 a 24 °C.

A reta de regressão linear, utilizando a técnica dos mínimos quadrados é dada pela Equação (3.2) e o coeficiente de correlação da reta foi de 0,999.

$$C = 1.218 \cdot A^{280nm} \quad (3.2)$$

3.2.2- Determinação da Cinética de Adsorção de Insulina em Tanques Agitados

O sistema mostrado na Figura 3.3, foi utilizada para a determinação das curvas cinéticas. Utilizou-se nos experimentos soluções de insulina a várias concentrações. Estas soluções eram colocadas em um becker ou erlemeyer de 250 ml de capacidade contendo a resina.

As etapas do procedimento experimental foram:

- 1- Liga-se o equipamento, zera-se o sistema, zerando previamente o detector com a circulação do tampão. Posteriormente deixava-se circular pelo sistema, com a vazão desejada, a solução a ser testada por aproximadamente 20 minutos.
- 2- Ajusta-se o banho com uma rotação de 225 rpm e temperatura de aproximadamente 24 °C.
- 3- Pesa-se 3 gramas da resina no bécker a ser utilizado no experimento e coloca-se a mangueira de sucção da bomba contendo o filtro no mesmo, fixando o no banho. Posteriormente coloca-se 100 ml da solução de insulina no recipiente sobre a resina, ligando-se em seguida a bomba com uma vazão pré selecionada de 2 ml/min.
- 4- No sistema de aquisição de dados, era selecionado o nome do arquivo no qual seria armazenado os resultados bem como a frequência de coleta de dados. Deixava-se este ligado até que o gráfico mostrado na tela atingisse uma linha de base (veja Figura 3.3).

O banho agitado consiste na utilização de um banho termostaticado e agitado para manter o adsorvente e a solução (contendo o adsorbato) numa distribuição uniforme e com temperatura constante. A Figura 3.3 mostra a

apresentação esquemática do equipamento utilizado. Nesta figura, o índice (1) representa o banho contendo um Becker o qual está sobre uma plataforma giratória com velocidade angular ω ("Shaker"). No becker, contendo o adsorvente e a solução de adsorbato, foi colocado um filtro na sucção da bomba tipo pistão (2). A bomba circula a solução pelo sistema fazendo a mesma passar pelo detector de luz ultravioleta (3), o qual esta acoplado a um sistema de aquisição de dados (4).

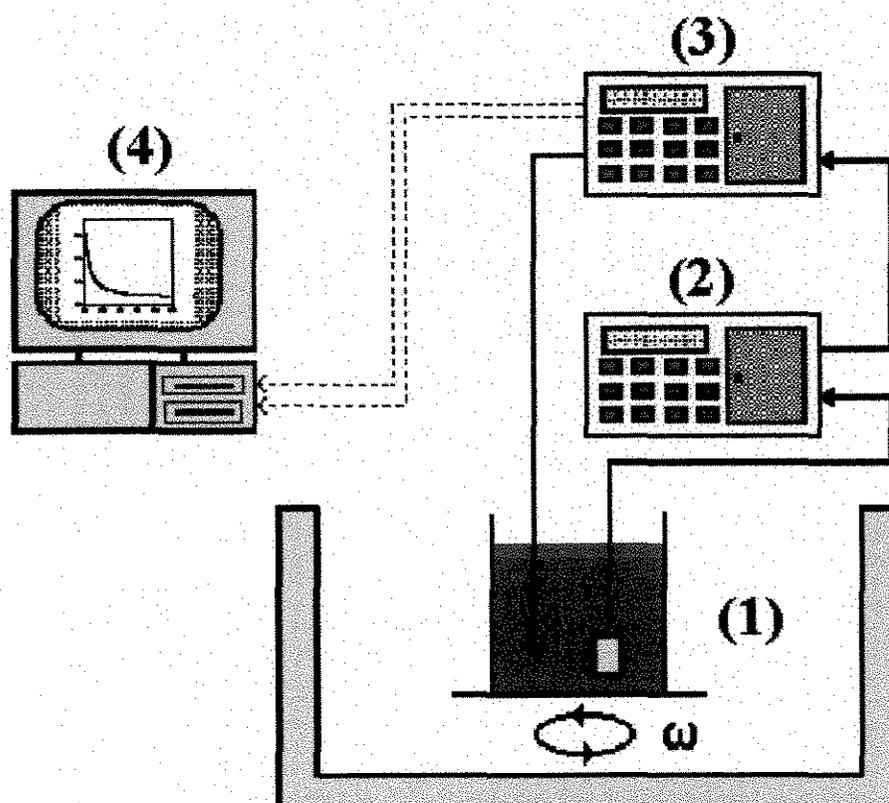


Figura 3.3 - Esquema experimental de um banho agitado.

3.2.3 - Adsorção de Insulina em Colunas

Os experimentos de adsorção foram realizados utilizando a coluna como leito fixo e fluidizado. A diferença está na expansão do leito. No leito fixo não há expansão e o mesmo é dito empacotado. No leito fluidizado ocorre a expansão, podendo assumir diversos valores de altura do leito, dependendo da vazão da solução aplicada no sistema. Este equipamento foi utilizado para fazer a análise cromatográfica frontal do adsorvente-adsorbato com a consequente determinação das curvas de “breakthrough”. A Figura 3.4 mostra a representação esquemática do equipamento utilizado.

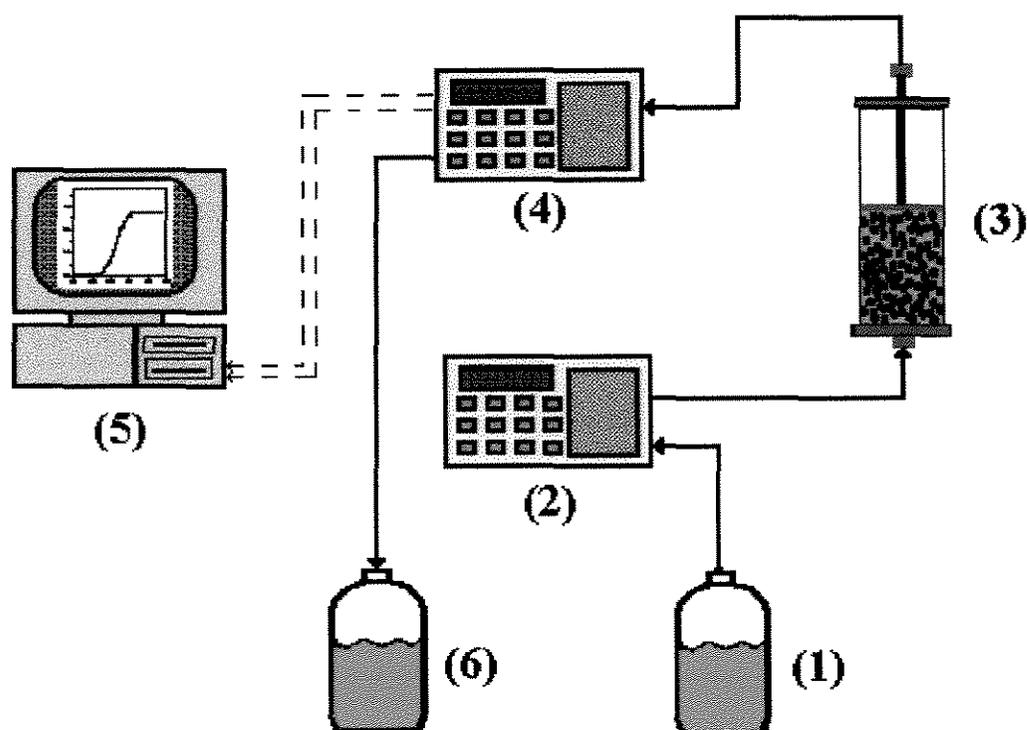


Figura 3.4 - Esquema experimental da coluna de adsorção.

Nesta figura o índice (1) representa o frasco contendo a solução de adsorbato, que é bombeada pela bomba tipo pistão (2). Esta bomba faz a solução percolar pela coluna de adsorção (3) a qual contém a resina trocadora de íon. Monitorando a saída da coluna temos um detector de luz ultravioleta (4) que está acoplado a um sistema de aquisição contínuo de dados (5). O efluente do sistema é coletado em um vasilhame (6) e posteriormente descartado.

3.2.4 - Expansão de leitos de Adsorção

Os testes de expansão do leito consiste em determinar-se a relação entre a vazão aplicada e a altura do leito fluidizado. Estudou-se o sistema Accel Plus QMA e tampão Tris/HCl 0.05 M, pH 8.0. Para cada vazão selecionada foi deixado por 30 minutos o sistema em operação para deixar o leito estabilizar a altura. A altura era determinada por leitura direta de uma régua fixada na parede externa da coluna.

3.2.5- Corridas de Adsorção e Eluição

Na coluna de adsorção mostrado na Figura 3.2 foram realizados ensaios de adsorção e eluição para a obtenção das curvas de “breakthrough” e de eluição.

Os ensaios de adsorção foram realizados na coluna operando a como leito fixo e fluidizado. O fluxo nos experimentos em ambos as operações foi ascendente.

Na obtenção das curvas de “Breakthrough” seguiu-se as seguintes etapas:

-carregou-se a coluna com 3.0 gramas da resina em estudo e ajustou-se a altura do pistão em 8.5 cm para a operação em leito fluidizado (nos testes de expansão do leito verificou-se que para uma vazão de 2.0 ml/min tinha-se uma altura média de 8.5 cm de leito) e 4.0 cm para a operação em leito fixo;

-fixou-se a vazão em 2.0 ml/min, colocando na sucção da bomba a solução com a concentração desejada de insulina;

- ligou-se o sistema e deixou a solução percolando o leito por várias horas até atingir um patamar constante, no gráfico mostrado no sistema de aquisição de dados.

Na obtenção das curvas de eluição, utilizou-se fluxo descendente de 2 ml/min. Inicialmente lavou-se o leito com a solução tampão para retirar as moléculas de proteínas não adsorvidas com um volume equivalente a mais de 5 vezes o volume do leito. Posteriormente procedeu-se a eluição propriamente dita com uma solução de NaCl 1.0 M e Tris/HCl 0.05 M pH 8.0. O eluido era coletado em tubos de ensaio. A cada 30 segundos trocava-se o tubo. As concentrações das amostras eram determinadas com o auxílio do espectrofotômetro da Hitachi - U2000, utilizando-se diluições de 20 para 1.

CAPÍTULO 4

4- RESULTADOS EXPERIMENTAIS: ANÁLISE E DISCUSSÃO

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

4.1 - Experimentos em Tanques Agitados

4.1.1 - Efeito do pH na Adsorção da Insulina

O sistema estudado foi a resina Accel Plus QMA com o hormônio insulina zíncica humana.

Foi realizado inicialmente um estudo do efeito do pH para verificar em que condição a capacidade de adsorção da resina Accell Plus QMA é máxima, utilizando-se uma solução padrão de 0,5 mg/ml de insulina em tampão TRIS/HCl 0.05 M. Os experimentos foram realizados em tanque agitado com a temperatura controlada na faixa de 23 a 25 °C. A Figura 4.1 mostra a capacidade de adsorção desta resina trocadora de íon em vários valores de pH

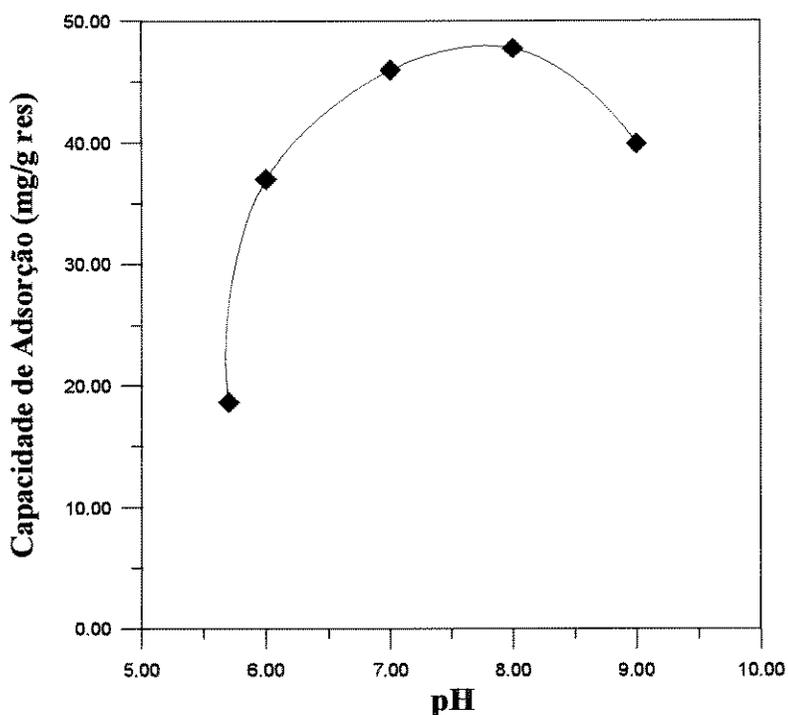


Figura 4.1 - Capacidade de adsorção da resina Accel Plus QMA em vários valores de pH das soluções de insulina em tampão TRIS/HCl 0,05 M.

Esta figura mostra que esta resina, nestas condições de temperatura e força iônica, exibe um máximo de adsorção em torno do pH 8,0. O pH 9,0 representa o limite superior de pH, pois acima deste valor a resina não é estável (dados do fabricante); e abaixo do pH 5,8 a insulina precipita-se (próximo ao $pI = 5,7$).

Fixando o pH em 8,0 para todos os experimentos em tanque agitado e em coluna, com o sistema Accel Plus QMA tampão TRIS/HCl 0,05M, obteve-se todas as demais curvas mostradas neste capítulo.

4.1.2 - Determinação da Cinética de Adsorção de Insulina

O comportamento cinético da adsorção na faixa de concentração em que se trabalhou são mostradas na Figura 4.2. As demais curvas cinéticas obtidas são mostradas no Anexo I.

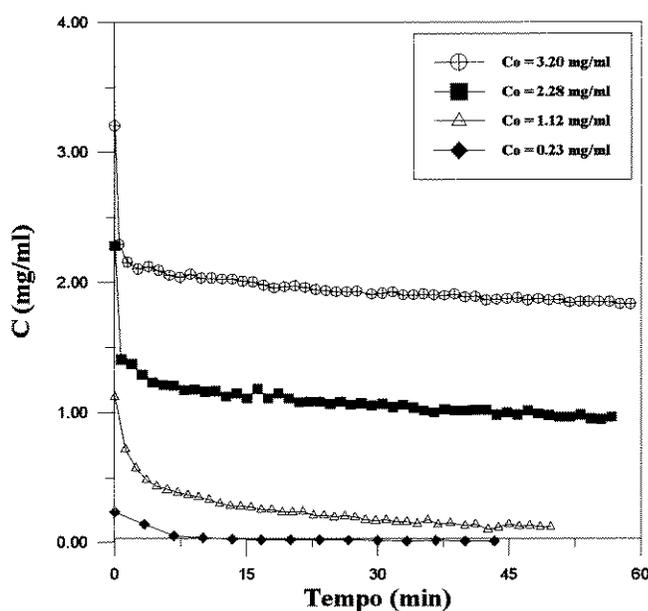


Figura 4.2 - Curvas cinéticas para várias concentrações de insulina. Sistema: Accel Plus QMA, tampão TRIS/HCl 0,05M pH 8,0.

As condições operacionais adotadas foram:

- vazão da bomba tipo pistão: 2 ml/mim
- velocidade de agitação: 200-225 rpm
- temperatura do banho: 23 - 25 °C

Trabalhou-se com a velocidade de agitação dada acima devido a limitações do sistema. Velocidades maiores que a dada acima

proporcionariam uma maior homogeneização do sistema resina - solução de insulina, mas com este acréscimo aumentava-se também o espumamento do sistema, dificultando a leitura da absorbância no detector de UV. Na faixa dada acima não observou um intenso espumamento.

Os experimentos tiveram uma duração de em torno de uma hora, mostrando uma grande afinidade da resina para com a proteína insulina, evidenciada pela rápida adsorção (cerca de 10 min) do sistema em estudo. Estas curvas apresentam patamares diferentes devido aos vários valores de concentração utilizados. Quanto maior a concentração inicial da solução, menor será a percentagem de proteína adsorvida, devido a resina possuir uma dada capacidade de adsorção. Esse tipo de informação é importante no dimensionamento de adsorventes, visando a otimização da quantidade de proteína a ser adsorvida. Pode-se notar pela Figura 4.2 que após 10 minutos de operação a resina começa a atingir sua capacidade máxima de adsorção.

De acordo com Draeger e Chase (1990), a isoterma de Langmuir ajusta-se bem aos dados experimentais de adsorção de proteínas em resinas trocadoras de íons. A expressão da isoterma de Langmuir é dada na Equação 2.1. O objetivo da obtenção 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 máxima de adsorção de um dado adsorvente em contato com uma dada proteína.

A Tabela 4.1 mostra os dados de equilíbrio utilizados para a construção da isoterma de adsorção para o sistema em questão. Com os dados mostrados na Tabela 4.1, pode-se obter a isoterma de adsorção indicada na Figura 4.3. A massa de resina utilizada nestas figuras foi de 0,5 gramas.

Tabela 4.1 - Dados utilizados para a construção da isoterma de adsorção do sistema Accel Plus QMA/insulina em tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0.

Co (mg/ml)	C* (mg/ml)	q* (mg/g-ads)
3,200	1,850	299,70
2,580	1,270	290,82
2,280	0,960	293,04
1,660	0,350	290,82
1,120	0,120	222,00
0,229	0,014	47,73
0,203	0,013	42,14
0,188	0,028	35,63
0,182	0,027	34,32

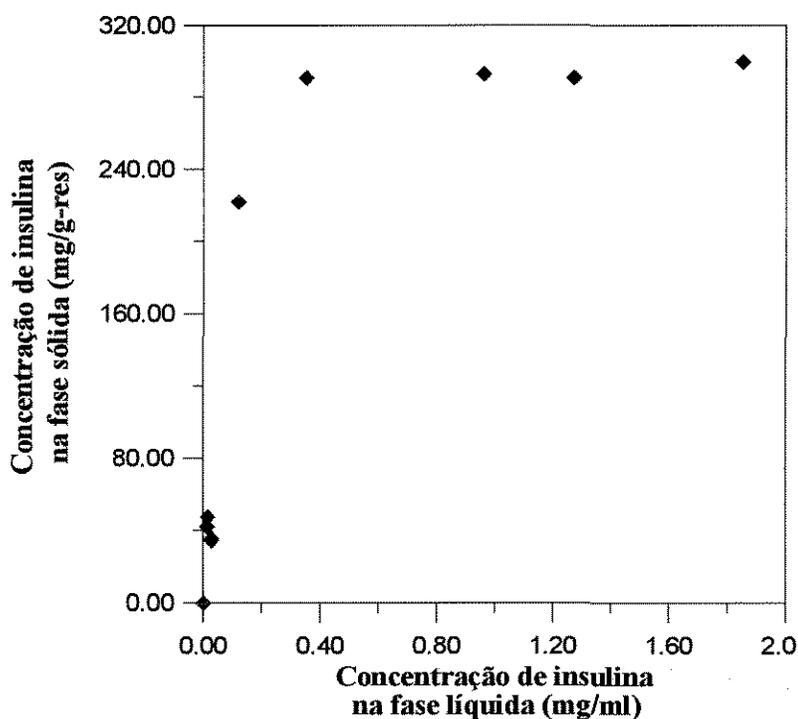


Figura 4.3- Isotherma de adsorção para o sistema Accel Plus QMA/insulina em tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0, operação em tanque agitado.

4.2 - Experimentos em Coluna de Adsorção

4.2.1 - Operação em Leito Expandido

Foram realizados na coluna de adsorção, preliminarmente, testes de expansão do leito. Através desses testes foi possível estabelecer a vazão de trabalho com a qual iria se realizar os experimentos para a obtenção das curvas de ruptura e as isotermas de adsorção. A Figura 4.4 mostra o comportamento da coluna frente ao teste de expansão. Para o cálculo das velocidades superficiais a partir das vazões volumétricas, foi utilizada a área da seção transversal da coluna que corresponde a $2,01 \text{ cm}^2$. Nesta figura são apresentadas três curvas na qual foram utilizadas as resinas virgem (sem nenhuma utilização), carregada (com a proteína) e eluída. Como era de se esperar, a resina virgem é relativamente mais leve que a mesma quando carregada ou eluída. A resina eluída mostrou-se mais densa que a resina virgem, indicando que algumas proteínas são adsorvidas tão fortemente que só podem ser desorvidas em condições mais extremas de pH e força iônica, o que poderia danificar a resina. A massa de resina utilizada nestes ensaios foi de 3,0 gramas.

