

Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia Química

Área de concentração:

Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Tese de Doutorado:

Propostas e Análise do Desempenho de Diferentes Configurações de Sistemas de Purificação Contínua de Proteínas

Autor: Alessandro Marra Ribas

Orientador: Rubens Maciel Filho

Campinas – 2001



NIDADE	BC TUNICAMP R352p
/	EX.
OMEO RC/	52522
ROC 16-12	14103
	D 🔀
REÇO	511.00
DATA 37/	13/02

CM00180494-2

ID283940FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELABIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

R352p	Ribas, Alessandro Marra Propostas e análise do desempenho de diferentes configurações de sistemas de purificação contínua de proteínas / Alessandro Marra RibasCampinas, SP: [s.n.], 2001.
	Orientador: Rubens Maciel Filho. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharía Química.
	 Purificação. 2. Adsorção. 3. Enzimas. 4. Proteínas. Lipase. 6. Lisozima. I. Maciel Filho, Rubens. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese de Doutorado defendida por Alessandro Marra Ribas e aprovada em 17 de agosto de 2001 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. - Rubens Maciel Filho encergão de Olivein Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi Eduardo Cozelli Varco de Loledo Dr. Eduardo Coselli Vasco de Toledo

Stelande.

Dr. Eduardo César Dechechi

Esta versão corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida por Alessandro Marra Ribas e aprovada pela comissão julgadora em 17/08/2001.

uh Ú

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

Agradecimentos:

Ao professor Rubens pelo apoio e orientação.

A todos os amigos e amigas pela amizade e companheirismo. A Dona Olívia e o Sr. Guido pelo carinho e amizade. Ao CNPq pela concessão da bolsa. Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria. E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu

corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria. O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece. Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal; não folga com a injustiça, mas folga com a verdade; tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor nunca falha; mas havendo profecias serão aniquiladas; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá; porque, em parte, conhecemos e em parte profetizamos; mas, quando vier o que é perfeito, então o que é em parte será aniquilado. Quando eu era menino, falava como menino, sentia como menino, mas, logo que cheguei a ser homem, acabei com as coisas de menino. Porque agora vemos por espelho em enigma, mas então veremos face a face; agora conheço em parte, mas então conhecerei como também sou conhecido. Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor.

Com amor,

aos meus pais Luiz e Maria Aparecida

e irmãos Vinicius e Andrea

Resumo

Enzimas e proteínas vêm sendo utilizadas em inúmeros produtos nas mais diversas áreas, tais como em indústrias farmacêuticas, alimentícias, e de detergentes. No processo de produção de enzimas e proteínas estas são obtidas em meio a impurezas que precisam ser separadas para que as enzimas tenham as especificações necessárias para cada tipo de aplicação. Os processos de purificação e extração de proteínas e enzimas além de estar diretamente ligado a qualidade final do produto correspondem a uma importante parcela nos gastos de produção.

Este trabalho teve como objetivo estudar computacionalmente o desempenho de diferentes configurações de sistemas de purificação de proteínas contínuos. Foram propostas e estudadas diferentes configurações derivadas do sistema CARE (Continuous Adsorption Recycle Extraction) de purificação de proteína que tiveram seu desempenho comparado com o desempenho do leito móvel simulado (LMS). Estudou-se também o desempenho do sistema de purificação proposto neste trabalho, o tanque de mistura móvel simulado (TMMS), que consiste da substituição das colunas do leito móvel simulado por tanques de mistura com membrana.

Os modelos matemáticos de cada sistema de purificação foram obtidos a partir de um balanço de massa de enzimas e impurezas e os parâmetros cinéticos de adsorção utilizados são das enzimas lisozima e lipase. Para os diferentes sistemas de purificação obteve-se equações diferenciais ordinárias e equações diferenciais parciais que foram discretizadas em dez partes e resolvidos pelo método de Runge-Kutta de quarta ordem.