Como se pode observar pela Figura 4.4, a diferença de altura entre o começo da operação (com a resina virgem ou eluída) e o final (resina carregada), torna-se relativamente grande após a velocidade superficial acima de 1.0 cm/min . Desta forma ao se trabalhar com velocidades superficiais acima deste valor durante a operação de adsorção, seria necessário de tempos em tempos abaixar o pistão da coluna para evitar assim a formação de uma região sem adsorvente, servindo apenas como

região de diluição do efluente do leito expandido (vide Figura esquemática 4.5). Estas interrupções para o abaixamento do pistão mudariam também as condições hidrodinâmicas da operação, o que provoca uma maior perda de proteína na saída da coluna, pois em cada parada o leito sedimenta-se, mudando assim totalmente esta condição de operação. Com a sedimentação a capacidade de adsorção máxima obtida ($Q_{\text{máx}}$ obtida) será maior que a capacidade máxima que seria realmente obtida ($Q_{\text{máx}}$ real). Portanto devido a boa estabilidade do leito escolheu-se operar a coluna com uma vazão de 2 ml/min (com velocidade superficial em torno de 1.0 cm/min), o que fornece uma expansão do leito em torno de 8.5 cm.

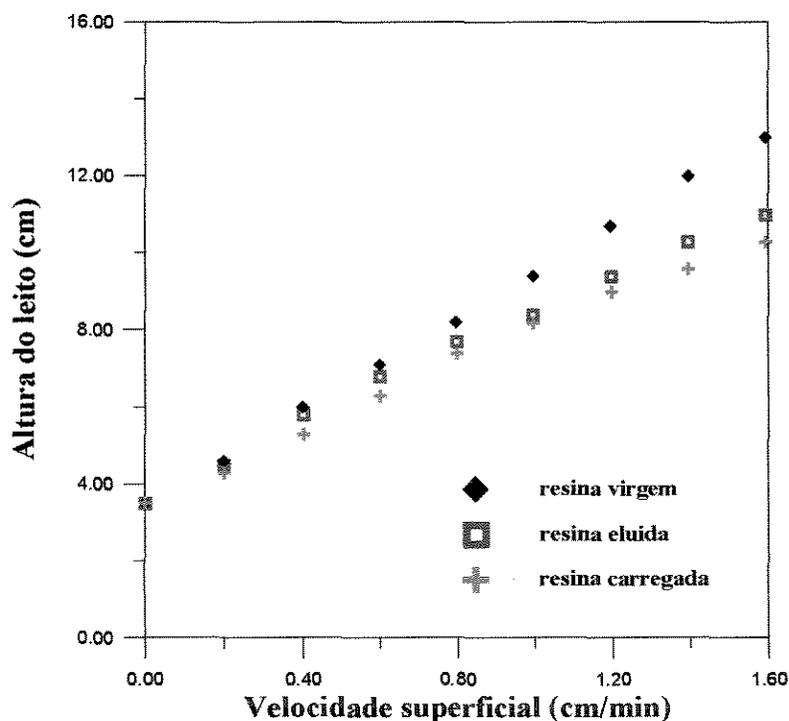


Figura 4.4 - Teste de expansão do leito utilizando três gramas de resina em três condições distintas.

A Figura 4.5 mostra curvas de rupturas típicas, apresentando-se na forma de degrau. No início, a concentração de proteína na saída da coluna (onde é feito o monitoramento da concentração) é nula e a curva toca o 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 a passagem de proteína através do leito e a concentração na saída começa a se elevar. Neste instante observa-se uma elevação brusca da concentração indicando que a resina está atingindo sua capacidade máxima de adsorção onde a concentração de proteína na saída passa a ser igual a concentração de entrada.

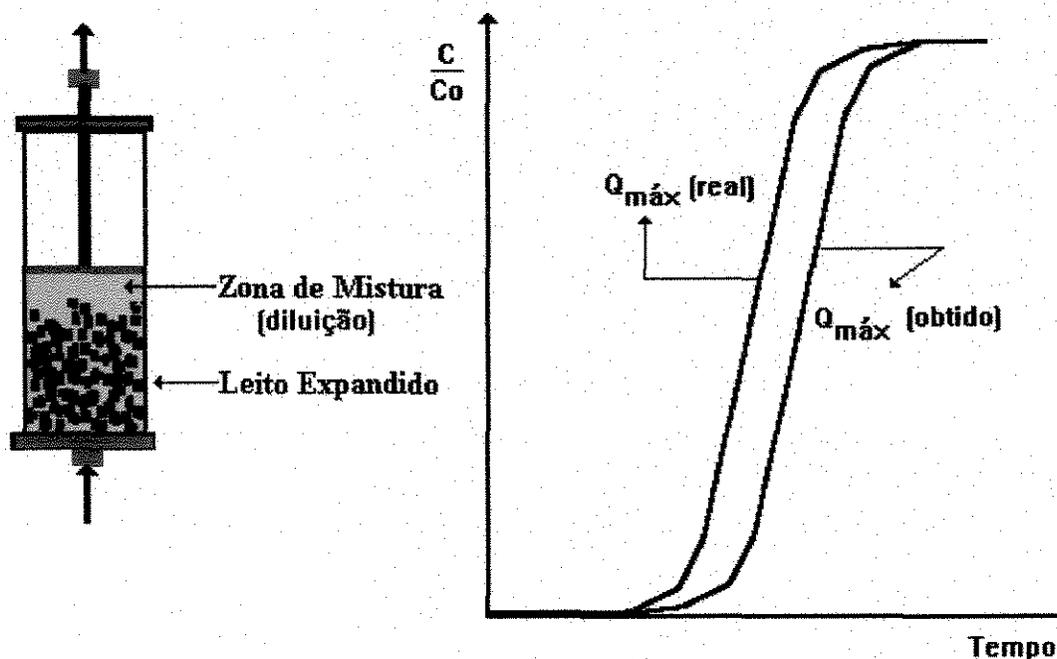


Figura 4.5 - Coluna de adsorção com o pistão ajustado acima do leito expandido, mostrando duas zonas distintas e curva de ruptura obtida com e sem a zona de mistura.

Na Figura 4.6 são mostradas algumas curvas de ruptura obtidas para o leito expandido para várias concentrações iniciais de insulina. As demais curvas de ruptura obtidas serão mostradas no Anexo II.

Uma outra maneira de apresentar o comportamento do leito expandido frente à adsorção é mostrada na Figura 4.7, onde a concentração de saída (C/C_0) é dada como função da quantidade de insulina aplicada.

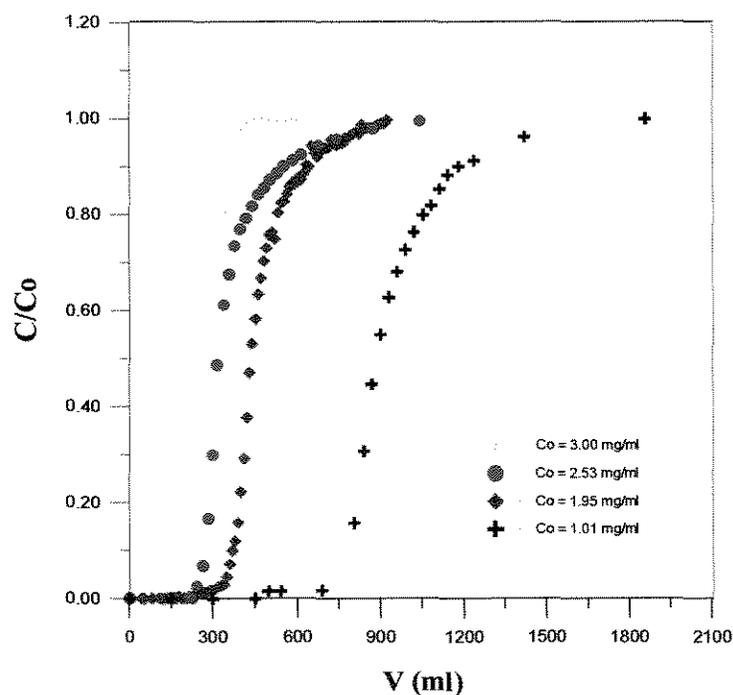


Figura 4.6 - Curvas de ruptura obtidas para diferentes concentrações de insulina em leito expandido. Condições operacionais: altura do leito 8,5 cm, vazão 2,0 ml/min.

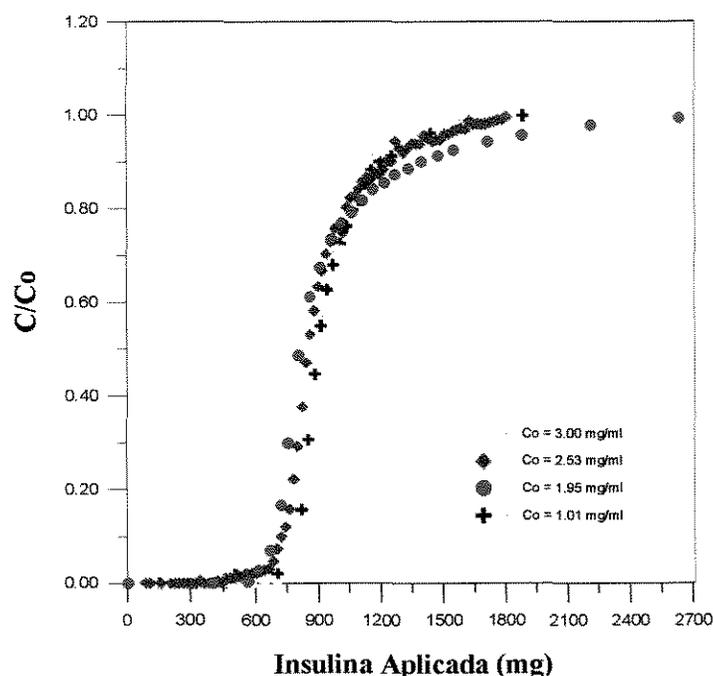


Figura 4.7 - Insulina aplicada no leito expandido em soluções com diferentes concentrações. Condições operacionais: altura do leito 8,5 cm, vazão 2,0 ml/min.

Pode-se observar pelas curvas apresentadas que com o aumento da concentração de insulina, o ponto de ruptura (começo da elevação brusca da curva) é mais rapidamente atingido (vide Figura 4.6).

Após a obtenção das curvas foi possível determinar a isoterma de adsorção. A técnica utilizada foi a análise frontal descrita no Capítulo 2. O método de cálculo baseia-se nas considerações apresentadas no trabalho de James et. al. (1954).

A coluna é previamente equilibrada com a solução tampão e é percolada por uma solução de concentração C_0 e o equilíbrio é atingido quando a concentração de saída atinge o valor da concentração da entrada, como é mostrado pela Figura 4.8.

Realizando-se um balanço de massa integral é possível determinar a concentração de soluto adsorvido na fase estacionária (q^*), a qual está em equilíbrio com a concentração C_0 , como mostra a Equação 4.1.

$$q^* = \frac{C_0(V_f - V_m) - \int_{V_m}^{V_f} C dV}{m_{ads}} \quad (4.1)$$

Nesta equação, a integral representa a área sob a curva de um gráfico de concentração da solução efluente em função do volume de solução injetada. O parâmetro V_f representa o volume final injetado até que a concentração C seja igual a C_0 na solução efluente. V_m é o volume morto do sistema, correspondendo ao volume ocupado inicialmente pela solução nos tubos de entrada e no interior da coluna.

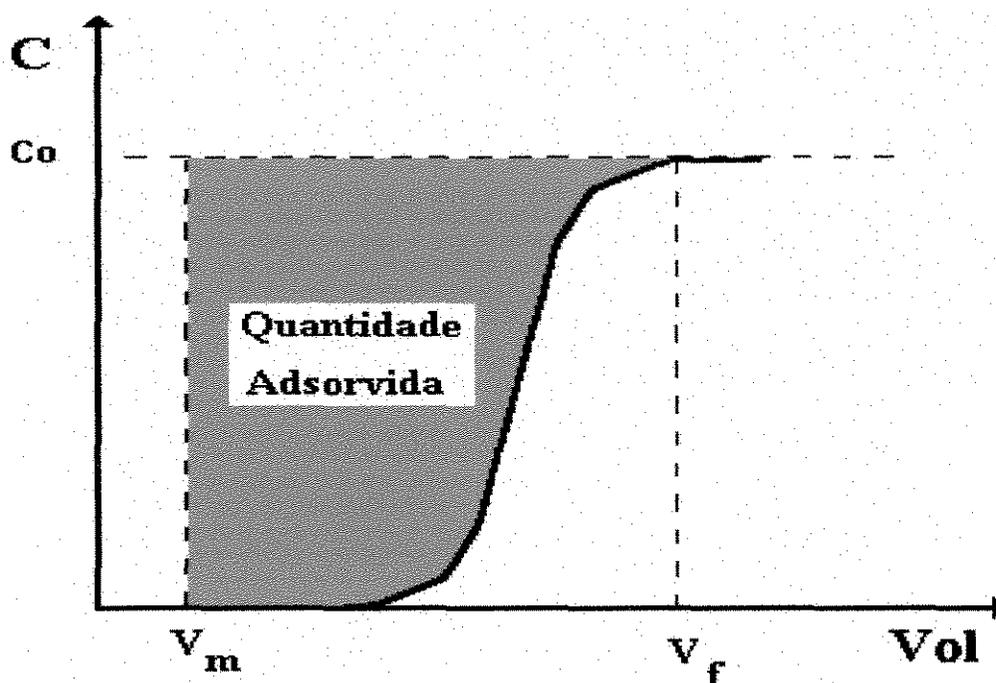


Figura 4.8- Determinação da quantidade adsorvida por análise frontal.

Nos experimentos realizados, o volume de solução injetada na coluna foi maior que 1500 ml para a maioria dos experimentos e a capacidade da coluna é de cerca de 12 ml, correspondendo a menos de 1% do volume passado pela mesma. Desta forma considerou-se desprezível este volume morto da coluna ($V_m=0$).

Fazendo-se uma integração numérica das áreas abaixo das curvas de ruptura e resolvendo a Equação 4.1, obtêm-se os vários valores de concentração de insulina adsorvida na resina Accel Plus QMA dados na Tabela 4.2. Com os dados mostrados na Tabela 4.2, pode-se obter a isoterma de adsorção dado na Figura 4.9.

Tabela 4.2 - Quantidade de insulina adsorvida por massa de resina em várias concentrações de soluções de insulina utilizando leito fluidizado.

Co (mg/ml)	q*(mg/g-res)
0,202	282,50
0,307	303,87
0,580	289,13
0,825	294,97
1,012	317,60
1,733	308,70
1,884	302,14
1,940	302,29
2,534	313,18
3,000	310,65

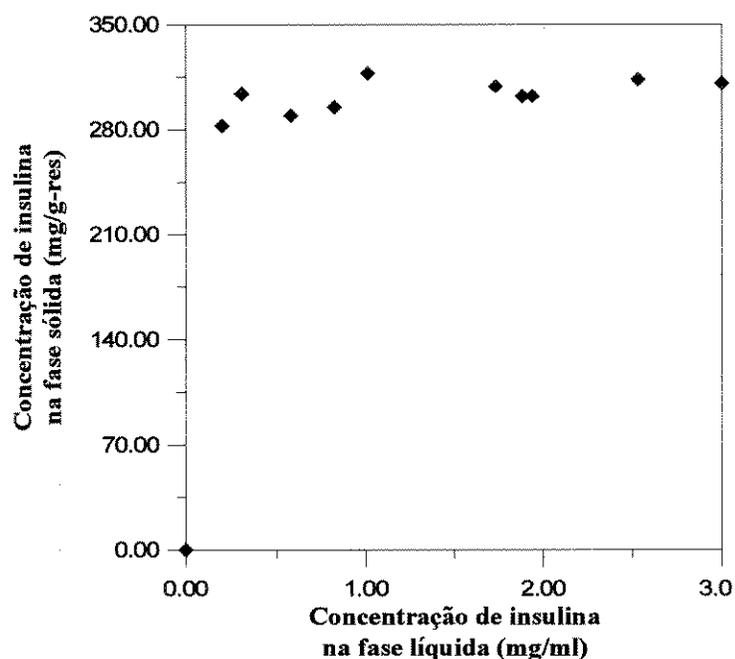


Figura 4.9 - Isoterma de adsorção: operação em leito expandido (altura 8.5 cm).

4.2.2 - Operação em Leito Fixo

A operação da coluna em leito fixo foi semelhante ao caso anterior, mas neste caso o leito é empacotado com uma altura de 3,7 cm. As condições operacionais tais como temperatura e vazão da solução foram as mesmas do caso anterior, para assim poder comparar as duas maneiras de operação da coluna. A Figura 4.10 mostra as várias curvas de ruptura obtidas em leito fixo.

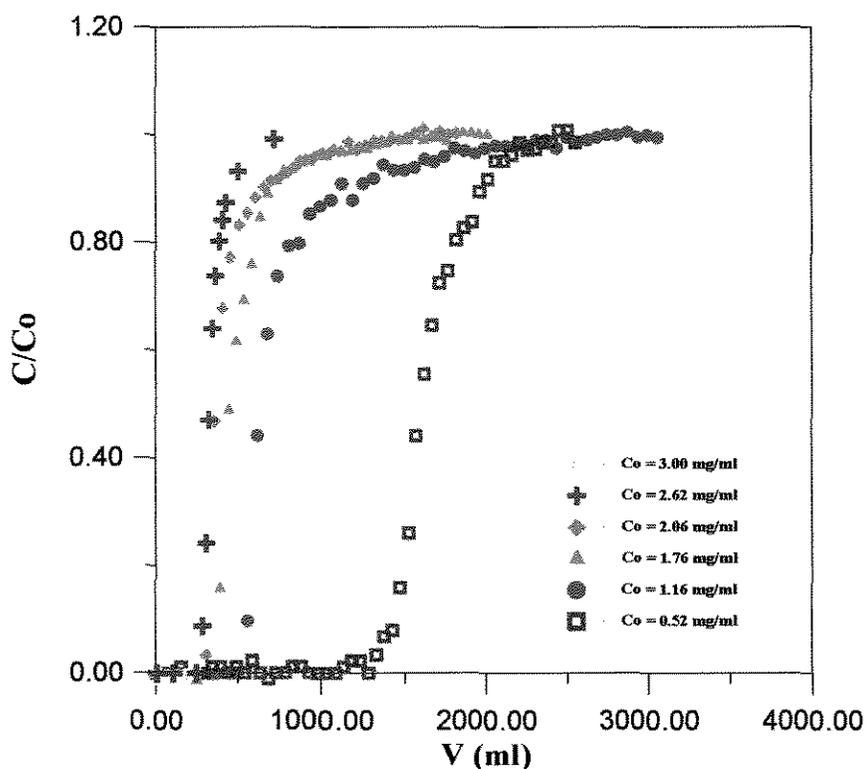


Figura 4.10 - Curvas de ruptura obtidas para diferentes concentrações de insulina em leito fixo. Condições operacionais: altura do leito 3,7 cm, vazão 2,0 ml/min.

Como foi observado para o caso do leito expandido, o aumento da concentração de insulina também minimiza o volume de solução injetado na coluna operando em leito fixo para a saturação da resina.

Utilizando-se a Equação 4.1 de maneira análoga à citada anteriormente, obtém-se os dados de concentração de insulina adsorvida por unidade de massa da resina Accel Plus QMA ilustrados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Quantidade de insulina adsorvida por massa de resina Accel Plus QMA para várias concentrações de soluções tamponada com TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0 utilizando leito fixo.

Co (mg/ml)	q*(mg/g-res)
0,52	286,97
1,16	299,66
1,76	306,61
2,06	302,16
2,62	307,51
3,00	306,09

Com os dados mostrados na Tabela 4.3, pode-se obter a isoterma de adsorção dada na Figura 4.11.