Entre os sistemas de purificação estudados o que apresentou melhor desempenho foi o leito móvel simulado, seguido pelo tanque de mistura móvel simulado e finalmente os sistemas derivados do sistema CARE. O leito móvel simulado apresentou um tempo de troca ótimo no qual obteve-se alto rendimento e alto fator de purificação que são requisitos essenciais a um processo de purificação. O tanque de mistura móvel simulado foi o segundo melhor sistema de purificação pois apesar de apresentar um baixo rendimento teve um bom fator de purificação. Os sistemas derivados do sistema CARE apresentaram os menores fatores de purificação e consequentemente a menor capacidade de purificação. **Palavras-chave:** purificação, extração, adsorção, enzima, proteína, lipase, lisozima

Abstract

Enzymes and proteins have been used in countless products in a great variety of several areas, such as in pharmaceutical, nutrition, and detergent industries. In the enzymes and proteins production process these are obtained with impurities that need to be separated so that the enzymes have the necessary specifications for each application type. The protein and enzyme purification and extraction processes, besides being directly tied up to the final quality of the product, correspond to an important portion in the production expenses.

The objective of this work was to study by computer simulations the performance of different configurations of continuous systems of protein purification. Different configurations were proposed and studied. They were derived from the CARE system (Continuous Adsorption Recycle Extraction) of protein purification that had its performance compared with the performance of the simulated moving bed (SMB). The performance of the purification system proposed in this work was also studied: the simulated moving stirred tank (SMST), which consists of the substitution of the columns of the simulated moving bed by stirred tanks with membrane.

The mathematical models of each purification system were obtained from a mass balance of enzymes and impurities and the kinetic parameters of adsorption used are from the lisozima and lipase enzymes. In the different purification systems ordinary differential equations and partial differential equations were obtained. They were subsequently discretizated in ten parts and solved by the Runge-Kutta of fourth order method.

Among the purification systems studied, that presented better performance was the simulated moving bed, followed by the simulated moving stirred tank and finally the derived systems of the CARE system. The simulated moving bed presented an optimum time of change (time of valve rotation) in which high yield and high purification factor, which are excellent characteristic in a purification process, were obtained. The simulated moving stirred tank was the second best purification system because, in spite of presenting a low yield it showed a good purification factor. The derived systems of the CARE system presented the smallest purification factors and consequently the smallest purification capacity.

Key-words: purification, extraction, adsorption, enzyme, protein, lipase, lisozima

NOMENCLATURA

Ci = concentração de impurezas no estágio *i* do sistema de purificação (mol/litro e g/litro para o sistema de purificação da lisozima e lipase respectivamente)

Ei = concentração ou atividade de enzimas na fase líquida no estágio *i* do sistema de purificação (mol/litro ou U/litro para o sistema de purificação da lisozima ou lipase respectivamente)

E0 =concentração de enzima na alimentação (mol/litro ou U/litro)

FA = fluxo volumétrico na alimentação (litro/hora)

FD = Fluxo volumétrico do dessorvente (litros/hora)

FE = Fluxo volumétrico do extrato (litros/hora)

FR = Fluxo volumétrico do refinado (litros/hora)

Fi = fluxo volumétrico no estágio *i* do sistema de purificação na alimentação, lavagem ou eluição (litros/hora)

FZi = fluxo volumétrico na zona *i* (1, 2, 3 ou 4) do sistema de purificação para o sistema de leito móvel simulado ou tanque de mistura móvel simulado (litro/hora)

k1, k2 e k3 = parâmetros cinéticos da taxa de adsorção

L = comprimento axial da coluna ou duto tubular com membrana

Qi = capacidade de enzima adsorvida por volume de resina no estágio *i* do sistema de purificação (concentração de enzima adsorvida - mol/litro ou U/litro)

Qm = capacidade máxima de enzima adsorvida por volume de resina de adsorção (mol/litro ou U/litro)

Si = concentração de sal (NaCl) no estágio i do sistema de purificação (mol/litro)

S0 = concentração de sal na alimentação (mol/litro)

t = tempo (horas)

Vl = volume de líquido (litros)