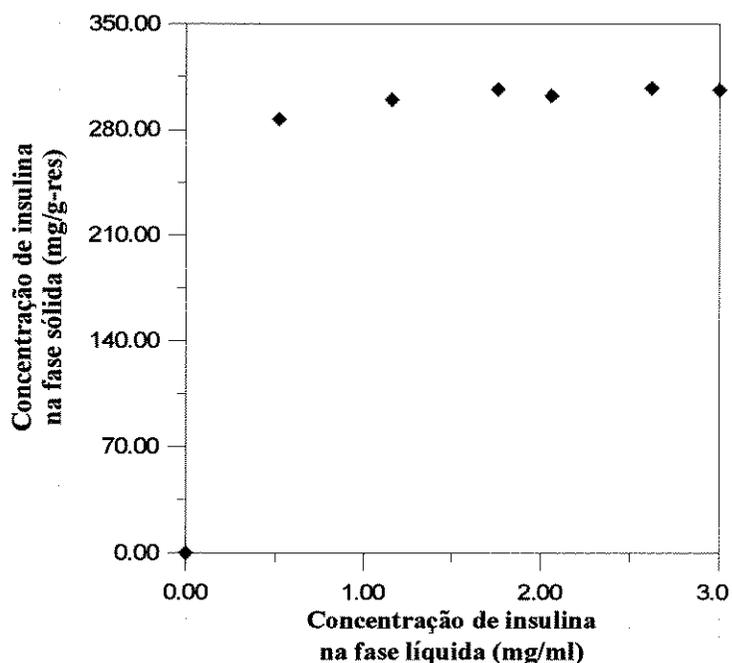


Figura 4.11 - Isoterma de adsorção: operação em leito fixo (altura 3,7 cm).

4.2.3 - Comparação das Isoterma de Adsorção Obtidas pelos Diferentes Métodos Utilizados

A isoterma de adsorção a 24 °C obtida pelos métodos acima descritos está mostrada na Figura 4.12. São mostrados nesta figura também alguns resultados experimentais obtidos por Santana e Miranda (1994) em batelada, utilizando tubos eppendorf com 20 mg de resinas com tempos de adsorção de cerca de 36 horas. É importante observar a concordância entre os diversos métodos e também o comportamento da isoterma, que segue um ajuste do tipo Langmuir, descrito no Capítulo 2.

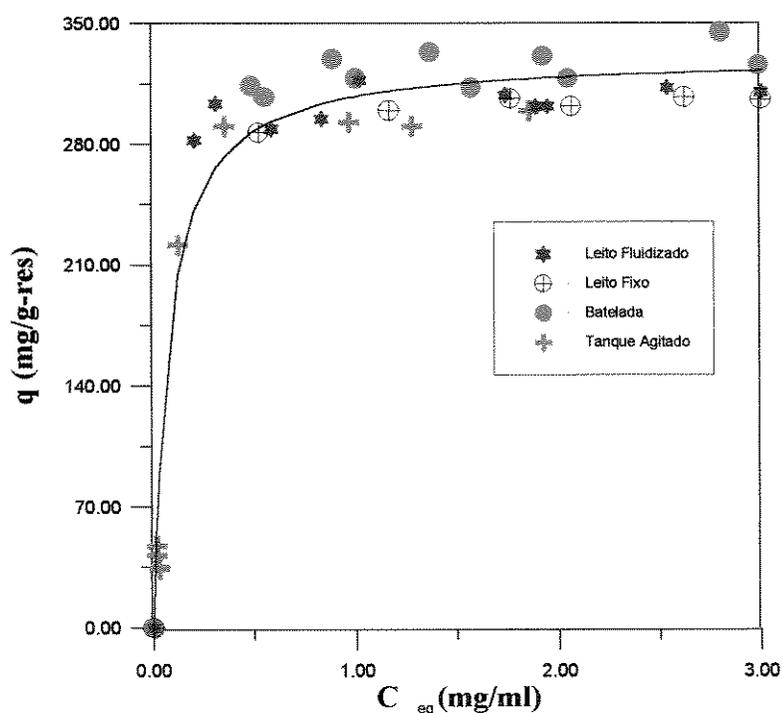


Figura 4.12 - Isoterma de adsorção a 24 °C para a insulina na resina Accel Plus QMA.

Os valores de q_m e K_d obtidos a partir o conjunto de resultados experimentais são respectivamente 330.8 mg/g-res e 0.0748mg/ml, com um coeficiente de determinação de 0.954.

4.2.4 - Eluição da Insulina Adsorvida no Leito

A utilização de resinas trocadoras de íons para a concentração e purificação de proteínas baseia-se no princípio da reversibilidade das atrações eletrostáticas de uma molécula carregada em relação a uma matriz sólida com grupos com carga oposta e ligados covalentemente à matriz. As proteínas podem então ser eluídas por alteração do pH ou aumento da concentração salina do tampão utilizado na eluição (vide Figura 4.13)

O esquema experimental da adsorção, lavagem e eluição da proteína está indicado na Figura 4.14.

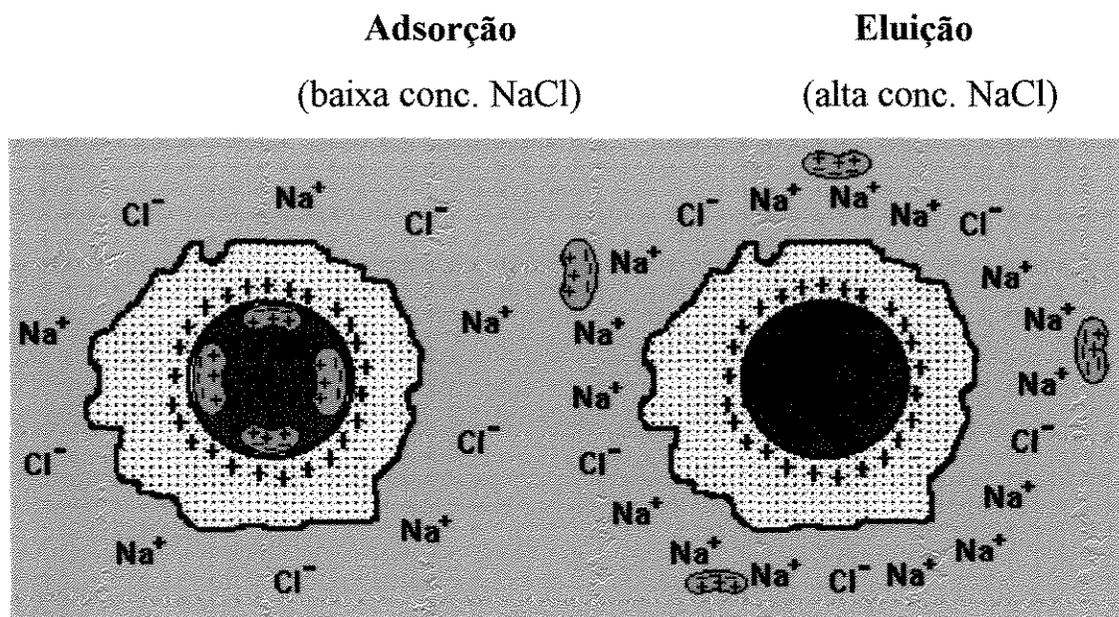


Figura 4.13 - Adsorção e eluição de proteínas em resinas trocadoras de íons.

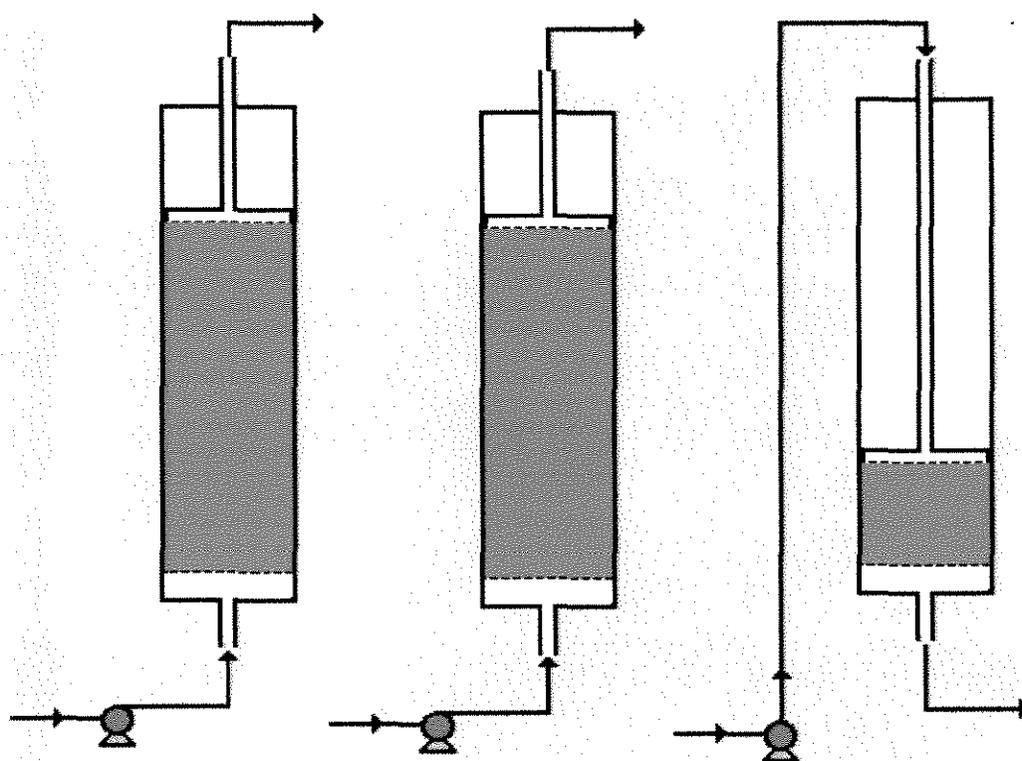


Figura 4.14 - Esquema experimental para a adsorção, lavagem e eluição da insulina, respectivamente.

Antes da realização dos experimentos de eluição propriamente ditos, foi feito um estudo da variação da concentração do eluído com o aumento da concentração de NaCl na solução tampão padrão (TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0). A Figura 4.15 indica a eluição de insulina de 6,8 gramas de resina Accel Plus QMA carregada em leito expandido. A vazão para a adsorção foi de 2 ml/min e na lavagem e eluição foi de 5 ml/min.

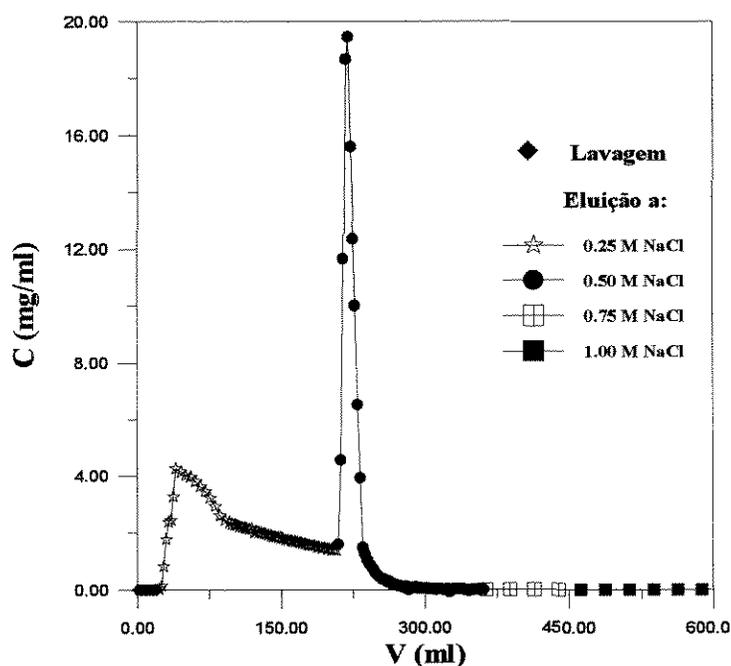


Figura 4.15 - Eluição da insulina adsorvida na resina Accel Plus QMA com solução tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0 e NaCl a várias concentrações.

Como o limite da curva de calibração dada no Capítulo 3 é em torno de 3 mg/ml de insulina, foi necessário coletar aliquotas do eluido para quantificar suas concentrações e utilizar a técnica da diluição para medir a absorbância. Foi verificado que o aumento da concentração deste sal não afetava a absorbância, logo não foi necessário uma nova curva de calibração para esse tampão com NaCl.

Como se pode observar na Figura 4.15, o aumento da concentração de NaCl provoca um maior enriquecimento das alíquotas e os picos torna-se mais abruptos (concentração máxima maior). Assim, para a concentração de NaCl 0,5 M, o volume de eluido é bem menor que para a concentração de 0,25 M. A figura indica que para a concentração de NaCl 0,25 M seria necessário passar através do leito uma grande quantidade de eluente para desorver toda a insulina, e assim ter-se-ia uma solução bem diluída.

Como a resina é estável a elevadas concentrações de NaCl e por ser este um reagente de baixo valor quando comparado com o produto que se deseja e também porque em concentrações de NaCl acima de 0,5 M toda a insulina é dessorvida, utilizou-se o tampão padrão com uma concentração de 1,0 M de NaCl como solução eluente.

A Figura 4.16-(a) mostra uma curva de ruptura para leite expandido e a Figura 4.16-(b) mostra a respectiva curva de lavagem e eluição de insulina de 3,0 gramas de resina. Nesta figura é demonstrado que a partir de 0,825 mg/ml é possível com a sequência de operações mostrados na Figura 4.15, obter-se uma aliqota com 1,0 ml com concentração de 45,82 mg/ml, o que corresponde a um enriquecimento de 56 vezes aproximadamente ($45.82/0,825 = 55.97$ vezes). É possível ainda, coletando-se 20 ml iniciais do eluído, obter uma solução de insulina a 32,67 ml, o que fornece um enriquecimento global de cerca de 40 vezes. Coletando-se os 25 ml iniciais de eluídos, ter-se-á uma solução a 26,52 mg/ml.

A quantidade de insulina dessorvida pode ser calculada fazendo-se uma integração numérica da área abaixo da curva de eluição. Foram adsorvidos 294,97 mg por grama de resina (calculado de acordo com a Equação 4.1) e foram dessorvidos 235,51 mg de insulina por grama de resina. Isto corresponde a uma recuperação de 80% da insulina inicialmente em solução. A perda de 20% de insulina se deve principalmente ao arraste, na lavagem, das moléculas presentes no leite que estavam fracamente adsorvidas em policamadas ou adsorvidas por interação proteína-proteína.

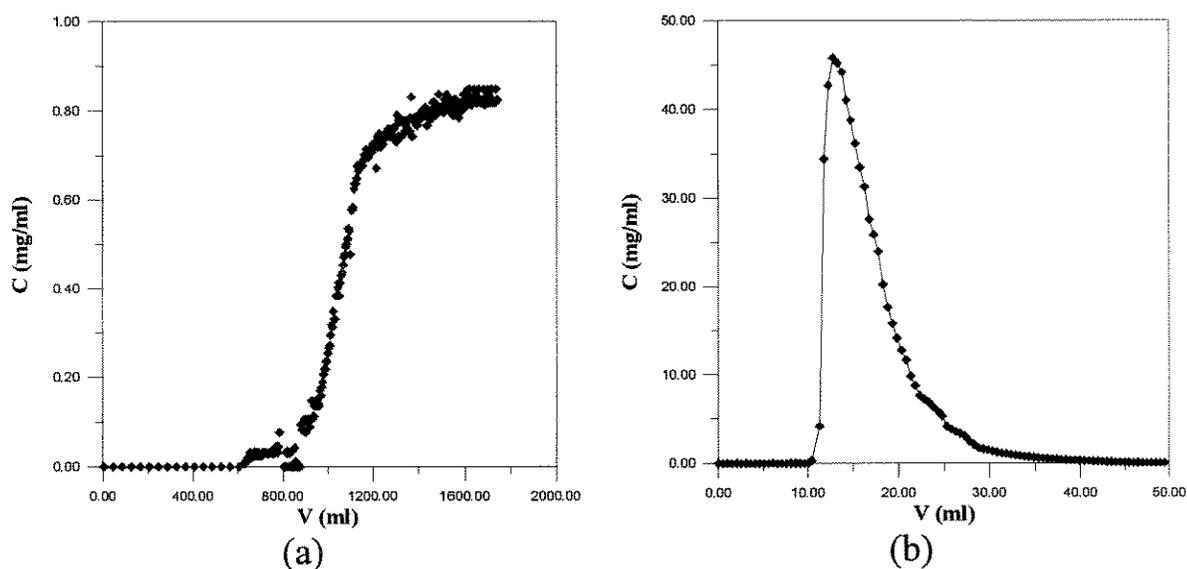


Figura 4.16 - (a) Curva de ruptura para adsorção de solução de concentração 0,825 mg/ml. (b) Curva de lavagem e eluição da insulina com tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0, com obtenção de uma solução concentrada de 45,82 mg/ml.

Na Figura 4.17 (a) e (b) são mostradas a curva de ruptura do leito expandido carregado com uma solução de 0,202 mg/ml e a curva de eluição com uma concentração máxima obtida de 27,16 mg/ml, o que corresponde a um enriquecimento de 135 vezes aproximadamente. Coletando-se os 60 ml iniciais de eluído, ter-se-á uma solução a 5,04 mg/ml, correspondendo a um enriquecimento da ordem de 25 vezes. A massa de proteína adsorvida na resina foi de 282,5 mg/g-res enquanto que a massa eluída foi de 251,95 mg/g-res, correspondendo a uma recuperação de 89%.

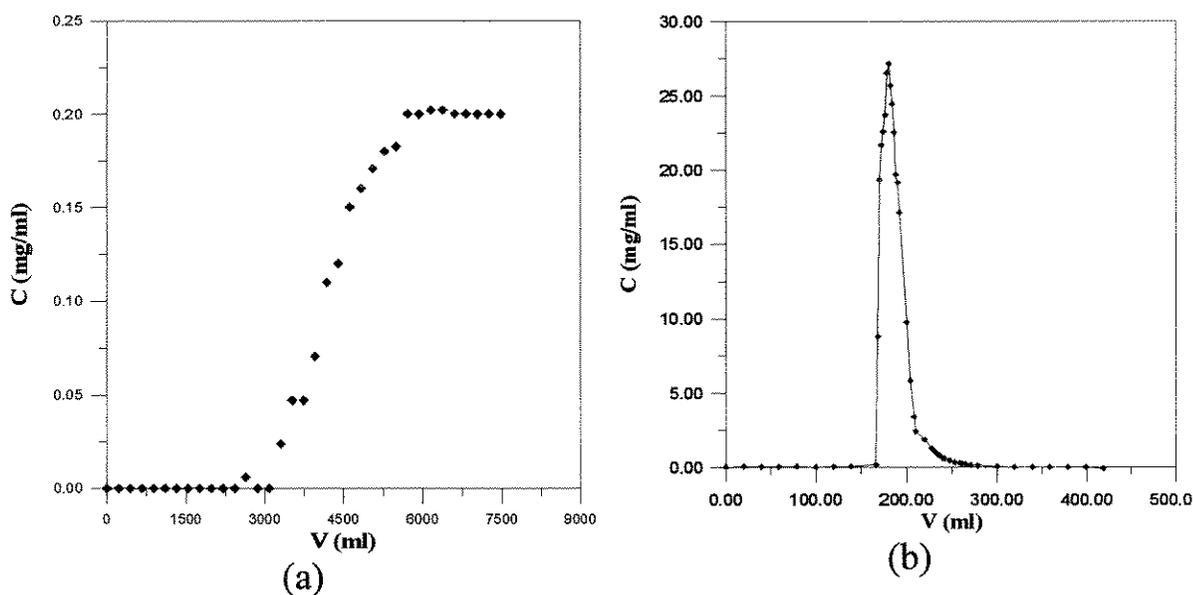


Figura 4.17 - (a) Curva de ruptura para adsorção de solução de concentração 0.202 mg/ml. (b) Curva de lavagem e eluição da insulina com obtenção de uma solução concentrada de 27.16 mg/ml.

Pode-se notar pelas Figuras 4.16 e 4.17 que, quanto mais diluída for a solução inicial maior será o enriquecimento e a recuperação.