 V_s = volume de sólido (resina adsorvente - litros)

V = volume dos reatores (litros)

z = posição axial ao longo da coluna ou duto tubular com membrana

 ε = porosidade do meio

CARE = "Continuous Adsorption Recycle Extraction" (Extração Contínua com Reciclo da Resina de Adsorção)

LMS = Leito Móvel Simulado

TMMS = Tanque de Mistura Móvel Simulado

U = unidade de atividade lipolítica da lipase definida como a quantidade de enzima que libera um µmol de ácido graxo por minuto de reação

SUMÁRIO

RESUMOvii	i
ABSTRACTvii	i
NOMENCLATURAix	•
I – INTRODUÇÃO	1
II – REVISÃO DA LITERATURA6	5
II.1. Processos Cromatográficos	9
II.1.1. Cromatografia)
II.1.2. Técnicas Cromatográficas12	2
II.1.3. Cromatografia de Afinidade	3
II.1.4. Cromatografia de Interação Hidrofóbica1	5
II.1.5. Cromatografia de Troca Iônica1	5
II.1.6. Cromatografia Líquida de Afinidade de Alta Performance1	6
II.1.7. Cromatografia de Leito Fluidizado & Cromatografia de Leito Expandido1	6
II.1.8. Leito Fluidizado Estabilizado Magneticamente1	7
II.1.9. Cromatografia de Leito Móvel de Fluxo Pistonado1	8
II.1.10. Leito Móvel Verdadeiro & Leito Móvel Simulado	20
II.1.11. Cromatografia de Anel Rotatório & Cromatografia Anular Contínua2	26
II.2. Processos Não Cromatográficos	27
II.2.1. Fita Móvel	27
II.2.2. Bolsa Adsorvente Móvel2	28
II.2.3. Processos Extrativos	28

II.2.4. Extração Bifásica Aquosa Contínua	0
II.2.5. Sistema Bifásico Aquoso com Afinidade	0
II.2.6. Separação em Emulsão de Perfluorcarbonos de Afinidade	1
II.2.7. Extração Contracorrente Contínua	3
II.2.8. Filtração com Membranas3	5
II.2.9. Filtração de Afinidade	5
II.2.10. Reator de Leito Fluidizado Adsortivo Contracorrente	7
II.2.11. Membranas como Separadores-Reatores4	0
II.2.12. Extração Contínua com Reciclo da Resina de Adsorção - Continuous Adsorptio	m
Recycle Extraction (CARE)	•

III – MODELAGEM MATEMÁTICA46
III.1. Configurações Derivadas do Sistema CARE
III.1.1. Sistema CARE de Dois Estágios (CARE2)
III.1.2. Sistema CARE de Três Estágios (CARE3)
III.1.3. Sistema CARE de Quatro Estágios (CARE4)
III.1.4. Sistema CARE de Três Estágios com Reciclo Modificado (CARE3r)74
III.1.5. Sistema CARE de Três Estágios com Membrana de Filtração Modificada (CARE3m)
III.1.6. Sistema CARE de Dois Estágios com Eluição em Reator de Fluxo Pistonado (CARE2pfr)
III.1.7. Sistema CARE de Três Estágios com Lavagem e Eluição em Reator de Fluxo Pistonado (CARE3pfr)
III.1.8. Sistema CARE de Três Estágios com Lavagem e Eluição em Reator de Fluxo Pistonado, com Membrana de Filtração Modificada (CARE3pfrm)