CAPÍTULO 5

5 - MODELAGEM MATEMÁTICA

Os processos cromatográficos de adsorção têm sido largamente utilizados para a análise e purificação de proteínas de custos elevados há muitos anos, pelas indústrias biotecnológicas e farmacêuticas. Para a adsorção ocorrer, a molécula de proteína tem que se deslocar da fase líquida externa até o sítio ativo, que geralmente encontra-se no interior dos poros da fase sólida. Portanto, os processos de adsorção envolvendo macromoléculas, na maioria dos casos proteínas, são geralmente controlados pela resistência à transferência de massa, que inclui a resistência difusiva no filme externo, a resistência difusiva na superfície e nos poros e a resistência no sítio ativo. Muitos modelos podem ser encontrados na literatura com vários graus de complexidade. Entretanto, a dificuldade encontrada na determinação dos parâmetros do modelo utilizando técnicas experimentais limita a utilização de um modelo ou de outro (Hashim et al., 1996).

5.1 - Formulação Matemática da Cinética em Tanques Agitados

5.1.1 - Modelo Cinético Simplificado

Um modelo cinético simplificado pode ser obtido considerando-se que a macromolécula protéica é relativamente maior que o diâmetro dos poros do adsorvente sólido e que a reação de adsorção na resina trocadora de íon seja homogênea, monovalente, de acordo com a reação elementar dada pela Equação (5.1) (Hashim et al., 1996).



onde P representa a molécula de proteína, A representa o sítio de adsorção da resina trocadora de íons, P••A é o complexo proteína-sólido e k_1 e k_2 são as constantes das taxas de adsorção e dessorção, respectivamente. A taxa de adsorção de proteína é dado por:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 C(q_m - q) - k_2 q \quad (5.2)$$

onde q_m é a máxima capacidade de adsorção da resina. No equilíbrio ($dq/dt=0$), a equação anterior torna-se a familiar Isoterma de Langmuir.

$$q = \frac{q_m C}{K_d + C} \quad (5.3)$$

onde a constante de dissociação é $K_d = \frac{k_2}{k_1}$. Substituindo na Equação (5.2), temos:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 C (q_m - q) - k_1 K_d q \quad (5.4)$$

Para um tanque no qual em um tempo zero são adicionadas partículas de resinas trocadoras de íons (livre de proteínas) sobre uma solução de proteína com concentração C_0 , o balanço material de proteína na fase líquida é dado pela Equação (5.5).

$$V \frac{dC}{dt} = v \frac{dq}{dt} \quad (5.5)$$

Onde V é o volume do tanque, v é volume de adsorvente utilizado e C é a concentração de proteína na fase líquida no tempo t .

Para a adsorção em tanques, as Equações (5.4) e (5.5) formam a base de um modelo simplificado da taxa de adsorção. A solução analítica dessas equações é dada pela Equação (5.6).

$$C = C_o + \frac{v}{V} \frac{(b+a) \left(1 - \exp \left[-\frac{2av}{V} k_1 t \right] \right)}{\left(\frac{b+a}{b-a} \right) - \exp \left[-\frac{2av}{V} k_1 t \right]} \quad (5.6)$$

Onde:

$$a^2 = b^2 - \frac{C_o V}{v} q_m \quad (5.7)$$

$$b = \frac{1}{2} \left(\frac{C_o V}{v} + q_m + \frac{K_d V}{v} \right) \quad (5.8)$$

Quando os valores de q_m e K_d são conhecidos, é possível calcular o parâmetro k_1 através do ajuste do modelo (Equação 5.6) aos dados cinéticos experimentais, utilizando-se regressão não linear. Utilizou-se o programa computacional multivariável Box, o qual busca a variável de forma a minimizar a soma dos quadrados dos desvios (Box, 1995). A constante k_2 pode ser calculada a partir da constante de dissociação.

Nas Figuras 5.1 à 5.8, são apresentadas as curvas cinéticas experimentais e a calculada por este modelo. O sistema utilizado foi a resina Accel Plus QMA/Insulina em tampão TRIS/HCL 0,05 mol/L, pH 8,0.

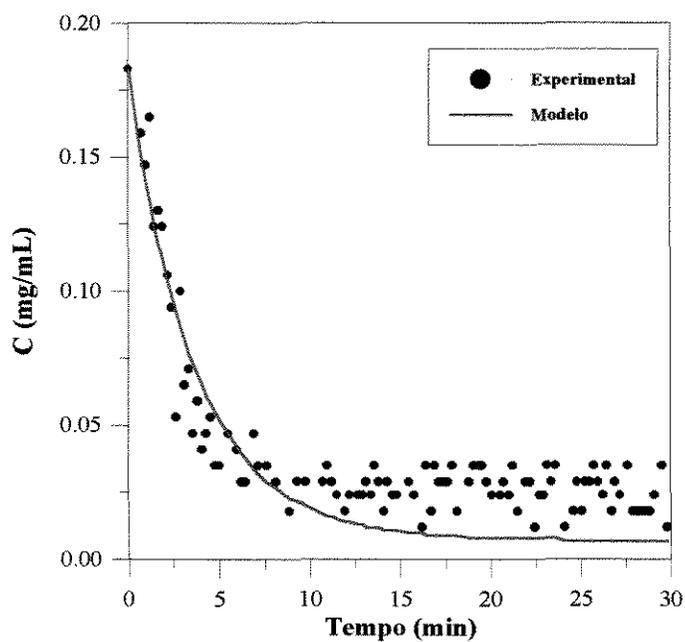


Figura 5.1- Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0,183$ mg/mL.

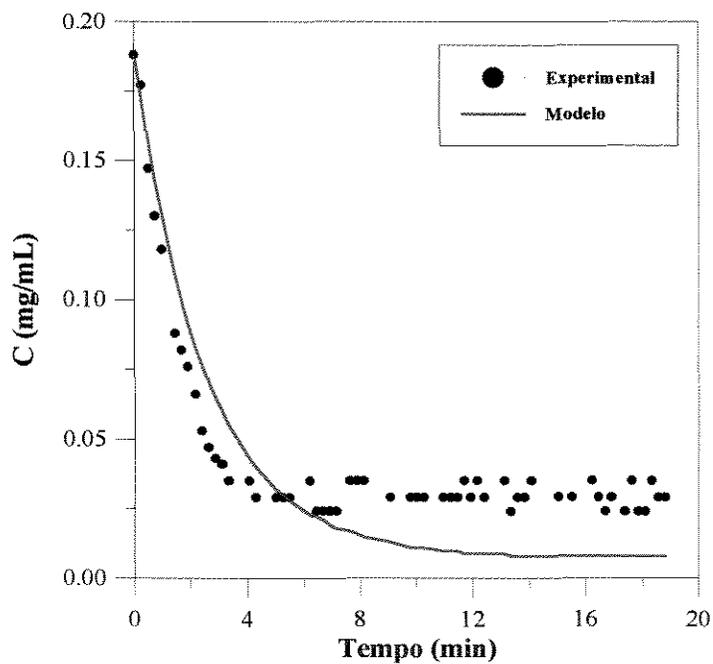


Figura 5.2 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0,188$ mg/mL.

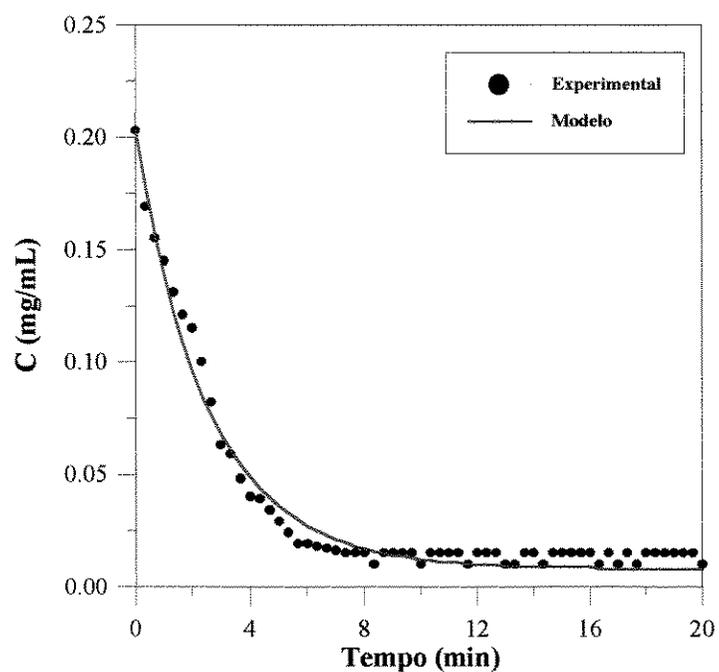


Figura 5.3 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0,203 \text{ mg/mL}$.

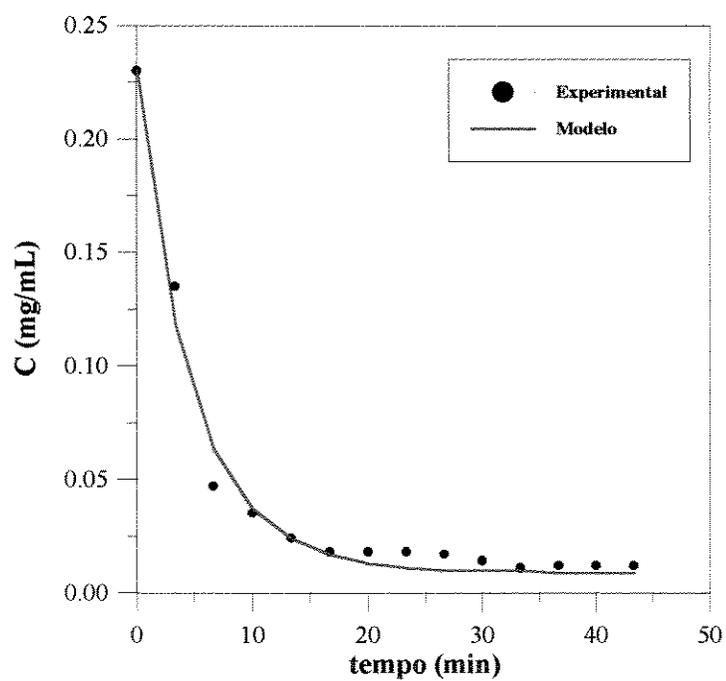


Figura 5.4 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0,230 \text{ mg/mL}$.

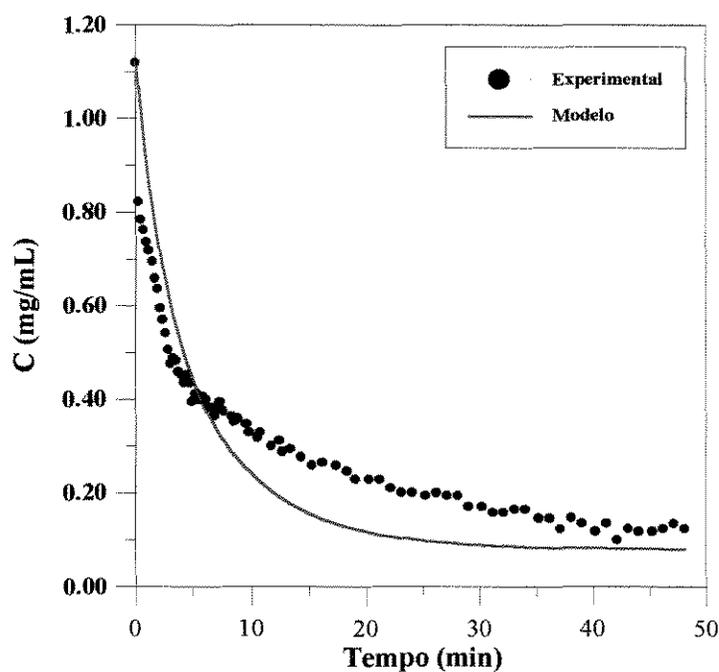


Figura 5.5 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 1,12$ mg/mL.

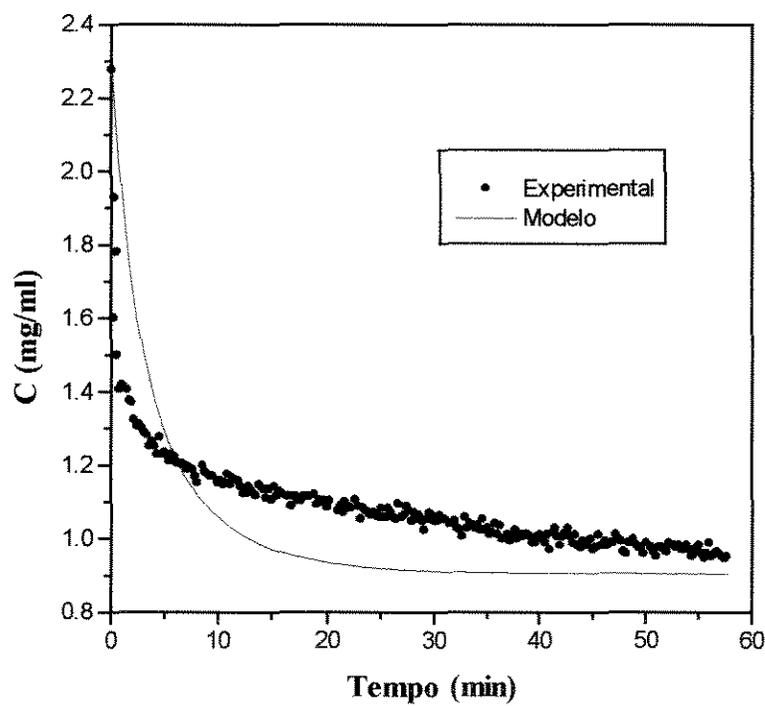


Figura 5.6 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 2,28$ mg/mL.

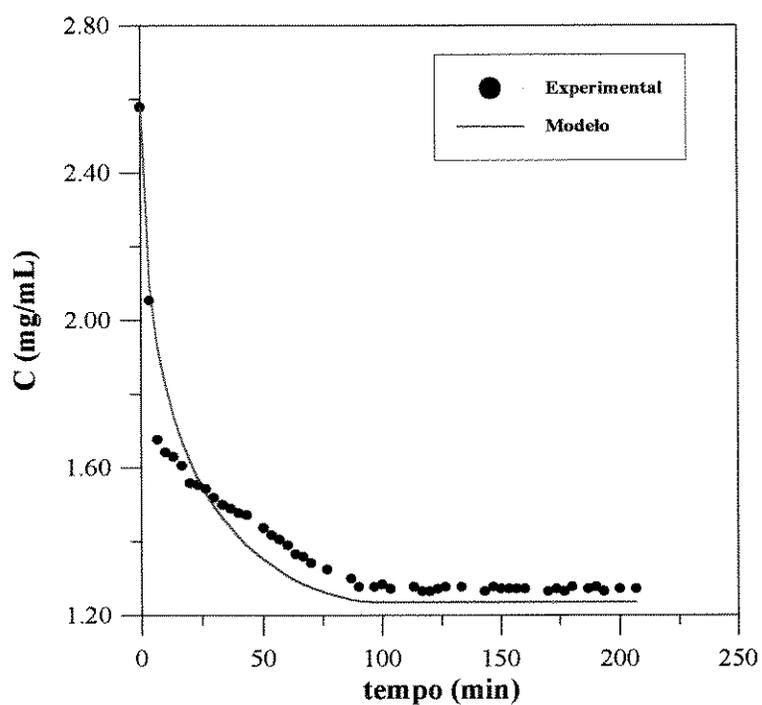


Figura 5.7 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 2,58$ mg/mL.

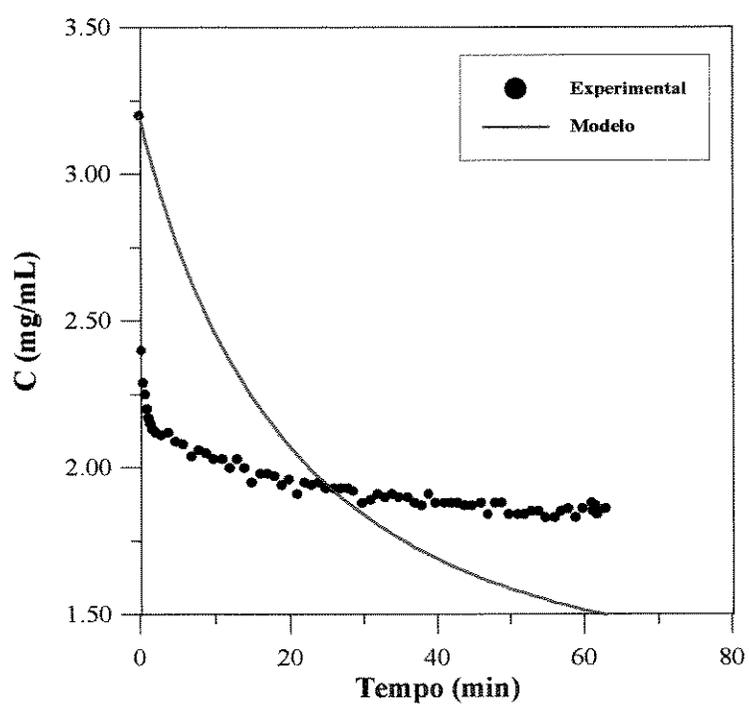


Figura 5.8 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 3,211$ mg/mL.

Na Tabela 5.1 são mostrados os valores de k_1 e k_2 calculados a partir do modelo ajustado aos dados experimentais.

Tabela 5.1 - Valores dos coeficientes de adsorção (k_1) e dessorção (k_2) calculados a partir do modelo (Equação 5.6).

C_0 (mg/mL)	k_1 (mL/mg min)	k_2 (min^{-1})	Figura
0,183	0,13630	0,01020	(5.1)
0,188	0,19989	0,01496	(5.2)
0,203	0,19627	0,01467	(5.3)
0,230	0,10502	0,00786	(5.4)
1,120	0,12020	0,00899	(5.5)
2,280	0,02937	0,00220	(5.6)
2,580	0,02855	0,00214	(5.7)
3,211	0,01675	0,00125	(5.8)

Pode-se observar pelas figuras que o modelo se ajustou melhor aos dados experimentais para baixas concentrações de insulina. Para concentrações mais elevadas, o ajuste foi relativamente ruim, chegando a ser péssimo na Figura 5.8.

5.1.2 - Modelo Cinético Completo

A otimização e “Scale-up” dos processos de cromatografia de afinidade requerem um maior conhecimento dos parâmetros de equilíbrio e de transferência de massa. A análise da adsorção é dificultada em tais

sistemas devido o equilíbrio ser descrito por isothermas não lineares e as resinas utilizadas serem normalmente porosas.

As modelagens matemáticas da cinética de adsorção de proteínas utilizando adsorventes de afinidade têm sido desenvolvidas incluindo os efeitos da transferência de massa no filme externo, a difusão nos poros e uma expressão para a taxa de reação na superfície. Como se assume que a adsorção no adsorvente é reversível, a lavagem do adsorvente para recuperação do adsorbato também pode ser modelada. As seguintes hipóteses são feitas:

- O adsorvente é feito de um material poroso onde o soluto deve se difundir de uma maneira descrita pela difusividade efetiva (D_{ef}). Assume-se que esta difusividade é independente da concentração.
- A transferência de massa na superfície do adsorvente é governada pelo modelo de película, que é caracterizado pelo coeficiente de transferência de massa (k_f).
- A reação na superfície entre o adsorbato e um sítio de adsorção do adsorvente é descrita por uma reação reversível de segunda ordem. O comportamento da isoterma de equilíbrio pode ser representado pela Equação de Langmuir.
- As partículas do adsorvente são esféricas, com tamanho e densidade uniformes (Horstmann e Chase, 1989).

Uma descrição detalhada dos processos de adsorção e eluição de proteínas (em resinas trocadoras de íons) em função do tempo, foi realizada por Carrère (1993). A Figura 5.9 descreve os principais fenômenos de transferência de massa envolvidos nos processos de adsorção e eluição (Carrère, 1993). Utilizando um modelo análogo ao de Horstmann e Chase (1989) para o estudo da adsorção de proteínas em resinas trocadoras de íons, chegou-se as equações correspondentes ao balanço de massa nas duas fases, escritas para uma situação em que a concentração no interior das partículas eram dependente da posição radial e do tempo.