III.2. Configurações Derivadas do Sistema LMS	9 0
III.2.1. Sistema LMS de Três Zonas e Quatro Colunas (LMS4-e)	90
III.2.2. Sistema LMS de Três Zonas e Oito Colunas – Duas Colunas de Eluição (L	MS8-
2e)	99
III.2.3. Sistema LMS de Quatro Zonas e Oito Colunas (LMS8)	102
III.2.4. Sistema LMS de Três Zonas e Oito Colunas - Uma Coluna de Eluição (L	MS8-
e)	.105
III.3. Configurações Derivadas do Sistema TMMS	109
III.3.1. Sistema TMMS de Três Zonas e Quatro Tanques (TMMS4-e)	114
III.3.2. Sistema TMMS de Três Zonas e Oito Tanques – Dois Tanques de El	luição
(TMMS8-2e)	116
III.3.3. Sistema TMMS de Três Zonas e Oito Tanques - Um Tanque de Eluição (TM	MS8-
e)	.119
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	.123
IV.1. Configurações Derivadas do Sistema CARE	.123
IV.1.1. Resultados de Purificação da Lisozima	.123
IV.1.2. Resultados de Purificação da Lipase	.132
IV.2. Configurações Derivadas do Sistema LMS	137
IV.3. Leito Móvel Simulado de Quatro Colunas	.150
IV.4. Configurações Derivadas do Sistema TMMS	.163
IV.5. Tanque de Mistura Móvel Simulado de Quatro Tanques	173
IV.6. Comparação entre os Sistemas LMS4-e & TMMS40-10e	.182
V – CONCLUSÕES	.187
VI – SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	.191
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	192

I – INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de produtos biotecnológicos a partir de seres vivos existentes e modificados geneticamente possibilita a obtenção de uma grande variedade de substâncias para as mais diversas aplicações. Por exemplo produtos biotecnológicos como enzimas e proteínas em geral, vem sendo utilizados, na síntese enzimática como catalisadores, em indústrias farmacêuticas, alimentícias, de cosméticos e de detergentes.

Um exemplo de enzima que vem sendo utilizada industrialmente é a lipase a qual catalisa a hidrólise de triglicerídios gerando mono e di glicerídios e ácidos graxos livres. As lipases são usadas na hidrólise da gordura do leite para ácidos graxos livres possibilitando inúmeras aplicações na indústria de laticínios; são usadas em produtos de limpeza domésticos, e na indústria oleoquímica a lipase é tradicionalmente usada para fracionar gorduras e óleos.

O desenvolvimento de produtos biotecnológicos se inicia em escala de laboratório e tem como objetivo final a comercialização do produto. O desenvolvimento de tecnologia manufatureira e de processos para produção em grande escala é um grande desafio, fundamental para o sucesso comercial destes produtos. Este desafio é particularmente importante para o desenvolvimento de processos de purificação de proteínas onde os custos de purificação tendem a ser os maiores do processo. Um dos principais objetivos da purificação em escala industrial é minimizar os custos do produto purificado dentro de determinadas especificações requeridas pelo mercado. A busca por processos de purificação mais eficientes e baratos tem promovido a proposta e desenvolvimento de novos métodos de purificação de proteínas bem como a melhoria do desempenho dos métodos existentes. O desenvolvimento de novos materiais tais como resinas adsorventes mais resistentes, membranas de microfiltração com diferentes diâmetros de corte e ligantes mais seletivos tem tido grandes avanços nos últimos anos possibilitado a purificação de uma grande variedade de substâncias.

O princípio usado para separação das proteínas das impurezas são baseadas nas diferenças entre suas propriedades tais como tamanho, massa molecular, carga, conformação espacial, afinidade biológica e hidrofobicidade. Os métodos de purificação adsortivos constituem uma importante classe de métodos de purificação onde a proteína alvo a ser purificada é adsorvida a um ligante acoplado em um suporte que pode ser líquido ou sólido, uma membrana, um polímero natural ou sintético, e assim, a proteína alvo adsorvida pode ser facilmente separada das impurezas que a princípio não deve ter nenhuma afinidade com o ligante. Entre os princípios usados para a adsorção da proteína alvo estão a afinidade biológica, hidrofobicidade e rede de cargas com alta seletividade entre a proteína e as impurezas levando a alta resolução de purificação. A interação por afinidade biológica esta baseada nas interações específicas entre as biomoléculas levando a uma alta seletividade. A configuração física mais comumente utilizada nos processos de adsorção é a coluna cromatográfica onde a maior ou menor tendência de adsorção ao ligante faz com que haja uma diferença de velocidade com que as substâncias percorrem o leito fixo promovendo a separação. Os métodos cromatográficos possibilitam alta resolução de purificação, no entanto, apresentam limitações como altas quedas de pressão, e a necessidade de uma solução de alimentação pré-purificada sem impurezas sólidas que possam impedir o fluxo ao longo do leito.

Uma outra importante classe de processos de separação são os métodos de purificação que utilizam membranas com determinado diâmetro de corte que permitem a passagem de algumas substâncias e impedem a passagem de outras, promovendo a separação. Em geral são utilizadas para separações de substâncias com diferenças de tamanho maiores que dez vezes e são muito utilizados para separações em grande escala. A dificuldade em separar substâncias com massas moleculares próximas pode ser superada com o acoplamento de um ligante em um suporte de alta massa molecular, resultando em um aumento na massa molecular da substância a ser purificada. O princípio geral da ultrafiltração por afinidade é mostrado na Figura I-1. Pode ser visto que as membranas usadas têm um tamanho de poro grande o suficiente para permitir a passagem de todas as moléculas de proteínas através dos poros. No entanto se um ligante por afinidade macromolecular for adicionado ao sistema, o material acoplado ao ligante será então seletivamente retido em um lado da membrana, enquanto todas as outras moléculas permeiam. Quando o processo de lavagem termina, a maioria das moléculas de proteínas não ligadas ao ligante macromolecular foram removidas, então o complexo por afinidade pode ser dissociado e o material liberado passa através da membrana para ser coletado. Em um passo final, o ligante macromolecular pode ser recondicionado para uso no próximo

ciclo. A combinação de afinidade com ultrafiltração tem como propósito aliar a alta especificidade da afinidade com a alta produtividade da ultrafiltração.



Figura I-1. Princípio da purificação por ultrafiltração por afinidade: (A) o passo de adsorção, onde a proteína alvo é adsorvida pelo ligante acoplado a matriz, (B) lavagem, onde impurezas passam através da membrana e (C) dissociação da proteína alvo que permeia através da membrana purificada (eluição).

Um processo de extração contínua com reciclo da resina de adsorção (Continuous Adsorption Recycle Extraction – CARE) formado por dois tanques de mistura com membranas acopladas (Figura I-2) foi proposto inicialmente por Pungor *et al.* (1987). Neste processo, a solução de proteína a ser purificada é alimentada no primeiro tanque onde ocorre a adsorção da proteína alvo pelo ligante de afinidade acoplado à matriz. A proteína alvo adsorvida na matriz de alta massa molecular fica impedida de passar através da membrana enquanto as impurezas permeiam através da membrana e vão sendo continuamente eliminadas. Simultaneamente, a mistura reacional é bombeada para o segundo tanque de mistura onde a adição de um tampão de eluição promove a dessorção da proteína alvo que permeia através da membrana e é coletada com uma quantidade reduzida de impurezas. A mistura reacional do tanque de eluição é continuamente recirculada para o tanque de adsorção para que a resina adsorvente seja novamente utilizada e assim o processo opere de forma contínua.



Figura I-2. Representação esquemática do sistema CARE. Na qual a seta " \downarrow " representa fluxo de líquido e a seta " \Rightarrow " representa fluxo da mistura reacional (sólido e líquido).

Este trabalho teve como objetivo simular e analisar o desempenho de diferentes sistemas de purificação de proteína. Foram propostas e estudadas diferentes configurações do sistema CARE original. Estudou-se a modificação do sistema CARE sob diferentes aspectos, entre eles o aumento do número de estágios pela inclusão de um estágio intermediário de lavagem. Estudou-se a substituição dos reatores tanques de mistura com membrana, nos estágios de lavagem e eluição, por reatores de fluxo pistonado com membrana. Estudou-se o efeito da substituição das membranas com diferentes diâmetros de corte e o efeito da modificação no reciclo. Estudou-se o sistema de purificação contínuo, proposto neste trabalho, denominado tanque de mistura móvel simulado (TMMS). Este trabalho também teve como objetivo comparar o desempenho destas configurações com o sistema de leito móvel simulado. O sistema TMMS é semelhante ao sistema de LMS, mas ao invés de reatores colunas, este sistema utiliza reatores tanque de mistura com membrana, semelhante ao utilizado no sistema CARE.