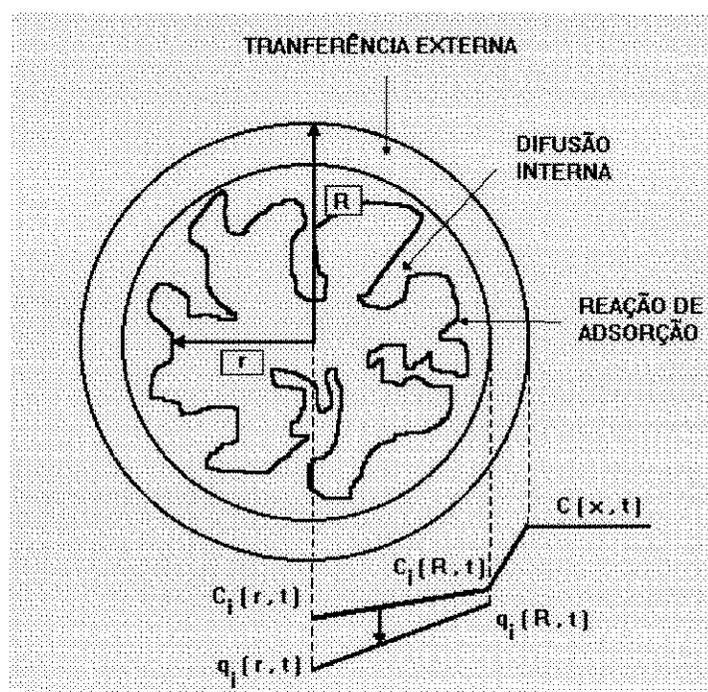


Figura 5.9 - Fenômenos de transferência de massa envolvidos na adsorção e eluição (figura adaptada de Carrère, 1993).

O balanço de massa no interior da partícula sólida (descrição da difusão da proteína através dos poros) é representado por:

$$\frac{\partial q_i(r,t)}{\partial t} + \varepsilon_p \frac{\partial C_i(r,t)}{\partial t} = \varepsilon_p D_{ef} \left[\frac{\partial^2 C_i(r,t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i(r,t)}{\partial r} \right] \quad (5.9)$$

onde $C_i(r,t)$ é a concentração do soluto internamente à partícula; $q_i(r,t)$ é a quantidade de soluto adsorvido por massa de adsorvente; ε_p é a porosidade da partícula adsorvente; D_{ef} é o coeficiente de difusão efetivo do soluto no interior das partículas de adsorventes; r é a variável espacial e t é a variável temporal (Carrère, 1993).

A condição inicial é:

$$t = 0 \quad C_i = 0 \quad (5.10)$$

e as de contorno na partícula de adsorvente são:

-no centro da partícula

$$r = 0 \quad \frac{\partial C_i}{\partial r} = 0 \quad (5.11)$$

-na superfície da partícula, temos:

$$r=R \quad \frac{\partial C_i}{\partial r} = \frac{K_f}{\varepsilon_p D_{ef}} (C_b - C_i) \quad (5.12)$$

onde K_f é o coeficiente convectivo de transferência de massa externo à partícula.

A condição de contorno na superfície da partícula (Equação 5.12) mostra que a transferência de massa através do filme líquido está

relacionada com a concentração global da proteína na fase líquida (C_b) e com a concentração de proteína internamente à partícula (C_i).

A cinética de adsorção pode ser escrita na forma:

$$\frac{\partial q_i(r,t)}{\partial t} = k_1 C_i(r,t) [q_m - q_i(r,t)] - k_2 q_i(r,t) \quad (5.13)$$

A partir da equação anterior, considerando que a taxa de adsorção é suficientemente rápida na superfície (equilíbrio rápido),

$$\frac{\partial q_i(r,t)}{\partial t} = 0 \quad (5.14)$$

obtemos a relação de equilíbrio representada pela expressão da isoterma de Langmuir, ou seja:

$$q_i = \frac{q_m C_i}{K_d + C_i} \quad (5.15)$$

Expressando $\partial q_i / \partial t$ na forma:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \frac{dq_i}{dC_i} \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad (5.16)$$

Onde:

$$\frac{dq_i}{dC_i} = \frac{q_m K_d}{(k_d + C_i)^2} \quad (5.17)$$

Tem-se:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \frac{q_m K_d}{(K_d + C_i)^2} \left(\frac{\partial C_i}{\partial t} \right) \quad (5.18)$$

Substituindo -se a Equação (5.18) na Equação (5.9), tem-se:

$$\left[\varepsilon_p + \frac{q_m K_d}{(K_d + C_i)^2} \right] \frac{\partial C_i}{\partial t} = \varepsilon_p D_{ef} \left[\frac{\partial^2 C_i(r, t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i(r, t)}{\partial r} \right] \quad (5.19)$$

Adimensionalizando-se a equação anterior com

$$x = \frac{r}{R} \quad \text{e} \quad \tau = \frac{t D_{ef}}{R^2} \quad (5.20)$$

onde R é o raio médio das partículas, tem-se:

$$\left[1 + \frac{1}{\varepsilon_p} \frac{q_m K_d}{(K_d + C_i)^2} \right] \frac{\partial C_i}{\partial \tau} = \left[\frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} + \frac{2}{x} \frac{\partial C_i}{\partial x} \right] \quad (5.21)$$

As condição inicial e de contorno adimensionalizadas são:

$$\tau = 0 \quad C_i = 0 \quad (5.22)$$

$$x = 0 \quad \frac{\partial C_i}{\partial x} = 0 \quad (5.23)$$

$$x = 1 \quad \frac{\partial C_i}{\partial x} = Bi_m (C_b - C_i) \quad (5.24)$$

onde:

$$Bi_m = \frac{K_f R}{D_{ef}} \quad (5.25)$$

Fazendo-se um balanço de matéria em um tanque agitado, a taxa de transferência de massa na fase líquida é dada por (Horstmann e Chase, 1989):

$$\frac{dC_b}{dt} = -\frac{3 v K_f}{R V} (C_b - C_i) \Big|_{r=R} \quad (5.26)$$

onde v é o volume de adsorvente e V é o volume de líquido no tanque.

A condição inicial da Equação (5.26) é:

$$t = 0, \quad C_b = C_0 \quad (5.27)$$

Adimensionalizando-se as variáveis t e r , tem-se:

$$\frac{dC_b}{d\tau} = -\frac{3v}{V} Bi_m (C_b - C_i)|_{x=1} \quad (5.28)$$

E a nova condição inicial será:

$$\tau = 0, \quad C_b = C_0 \quad (5.29)$$

Resolvendo-se os modelos dado pelas Equações (5.21) e (5.28) é possível obter-se os coeficientes de transferência convectiva de massa no filme (K_f) e o coeficiente de transferência difusiva de massa intrapartícula (D_{ef}), utilizando os dados experimentais cinéticos e de equilíbrio.

Utilizando-se a técnica da colocação ortogonal, reduziu-se a Equação (5.21) (equação diferencial parcial) a um conjunto de equações diferenciais ordinárias (Yao e Tien, 1992). Esse sistema de equações, juntamente com a Equação (5.28), foram resolvidas simultaneamente, utilizando-se o método numérico de Runge-Kutta de quarta ordem. Foi também utilizado o programa computacional para a otimização não-linear multivariável (Box, 1995). Este programa minimiza a soma dos quadrados da diferença entre os valores calculados e experimentais de concentração, chegando-se aos melhores valores de K_f e D_{ef} , que é o objetivo desse estudo. Os valores de q_m e K_d utilizados na resolução do sistema de equações foram obtidos através da isoterma de adsorção apresentada no Capítulo 4. As Figuras 5.10 a 5.17 apresentam as curvas cinéticas experimentais e calculadas pelo modelo. O sistema utilizado foi a resina Accel Plus QMA/Insulina em tampão TRIS/HCL 0,05 mol/L, pH 8,0.

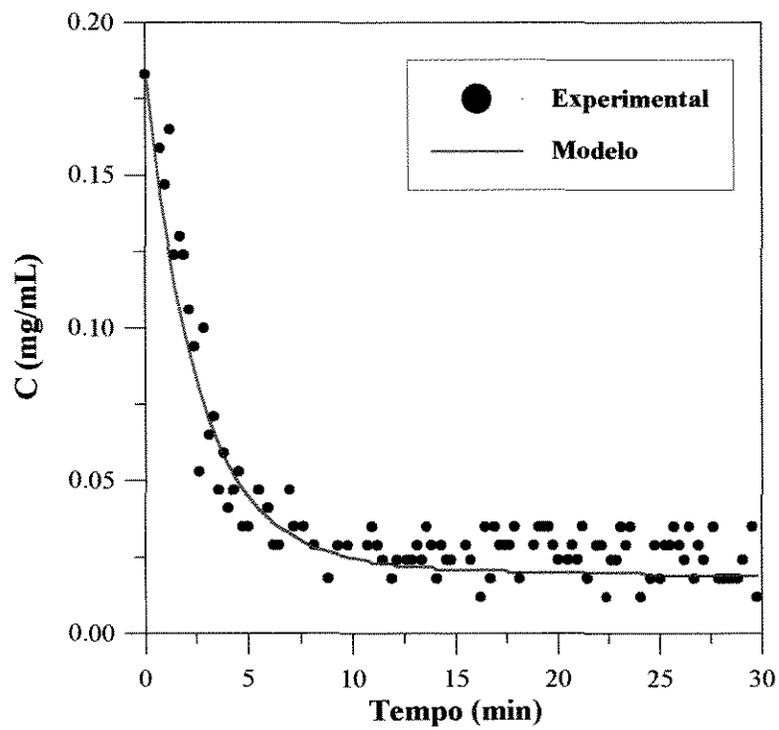


Figura 5.10 - Curva cinética experimental e calculada para $C_O = 0,183$ mg/mL.

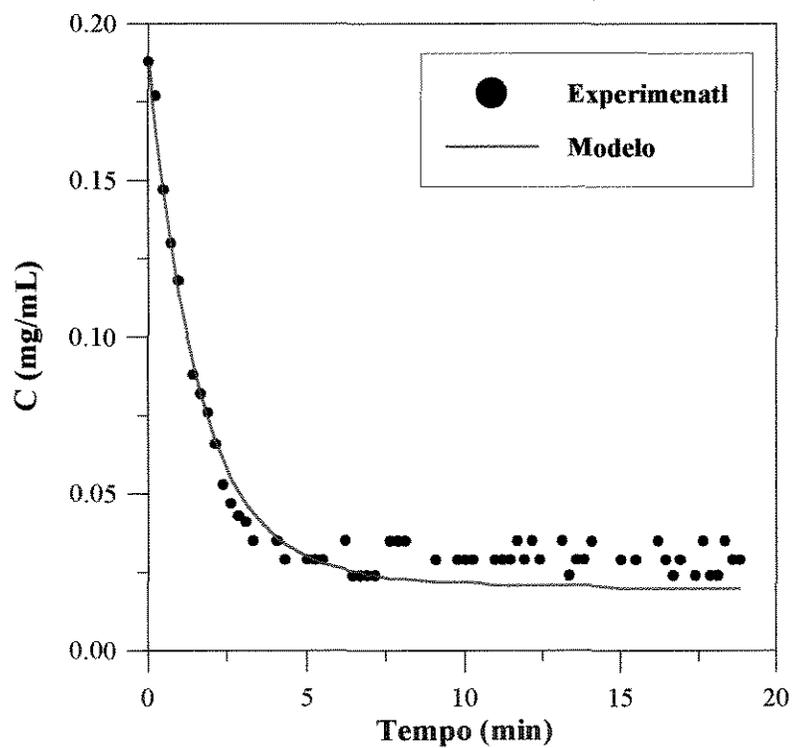


Figura 5.11 - Curva cinética experimental e calculada para $C_O = 0,188$ mg/mL.

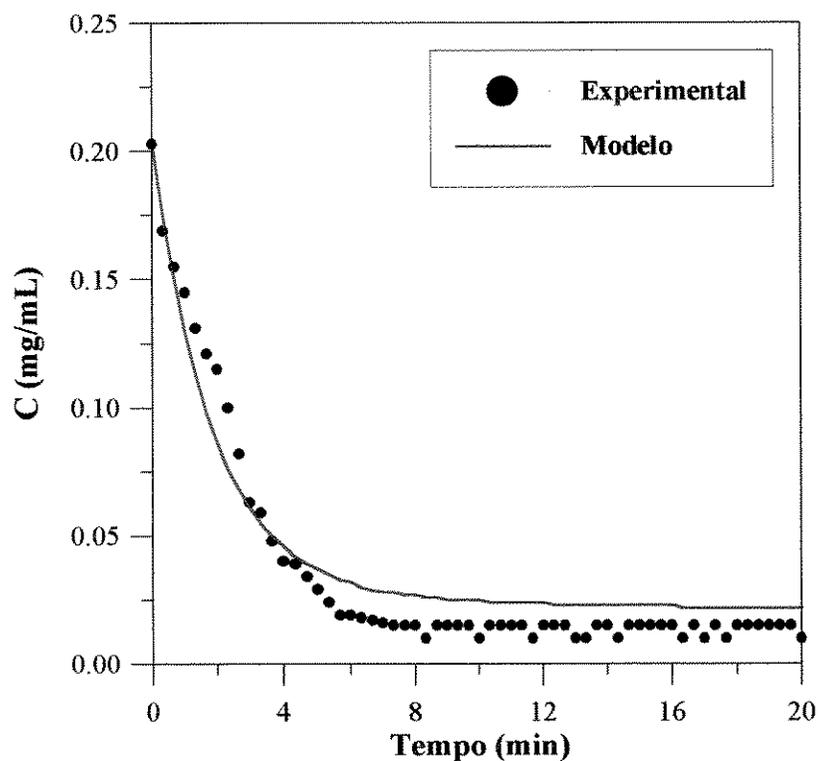


Figura 5.12 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0,203$ mg/mL .

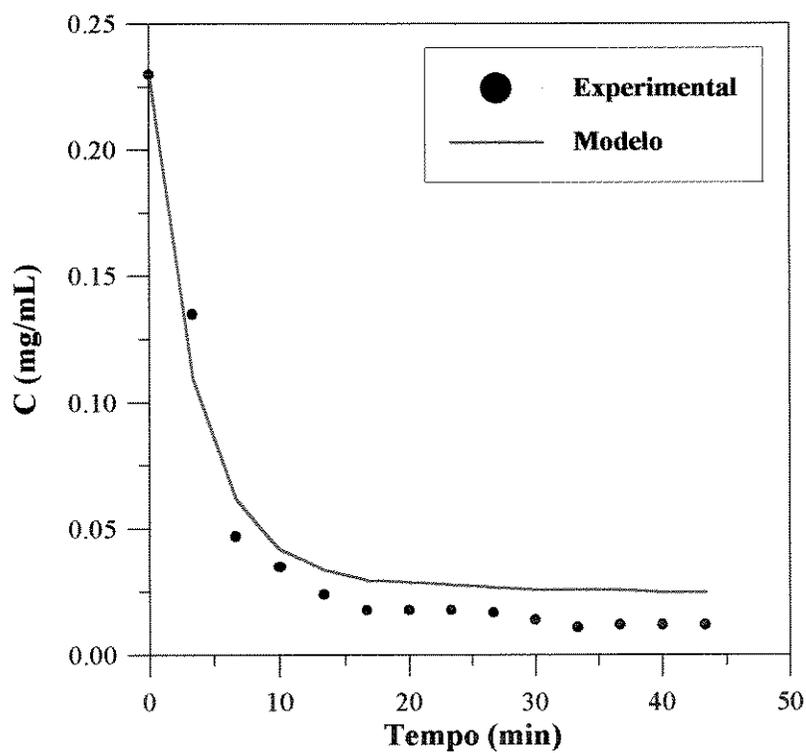


Figura 5.13 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 0,230$ mg/mL .

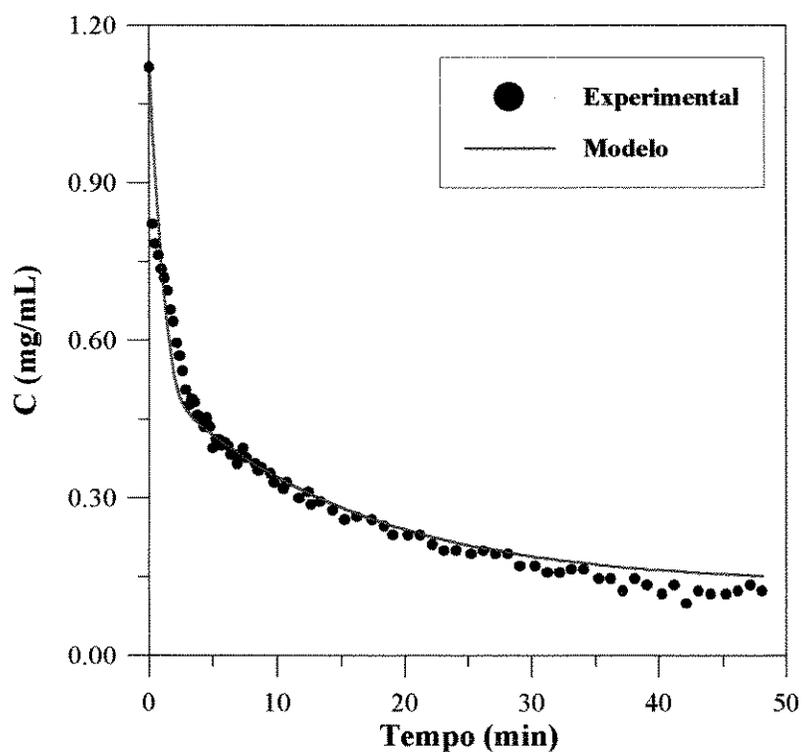


Figura 5.14 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 1,12$ mg/mL.

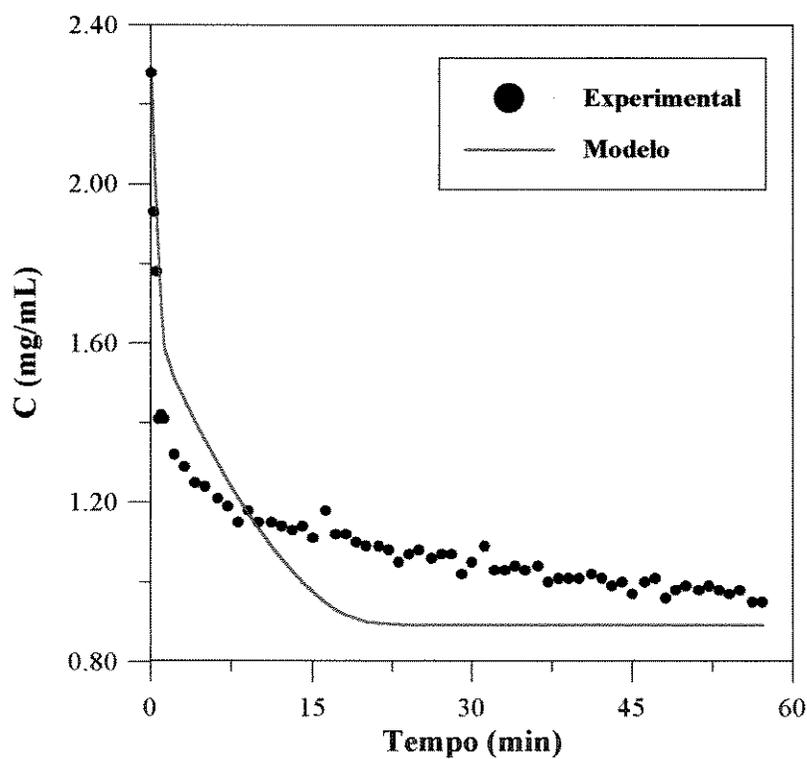


Figura 5.15 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 2,28$ mg/mL.

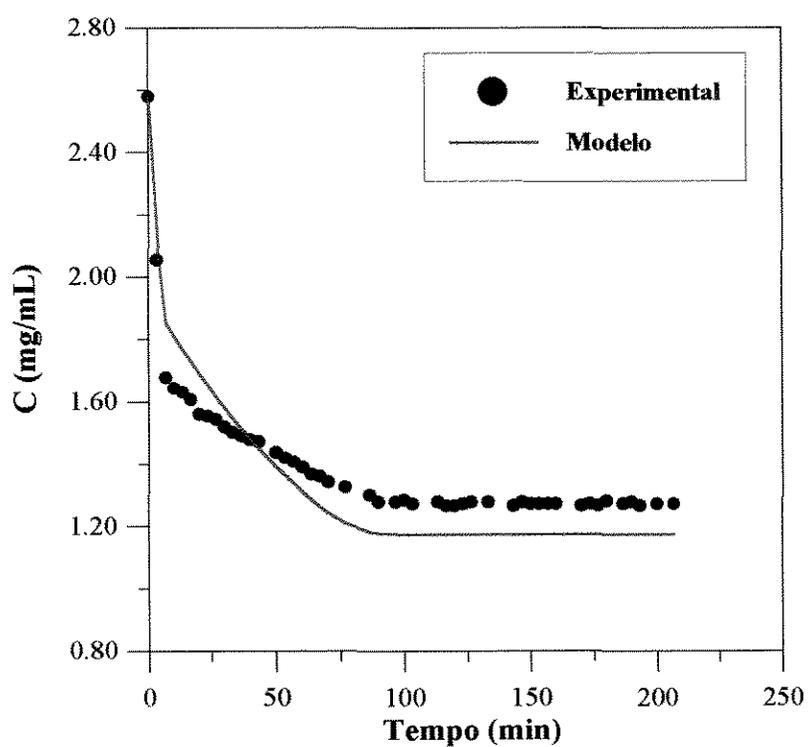


Figura 5.16 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 2,58$ mg/mL.

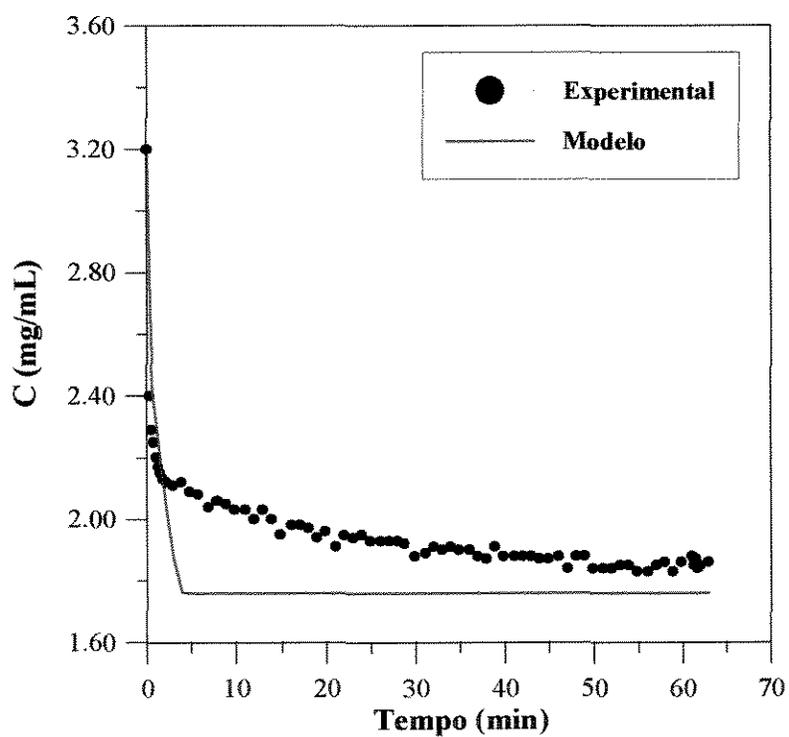


Figura 5.17 - Curva cinética experimental e calculada para $C_0 = 3,211$ mg/mL.

Na Tabela 5.2 estão mostrados os valores de Bi_m , D_{ef} e K_f calculados a partir do modelo ajustado aos dados experimentais.

Tabela 5.2 - Valores de Biot mássico (Bi_m), coeficiente de difusão intrapartícula (D_{ef}) e coeficiente convectivo de transferência de massa externo (k_f).

C_O (mg/mL)	Bi_m	D_{ef} (m^2/s) $\times 10^{-11}$	k_f (m/s) $\times 10^{-4}$
0,183	126,18	2,8542	1,5658
0,188	199,31	4,4082	3,8120
0,203	153,17	3,8513	2,5647
0,230	130,74	1,9690	1,1193
1,120	80,00	4,0681	1,4150
2,280	126,18	2,8542	1,5658
2,580	196,28	0,5100	0,4352
3,211	19,27	8,9188	0,7474

Como pode-se observar pelas figuras mostradas anteriormente, que os ajustes feitos utilizando o modelo simples e o mais completo, não apresentaram grande diferença (Vide Figura 5.3 e 5.12). Para concentrações mais elevadas nota-se que o ajuste pelo modelo completo foi melhor comparado com o modelo simplificado (Vide Figura 5.5 e 5.14).

5.2 - Formulação Matemática das Curvas de Ruptura em Leito Fixo

A equação da continuidade para uma coluna empacotada de um sistema de cromatografia de afinidade é frequentemente formulada como:

$$D_x \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - l \frac{\partial C}{\partial x} - \frac{\partial q}{\partial t} = \frac{\partial C}{\partial t} \quad (5.30)$$

Onde D_x é o coeficiente de dispersão axial, l é a velocidade linear, $\partial q/\partial t$ é a taxa de transferência de massa pela interface sólido-líquido, x é a distância ao longo da coluna e t é o tempo.

A literatura contém uma grande variedade de modelos de cromatografia de afinidade devido a grande variedade para expressão da taxa de transferência de massa. Muitas dessas expressões requerem um conhecimento de parâmetros associados com a natureza física do adsorvente que muitas vezes são dificilmente obtidos. A expressão adotada será a mesma adotada para a modelagem do tanque agitado (Equação 5.2). É assumido que a dispersão axial é negligenciável. A solução obtida para as Equações 5.2 e 5.30 é idêntica à obtida por Thomas (1964) o qual trabalhou com a adsorção de gases em resinas trocadoras de íons. A variação de C/C_0 medida na saída da coluna no tempo t , após os componentes não adsorvidos emergirem da coluna, é dado por (Chase, 1984):

$$\frac{C}{C_0} = \frac{J\left(\frac{n}{r}, nT\right)}{J\left(\frac{n}{r}, nT\right) + \left[1 - J\left(n, \frac{nT}{r}\right)\right] \cdot \exp\left[\left(1 - r^{-1}\right)(n - nT)\right]} \quad (5.31)$$

Onde:

$$r = 1 + \frac{C_0}{Kd} \quad (5.32)$$

$$n = q_m \cdot k_1 \cdot h \cdot \frac{A_c}{f} \quad (5.33)$$

$$T = \frac{f \cdot t \cdot (Kd + C_o)}{A_c \cdot q_m \cdot h} \quad (5.34)$$

Onde h é a altura do leito empacotado, A_c é a área da seção transversal da coluna e f é o fluxo volumétrico. A função $J(\alpha, \beta)$ de duas variáveis é dada por (Chase, 1984):

$$J(\alpha, \beta) = 1 - e^{-\alpha} \int_0^{\alpha} e^{-\xi} I_0(2\sqrt{\beta\xi}) d\xi \quad (5.35)$$

Onde I_0 é a função de Bessel de ordem zero. Os valores de k_1 foram determinados a partir da cinética de adsorção obtidas nos experimentos de tanques agitados.

As Figuras 5.18 a 5.23 mostram as curvas de ruptura para leito fixo e fluidizado ajustadas pelo modelo de Thomas.

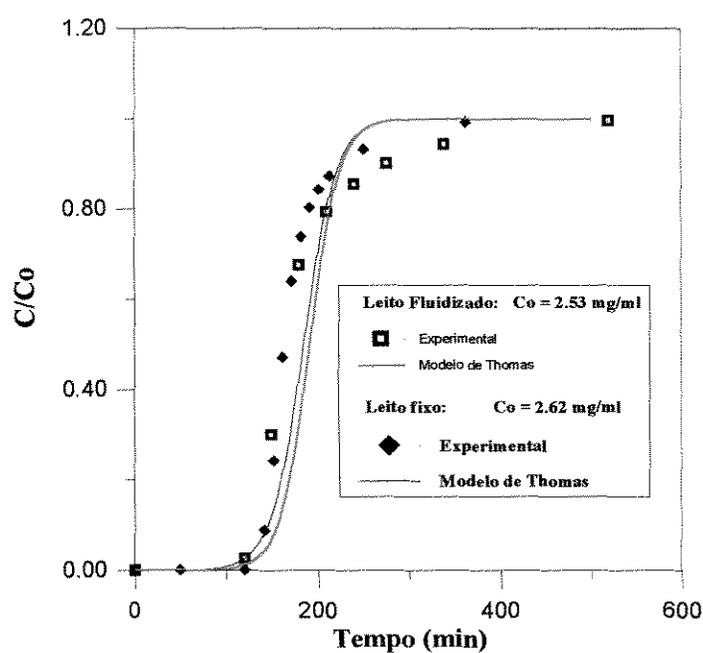


Figura 5.18 - Curvas de ruptura para leito fixo ($C_0 = 2,62 \text{ mg/ml}$) e fluidizado ($C_0 = 2,53 \text{ mg/ml}$) ajustadas pelo modelo de Thomas.

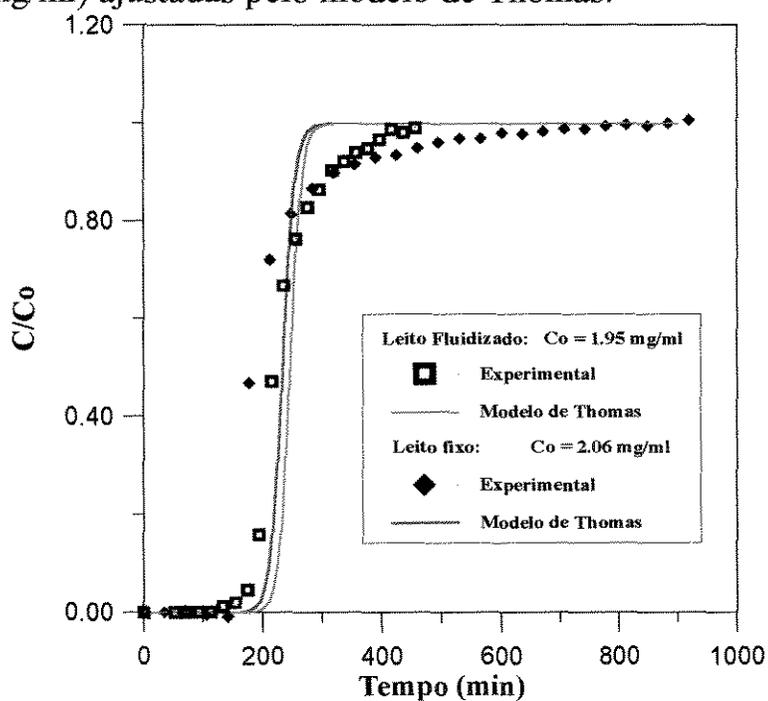


Figura 5.19 - Curvas de ruptura para leito fixo ($C_0 = 2,06 \text{ mg/ml}$) e fluidizado ($C_0 = 1,95 \text{ mg/ml}$) ajustadas pelo modelo de Thomas.

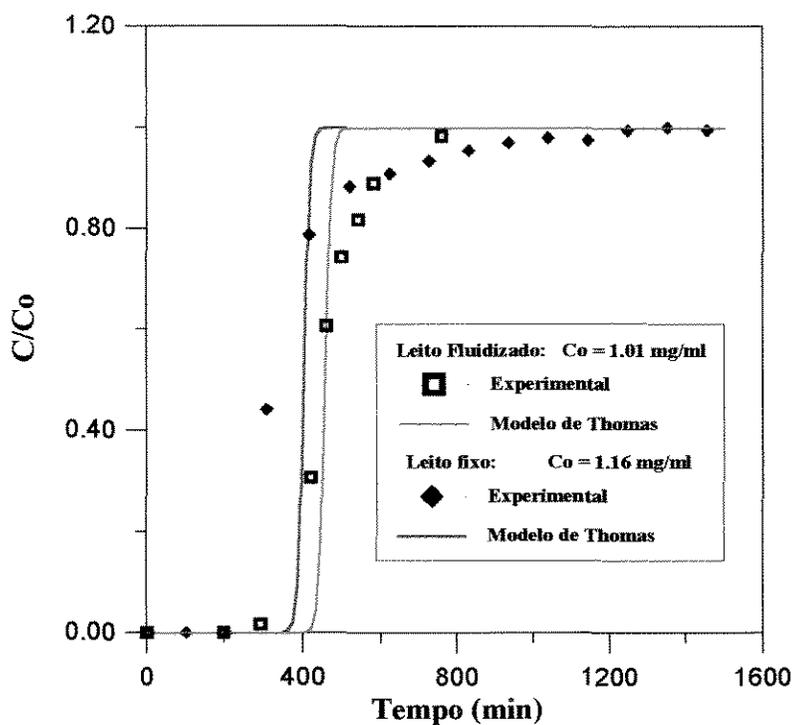


Figura 5.20 - Curvas de ruptura para leito fixo ($C_o = 1,16 \text{ mg/ml}$) e fluidizado ($C_o = 1,01 \text{ mg/ml}$) ajustadas pelo modelo de Thomas

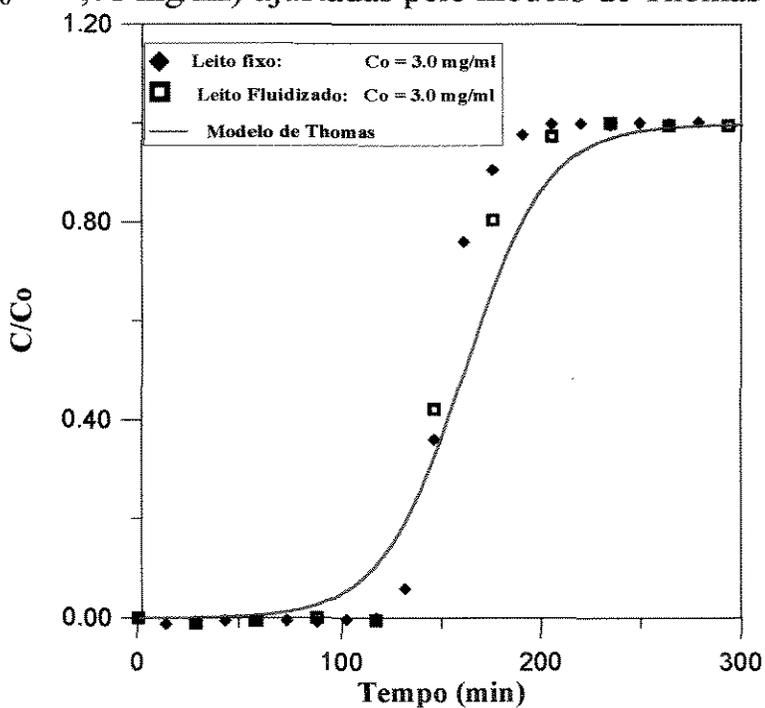


Figura 5.21 - Curvas de ruptura para leito fixo ($C_o = 3,0 \text{ mg/ml}$) e fluidizado ($C_o = 3,0 \text{ mg/ml}$) ajustadas pelo modelo de Thomas

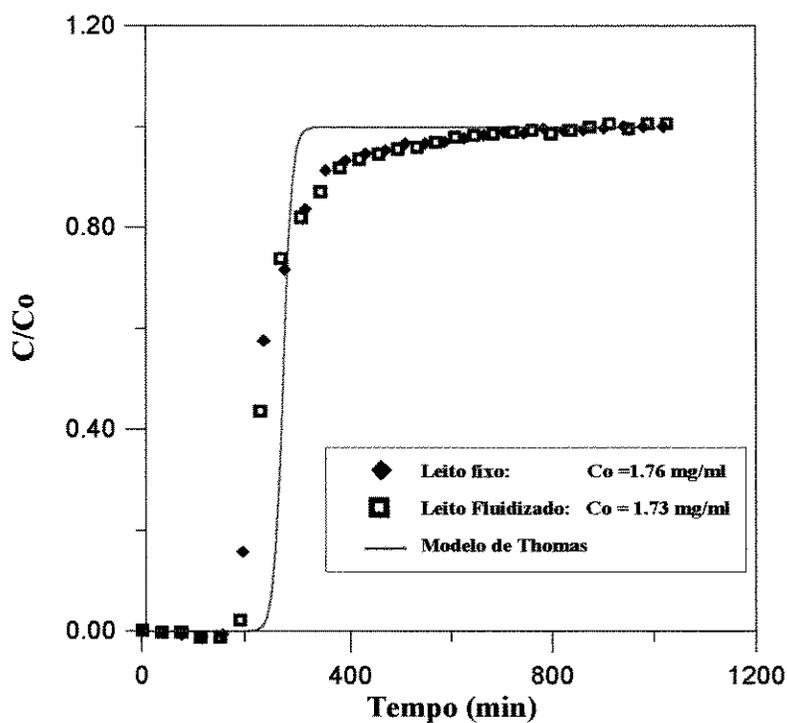


Figura 5.22 - Curvas de ruptura para leito fixo ($C_0 = 1,76$ mg/ml) e fluidizado ($C_0 = 1,73$ mg/ml) ajustadas pelo modelo de Thomas

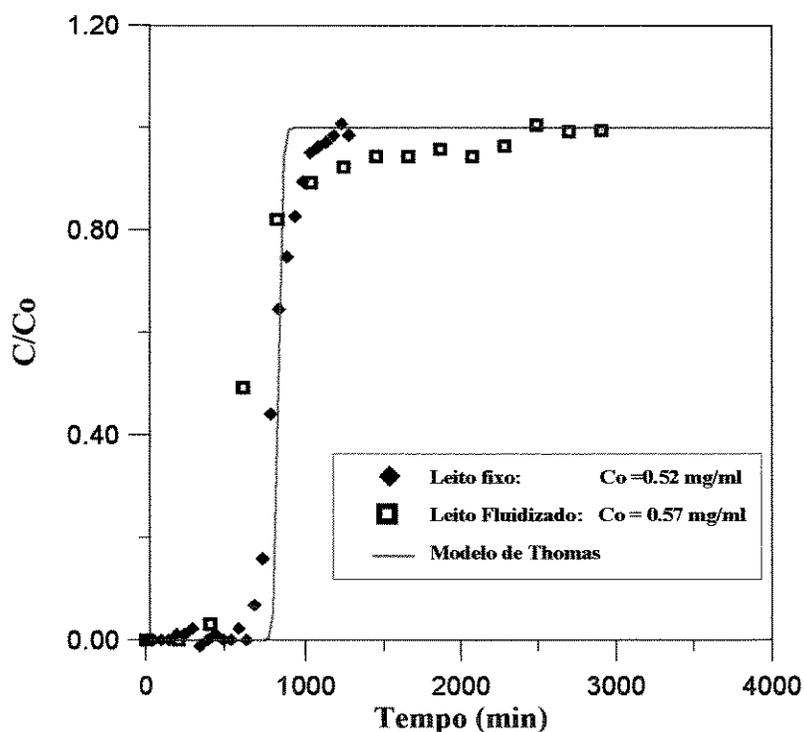


Figura 5.23 - Curvas de ruptura para leito fixo ($C_0 = 0,52$ mg/ml) e fluidizado ($C_0 = 0,57$ mg/ml) ajustadas pelo modelo de Thomas

Como pode ser verificado pelas figuras mostradas, o modelo de Thomas prevê o ponto de ruptura com um atraso de cerca de 10% em relação ao tempo, sendo a curva modelada mais abrupta (mais vertical) que a obtida experimentalmente. Apesar disto observa-se um bom ajuste deste modelo aos dados experimentais das curvas de ruptura em leito fixo e fluidizado.

Como pode ser observado pelas Figuras 5.21 e 5.22, o desempenho do leito fluidizado é similar ao do leito fixo em termos de capacidade de adsorção.

CAPÍTULO 6

6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 - Conclusões

Realizou-se um estudo da influência do pH do tampão TRIS/HCl 0,05 M na capacidade de adsorção da resina em estudo. Os experimentos foram realizados em tanques agitados. Verificou-se que a resina exibe um máximo de adsorção em torno do pH 8,0.

Os experimentos em tanques agitados mostraram uma grande afinidade da resina para com a proteína padrão utilizada, evidenciada pela rápida adsorção do sistema em estudo, sendo que esta começa atingir a capacidade máxima após 10 minutos de operação.

Foram determinados experimentalmente a isoterma e a cinética de adsorção da insulina nesta resina trocadora de íons, que exibiu uma capacidade máxima de adsorção da ordem de 300 mg de proteína por grama de resina.

Através do teste de expansão do leito, verificou-se uma boa estabilidade do leito utilizando-se uma vazão de solução de 2 ml/min, o que fornece uma expansão do leito em torno de 8.5 cm.

Nas curvas de ruptura em leito fixo e fluidizado, o ponto de ruptura é mais rapidamente atingido com o aumento da concentração de insulina.