As simulações computacionais foram feitas a partir dos modelos matemáticos obtidos a partir de balanços de massa de enzima e impurezas para cada configuração estudada. As equações diferenciais do modelo foram resolvidas por diferenças finitas pelo método de Runge-Kutta de quarta ordem. As equações diferenciais parciais dos sistemas

empregando reatores de fluxo pistonado foram discretizadas e as equações resultantes foram integradas também pelo método de Runge-Kutta de quarta ordem. Os parâmetros cinéticos experimentais de adsorção e dessorção são da enzima lisozima adsorvida por afinidade em Cibracon Blue (Chase 1984b, Cowan *et al.* 1986) e da enzima lipase adsorvida em resina de interação hidrofóbica (Taboada 1999), cujos parâmetros cinéticos são função da concentração de sal no meio reacional.

II – REVISÃO DA LITERATURA

Neste item são apresentados alguns dos diferentes processos contínuos de purificação de proteínas reportados na literatura.

A utilização de enzimas livres ou imobilizadas na síntese de substâncias apresentam vantagens significativas comparadas aos processos químicos tradicionais. Entre as vantagens dos processos catalisados por enzimas, podemos citar o baixo consumo de energia pois as reações catalisadas por enzimas geralmente são conduzidas à temperatura ambiente, a biodegradabilidade das enzimas que reduzem os danos causados ao meio ambiente e a maior seletividade nas reações reduzindo a produção de subprodutos indesejados. Algumas enzimas possuem estereoseletividade promovendo a obtenção economicamente viável de compostos opticamente ativos (Pimentel, 1996). Em drogas farmacêuticas a atividade biológica, toxicidade e metabolismo podem ser dramaticamente diferentes para o enantiômero de uma droga quiral, e portanto como algumas enzimas são estereoseletivas, apresentam grande potencial de aplicação na síntese quimio-enzimática de fármacos.

A lipase é um exemplo de enzima que tem sido utilizada comercialmente em diferentes aplicações tais como na indústria oleoquímica, de papel, farmacêutica e de detergentes, bem como no tratamento de efluentes. Lipases, ou triacilglicerol acil ester hidrolases (E.C. 3.1.1.3), são enzimas que possuem uma capacidade intrínseca de catalisar a ruptura de ligações carboxil ester em tri, di, e monoglicerol (os principais constituintes de óleos e gorduras de plantas, animais e micróbios) (Paiva *et al.*, 2000). Atualmente mais de cinquenta lipases têm sido identificadas, purificadas e caracterizadas a partir de fontes naturais como plantas, animais, e microorganismos (nativos ou geneticamente modificados).

A versatilidade industrial e desempenho catalítico único das lipases tem atraído crescente interesse em todas as partes do mundo. Preocupações ecológicas também têm favorecido aplicações mais extensivas da lipase, pois reações catalisadas por lipases aproximam-se mais dos caminhos utilizados pela natureza, e consequentemente os mecanismos de reação e processos nos quais estas enzimas participam pode ocorrem em ambientes mais brandos do que na síntese química. Vantagens adicionais da lipase incluem

sua habilidade seletiva (incluindo características tais como estereoespecificidade, seletividade na formação de produtos e seletividade na atuação sobre o substrato), a qual é muito maior do que aquela dos catalisadores inorgânicos e, assim, permite a produção de produtos de alto valor agregado. Outra vantagem é sua eficiência catalítica resultante de energias de ativação muito mais baixas e condições reacionais mais brandas de temperatura e pH, o que reduz o consumo de energia e danos térmicos aos produtos de reação (Paiva *et al.*, 2000). O interesse na utilização de lipases na indústria alimentícia vem se destacando nos últimos anos. Entre as aplicações neste campo podemos mencionar hidrólise de gordura do leite para produção de aromas de vários tipos de queijos maturados sob condições controladas, hidrólise de lipídios da gema de ovo, remoção de gordura em carnes e peixes, obtenção de produtos com propriedades similares à manteiga de cacau, interesterificação de óleos e gorduras e produção de aromas naturais (Taboada, 1999).