As curvas de ruptura em leito fixo e fluidizado e as curvas de lavagem e eluição permitiram concentrar soluções de insulina com fator acima de 50 vezes a concentração inicial e com um rendimento acima de 80% na recuperação da proteína. Quanto mais diluída for a solução inicial de insulina maior será o enriquecimento e a recuperação.

O desempenho do leito fluidizado é similar ao do leito fixo em termos de capacidade de adsorção.

A modelagem matemática realizada permitiu obter parâmetros importantes para a ampliação de escala do processo.

6.2 - Sugestões para futuras pesquisas

Com o intuito de completar os estudos efetuados sobre adsorção da proteína insulina zíncica humana em resina trocadora de íons, são sugeridos os seguintes tópicos de pesquisa:

- 1) Realização de experimentos com o mesmo sistema proteína - adsorvente em tanques agitados em outras condições de pH e força iônica.
- 2) Analisar o efeito da força iônica nos experimentos em coluna.
- 3) Estudar o efeito da temperatura na capacidade de adsorção da resina.
- 4) Verificar o efeito da vazão da solução de insulina aplicada nos experimentos em colunas.

- 5) Realizar estudos de adsorção com a proteína diluída em extratos brutos e verificar qual a teor de purificação e recuperação que se consegue atingir.
- 6) Utilizar outras resinas presentes no mercado com a finalidade do desempenho.
- 7) Quantificar o efeito do volume morto do tanque agitado e verificar o efeito do mesmo nos parâmetros cinéticos q_m e K_d .
- 8) Determinar o coeficiente de difusão D_{ef} em uma condição padrão, utilizando leito fixo, com uma alta vazão da solução de insulina e determinar, através da modelagem matemática, os valores do coeficiente convectivo de transferência de massa K_f .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANÔNIMO, *Guide to Protein Separations - An Introduction to Methods and Techniques*, Rainin Instrument Co. Inc., (1989)
- ARAÚJO, M. O. D.; *Adsorção de Albumina de Soro em Resinas Trocadoras de Íons*, Dissertação de Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química - Unicamp, Campinas, (1996).
- 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)
- BROBECK, J. R.; *As Bases Fisiológicas da Prática Médica* in: Best & Taylor, Ed. Guanabara - Koogan, nona edição, pp. 725-733, (1976).
- 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., *Prediction of the Performance of Preparative Affinity Chromatography*, Journal of Chromatography, pp. 179-202, (1984).
- CHASE, H.A., *Purification of Proteins by Adsorption Chromatography in Expanded Beds*, Trends in Biotechnology, vol. 12, pp. 296-303, (1994)
- DIMARCHI, R. D.; LONG, H. B.; *Utilization of Analytical Reversed-Phase HPLC in Biosynthetic Insulin Production*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, pp. 181-189, (1993).
- 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)

GESELLSCHAFT FUR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG (GBF),
Scientific Report, pp. 113, 1992

GESELLSCHAFT FUR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG (GBF),
Scientific Report, pp. 167, 1993

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).

HASHIM, M. A., CHU, K. H., TSAN, P. S.; *Determination of Lumped Rate Coefficients of Proteins: Effect of Adsorption*, Chem. Eng. Technol., pp. 137-142, (1996)

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)

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)

PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY GUIDE, junho de 1991

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)

SANTANA, C. C., MIRANDA, E.A; *Determinação de Isotermas de Adsorção de Insulina em Resinas Trocadoras de Íons e de Fase Reversa*, *Relatório Técnico, Unicamp*, (1995)

SCOPES, R. K., *Protein Purification, Principles and Practice*, 2 ed., New York, Springer Verlag, (1987)

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. 474-497, (1985)

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).

STRYER, L. *Bioquímica*, 3^o edição, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S/A, pp. 213-239, (1988).

WALSH, G.; HEADON, D. R.; *Protein Biotechnology*, Jonh Wiley & Sons, pp. 211-200, (1994).

WATERS ACCELL PLUS QMA AND CM BULK MEDIA GUIDE,
(setembro de 1987)

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)

Anexo I - CURVAS CINÉTICAS

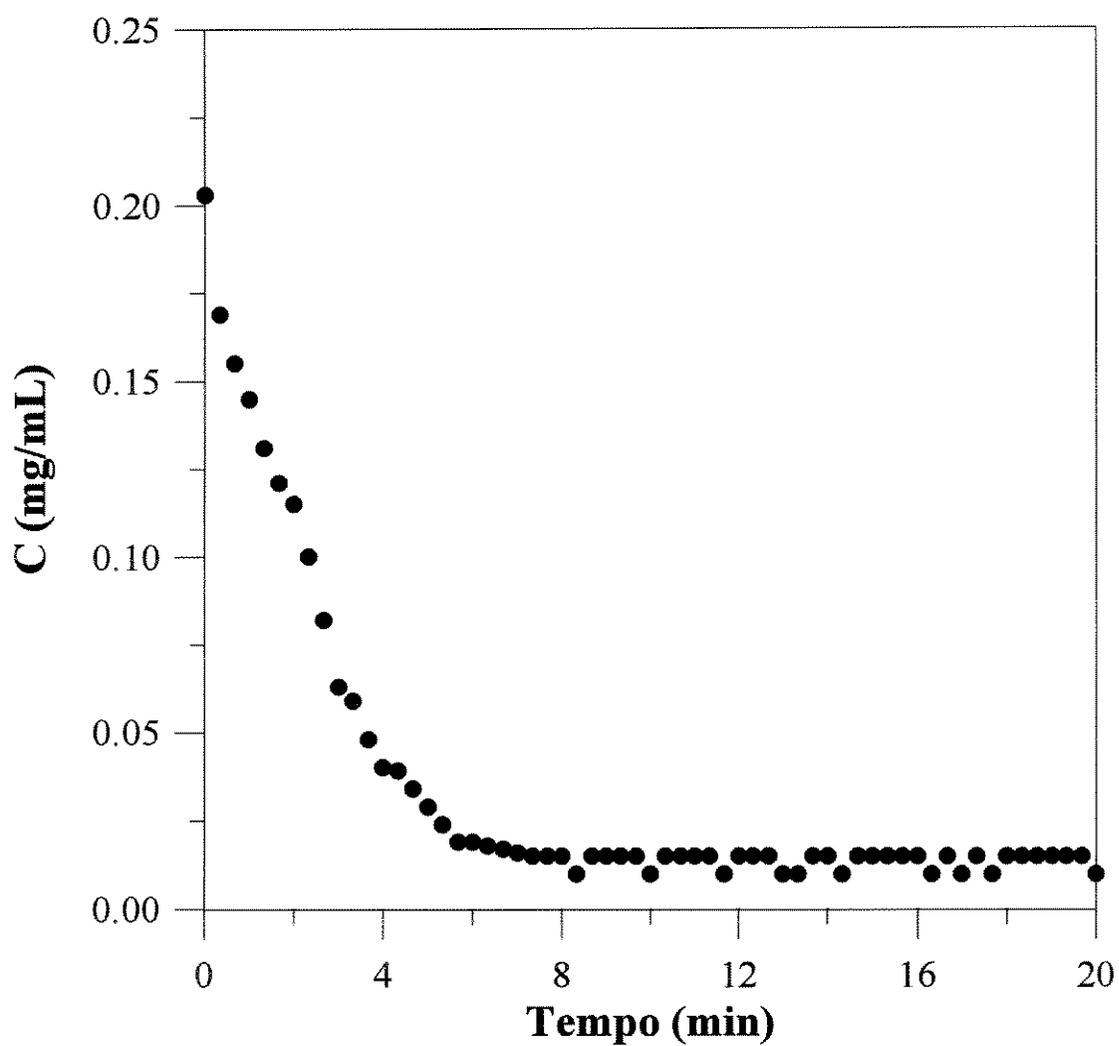


Figura A1 - Curva cinética da adsorção de insulina em solução a $C_0 = 0,203$ mg/ml em Accel Plus QMA, tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0.

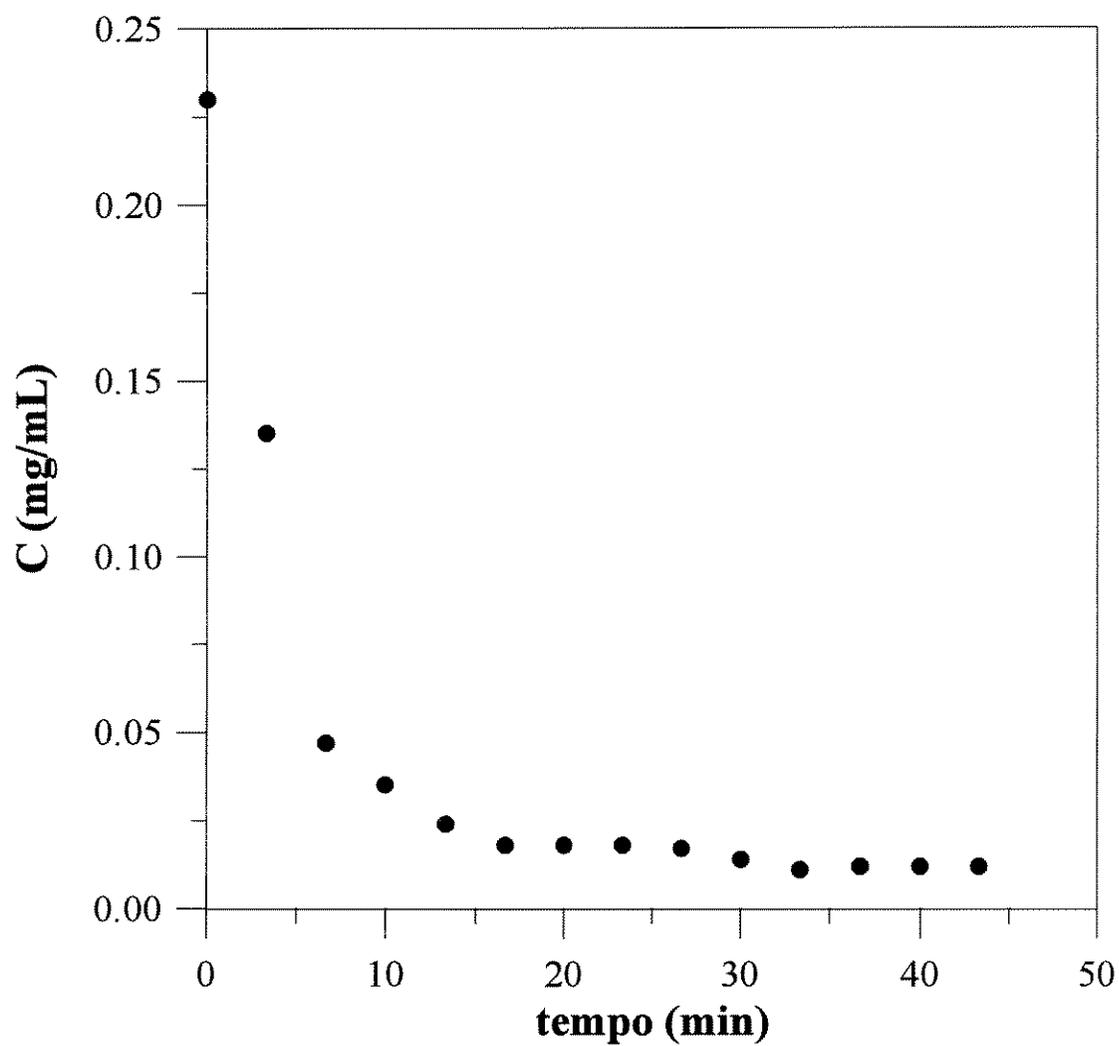


Figura A2 - Curva cinética da adsorção de insulina em solução a $C_0 = 0,229$ mg/ml em Accel Plus QMA, tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0.

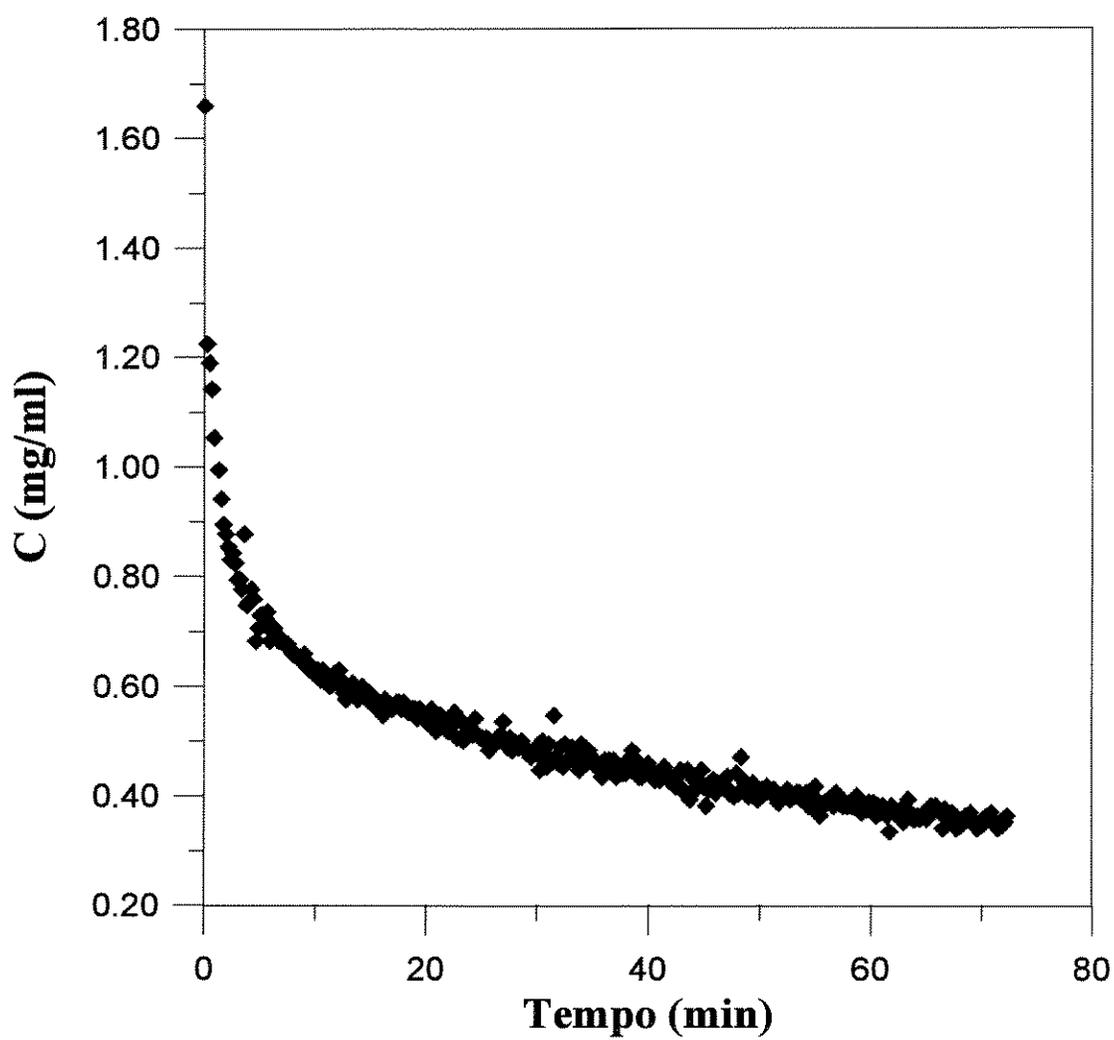


Figura A3 - Curva cinética da adsorção de insulina em solução a $C_0 = 1,66$ mg/ml em Accel Plus QMA, tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0.

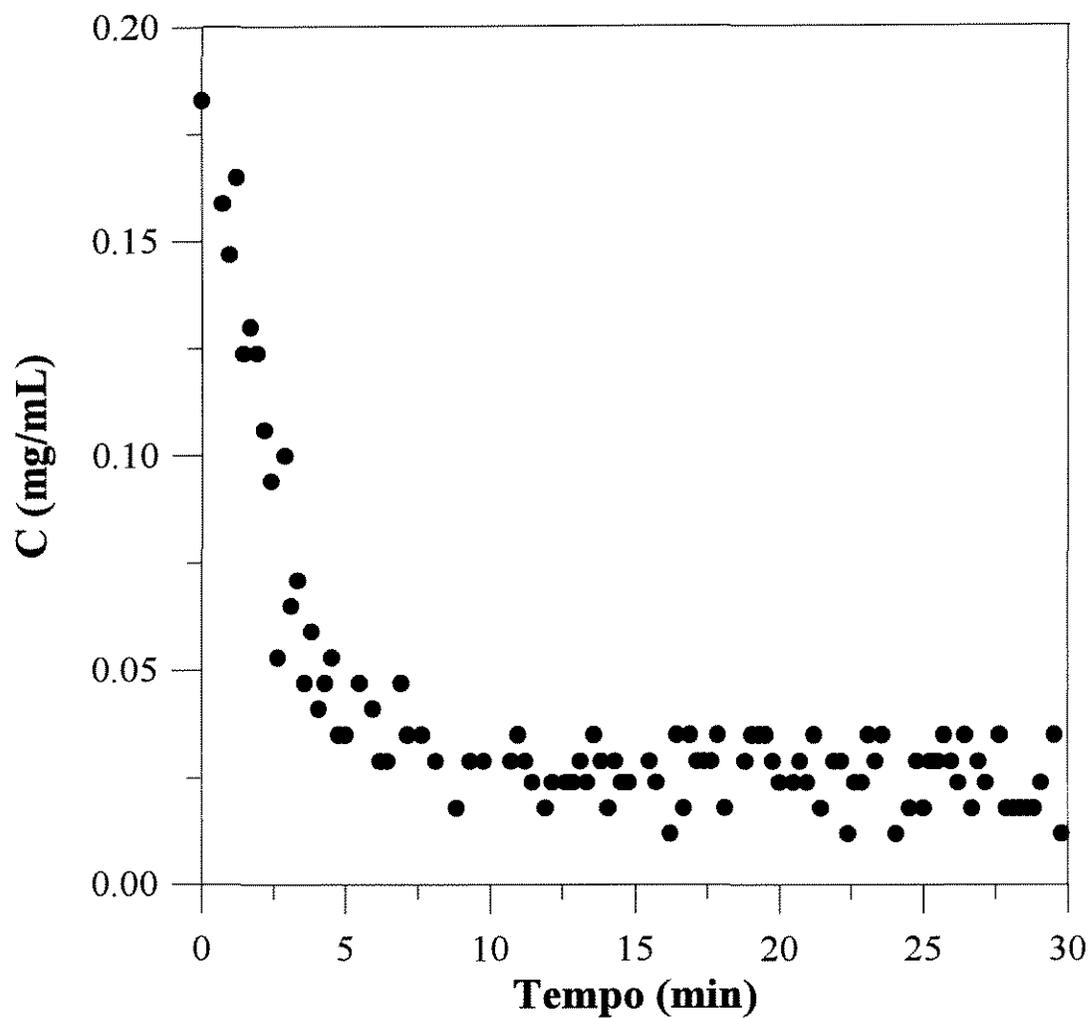


Figura A4 - Curva cinética da adsorção de insulina em solução a $C_0 = 0,182$ mg/ml em Accel Plus QMA, tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0.