Em geral as enzimas são obtidas juntamente com impurezas de forma que é necessário uma purificação para obtenção de um produto com pureza adequada para cada tipo de aplicação. Dependendo se a obtenção do produto é intra ou extra celular, diferentes procedimentos são usados para obter a biomolécula na forma purificada. Para uma proteína excretada pelo organismo, em geral as células são removidas do caldo por uma separação líquido/sólido. Este passo é seguido pela concentração e purificação da proteína no caldo claro. Para uma proteína que é obtida intracelularmente, as células devem num primeiro passo ser rompidas para liberar o produto. Após um segundo passo constituindo na remoção de sólidos, fica em solução, não apenas a proteína desejada mas também, o meio de crescimento, moléculas excretadas e todas as proteínas solúveis e nucleotídeos o qual estavam originalmente contidos na célula (Burns & Graves, 1985). O isolamento de compostos de fontes biológicas permite que sejam produzidos aqueles produtos que são muito complexos ou muito custosos para serem produzidos por via química. A faixa de tamanho dos compostos que podem ser produzidos por sistemas biológicos se estende desde pequenas moléculas tais como etanol até moléculas de proteínas grandes e complexas com atividade enzimática. Para estes compostos serem de interesse comercial, eles têm que ser isolados de suas fontes e purificados a vários graus dependendo dos requisitos de seu uso final (Chase, 1984a).

Em um processo de purificação uma questão importante a ser analisada é em que aplicação a proteína será usada e, consequentemente, a quantidade de proteína a ser purificada. Dependendo do tipo de aplicação esta quantidade pode variar de alguns miligramas até quilogramas tais como as necessárias para aplicações farmacêuticas e industriais. O aumento de escala final de um processo está sujeito a limitações reais. Estas limitações provêem de considerações tais como custo, facilidade de obtenção da enzima e fatores físicos, tais como a capacidade de suporte da resina cromatográfica. Outra questão, é quanto à exigência da forma da proteína obtida ser na forma ativa (enzimas, proteínas reguladoras e anticorpos), ser em uma configuração nativa mas não associada a uma atividade ou não ser numa configuração específica. As técnicas usadas devem ser tão brandas quanto possível, mas em alguns casos há a necessidade de usar algum procedimento mais severo tais como os que envolvem extremos de pH, utilização de solventes orgânicos, detergentes, meios hidrofóbicos ou forte afinidade cromatográfica (Deutscher, 1990).

Conforme a finalidade de aplicação do produto obtido a purificação pode ser conduzida em uma série de passos de fracionamento em que as características e extensão dependem da pureza final requerida. Esta cascata de técnicas, o qual em alguns casos, pode exceder dez passos, leva a um baixo rendimento de produção e um alto custo do produto. Portanto um decréscimo no número de passos de processamento pode levar a maiores rendimentos de produção. Entretanto para assegurar que a pureza do produto não seja comprometida pela redução de etapas, os passos remanescentes tem que ser de natureza altamente seletiva (Chang *et al.*, 1993).

Procedimentos em batelada quase sempre são utilizados inicialmente na purificação pois frequentemente são mais efetivos na remoção de materiais não protéicos e são mais amenos para grandes volumes e grandes quantidades de material que existem nos primeiros estágios de purificação, tornando a preparação mais adequada para os procedimentos de purificação (Deutscher, 1990). A estratégia geralmente é partir de procedimentos de alta capacidade para baixa capacidade atendendo quando possível ao uso de materiais específicos de afinidade.