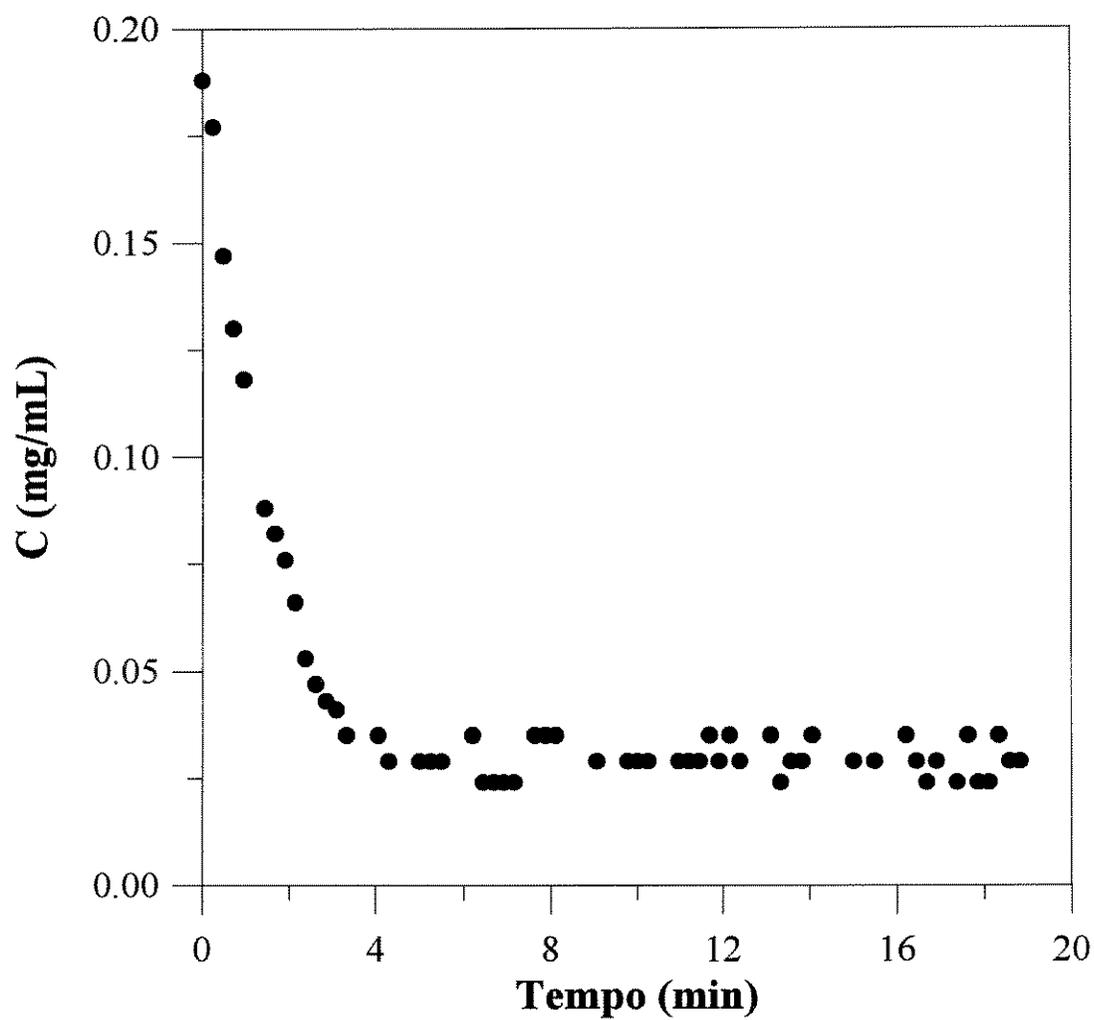


Figura A5 - Curva cinética da adsorção de insulina em solução a $C_0 = 0,188$ mg/ml em Accel Plus QMA, tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0.

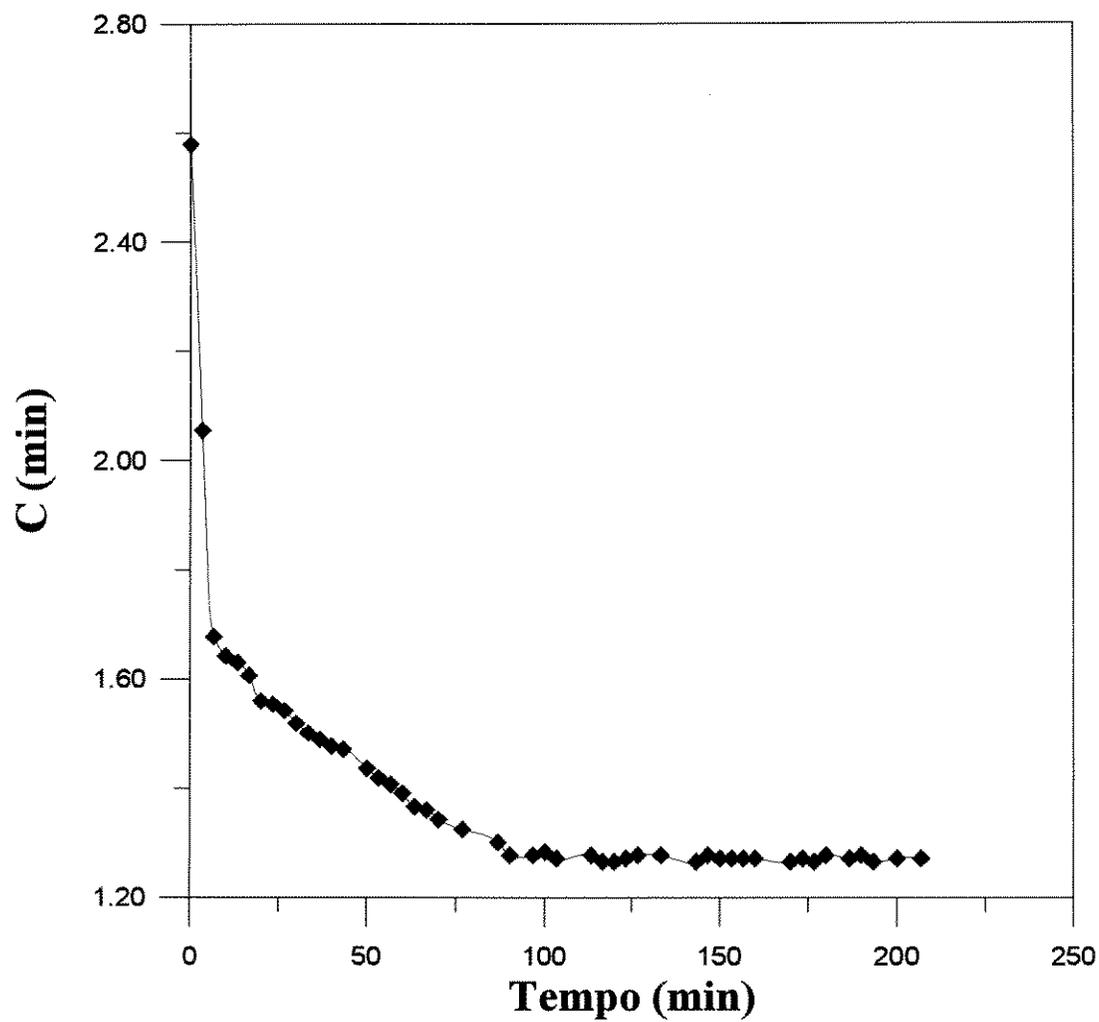


Figura A6 - Curva cinética da adsorção de insulina em solução a $C_0 = 2,58$ mg/ml em Accel Plus QMA, tampão TRIS/HCl 0,05 M pH 8,0.

Anexo II - CURVAS DE RUPTURA EM LEITO EXPANDIDO

As condições operacionais dessas curvas de ruptura são as mesmas dadas na Figura 4.6 no Capítulo 4.

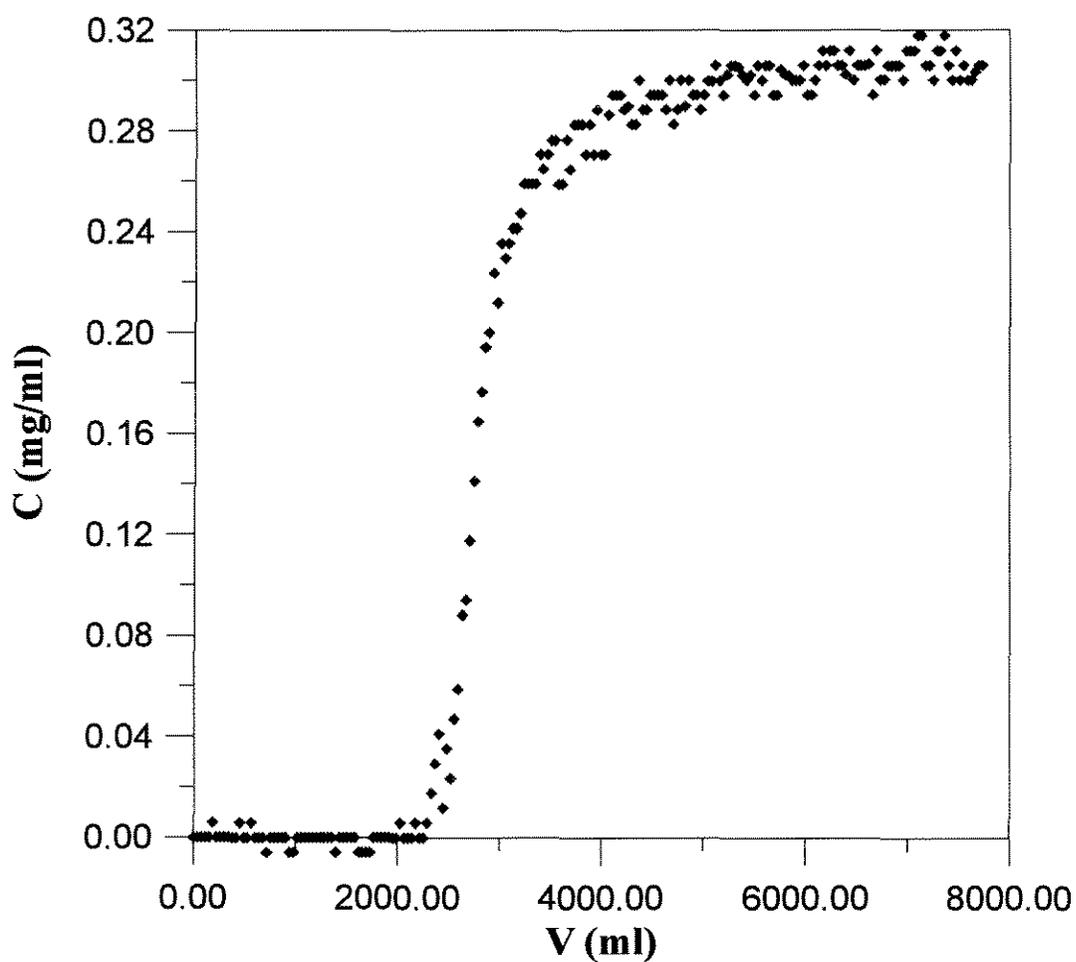


Figura A7 - Curva de ruptura obtida para a concentração de insulina a $C_0 = 0,30$ mg/ml.

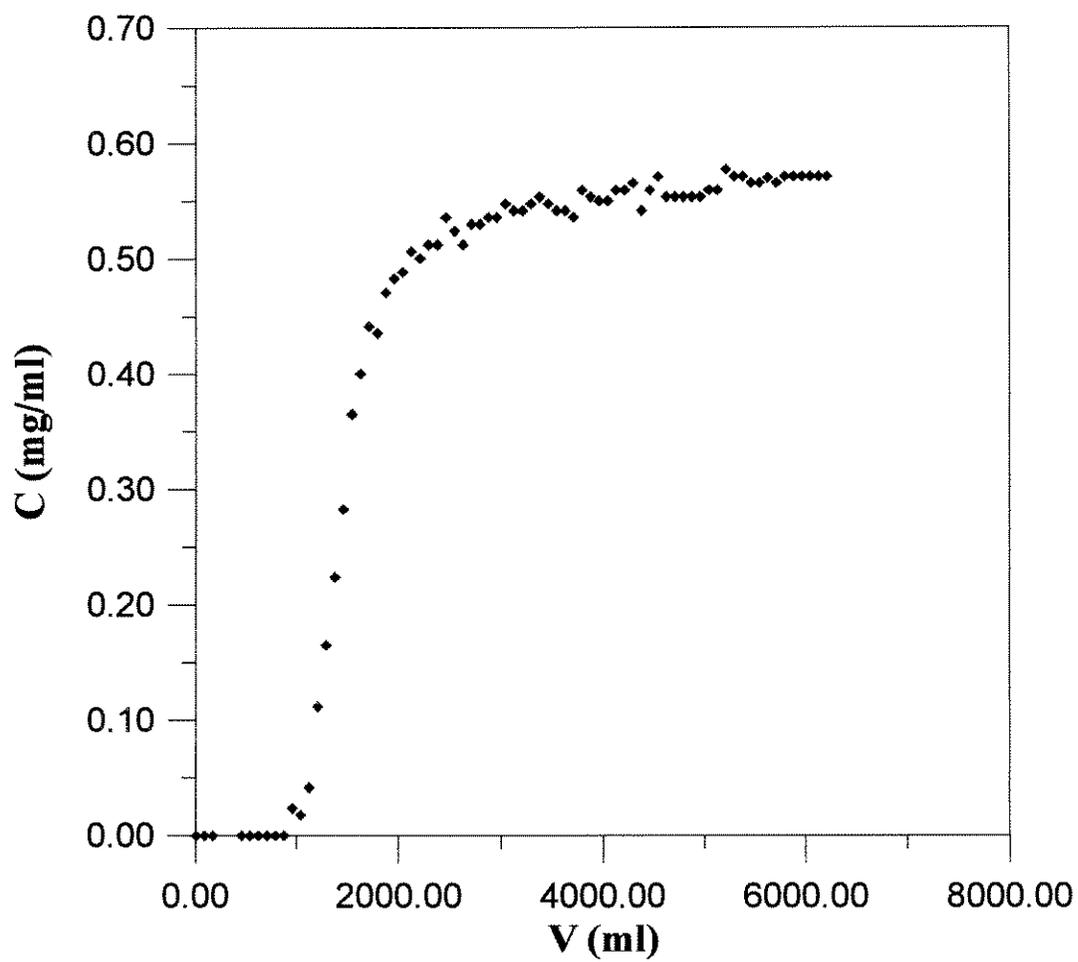


Figura A8 - Curva de ruptura obtida para a concentração de insulina a $C_0 = 0,58$ mg/ml.

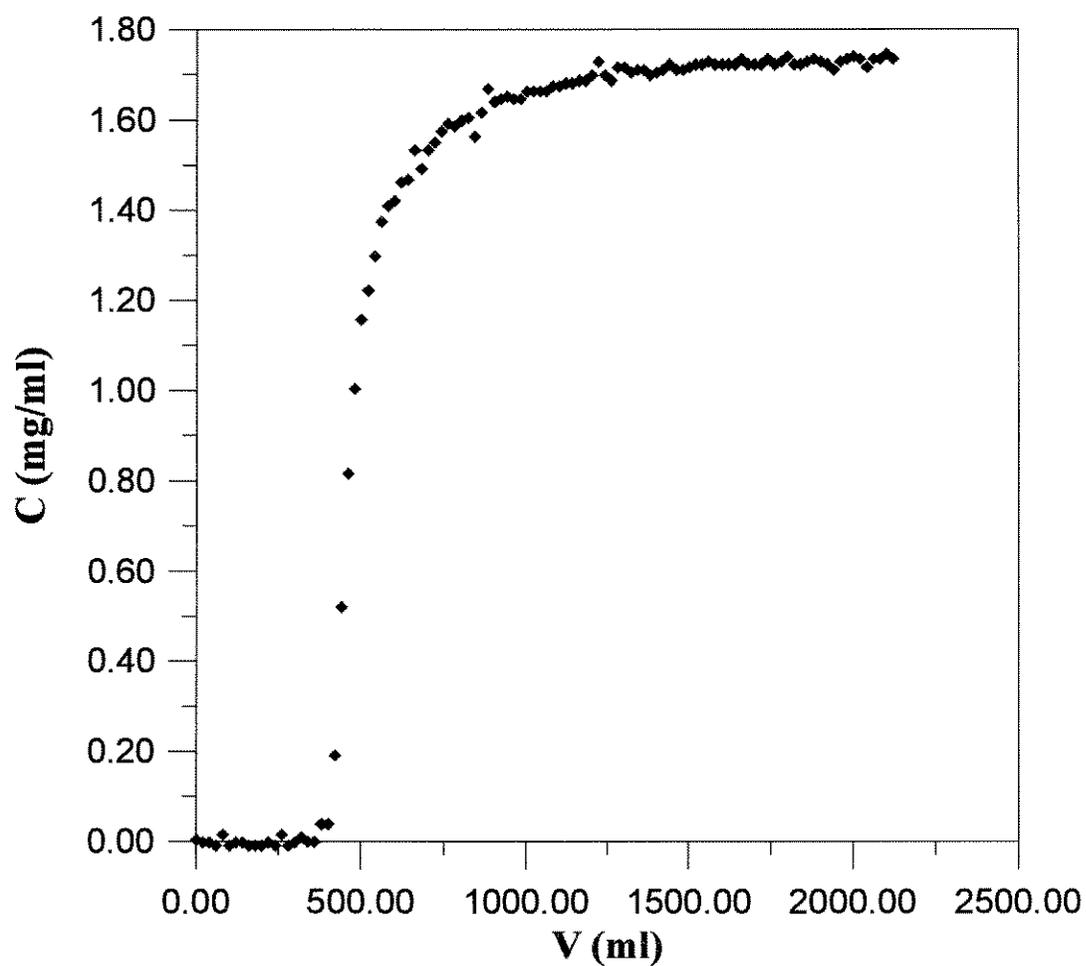


Figura A9 - Curva de ruptura obtida para a concentração de insulina a $C_0 = 1,73 \text{ mg/ml}$

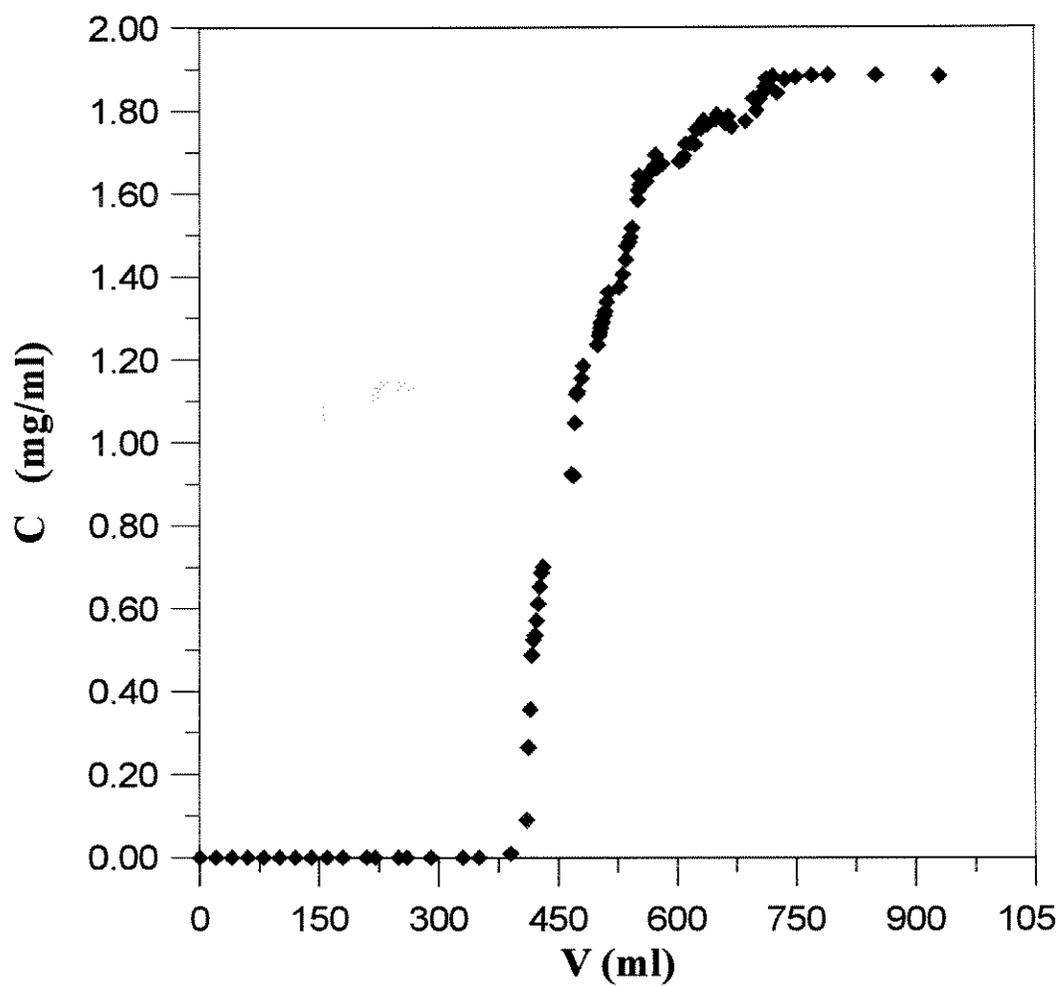


Figura A10 - Curva de ruptura obtida para a concentração de insulina a $C_0 = 1,88$ mg/ml.