Um passo preliminar de purificação usando precipitação ou cromatografia de troca iônica remove a maioria das impurezas, reduz a quantidade de material que deve ser subsequentemente processado e melhora a resolução. A precipitação de uma proteína em uma extração pode ser alcançada pela adição de sal, solvente orgânico ou polímero orgânico, ou ainda por variação do pH ou temperatura da solução. Este passo preliminar de separação é recomendável principalmente quando grandes quantidades de amostra devem ser processadas ou quando a substância de interesse está na presença de grandes quantidades de impurezas precipitadas tais como lipoproteínas, fatores de revestimento, etc. Quando o material inicial consiste de tecidos, cultura de células, produto de fermentação ou material de plantas, outros passos, tais como solubilização, homogeneização, extração, filtração e/ou centrifugação são incluídos no esquema de fracionamento (Janson & Rýden, 1989).

II.1. Processos Cromatográficos

II.1.1. Cromatografia

A purificação de proteínas é dominada por separações baseadas em adsorção, cuja principal configuração utilizada é a de leito fixo em colunas, envolvendo uma fase adsorvente sólida estacionária e uma fase líquida móvel contendo os solutos de interesse (Gordon et al., 1990a). Esta técnica de separação de proteínas, muito utilizada atualmente, é denominada separação cromatográfica. Operações de separação cromatográfica em batelada, comumente envolvem a injeção alternada de uma amostra de uma mistura e solvente ao leito de partículas de resina adsorvente. Entre os diferentes princípios de adsorção que atuam nas resinas pode-se citar o de troca iônica, de afinidade e o de interação hidrofóbica (Hashimoto et al., 1993). A Figura II-1 mostra o diagrama esquemático de uma operação cromatográfica típica. As diferentes afinidades de adsorção entre os componentes A e B em uma resina de adsorção empacotada em uma coluna resulta em diferentes taxas de migração dos dois componentes na coluna (Hashimoto et al., 1993), permitindo a separação. Métodos de purificação cromatográficos envolvem menor consumo de energia do que outros métodos de separação, como por exemplo a destilação. Em particular a cromatografia líquida é frequentemente realizada a temperatura ambiente, evitando desta forma a perda de atividade dos componentes termo sensíveis. Pode-se separar componentes que são difíceis de purificar por outros métodos usando resinas adequadas (Hashimoto et al., 1993).

Diversas versões de cromatografia líquida são usadas para a purificação de proteínas, diferindo principalmente pelo princípio de separação da fase estacionária. Na Tabela II-1 são apresentadas algumas versões de cromatografia líquida e seu respectivo princípio de separação.



Figura II-1. Separação cromatográfica em adsorvedor de leito fixo (adaptado de Hashimoto et al., 1993).

Tabela II-1. Versões de cromatografia líquida de purificação de proteínas (Janson & Rýden, 1989)

Princípio de separação	Tipo de cromatografia
Tamanho e forma	Filtração a gel
Rede de cargas	Troca iônica
Hidrofobicidade	Interação hidrofóbica (fase reversa)
Função biológica	Afinidade
Antigenicidade	Imunoadsorção
Ligação metálica	Afinidade por íon metálico imobilizado

As fases estacionárias modernas são quase exclusivamente na forma esférica com diâmetro médio de partícula variando de alguns microns até uma centena de microns (Janson & Rýden, 1989). Em geral uma matriz ideal para cromatografia de proteína, além de ser hidrofílica, não deve conter grupos que se liguem espontaneamente à moléculas de proteína. Deve ainda conter grupos funcionais que permitam o acoplamento controlado de uma ampla variedade de ligantes de proteínas. A resina adsorvente é composta pela matriz que atua como suporte e pelo ligante responsável pela interação de adsorção. Entre as propriedades da matriz é importante que a matriz seja química e fisicamente estável para que possa resistir às condições durante o acoplamento com o ligante, à manutenção (regeneração, esterilização, etc.) e ao fluxo de líquido através da coluna. Finalmente, a substância da matriz deve permitir a produção de géis com uma porosidade controlada (Janson & Ryden, 1989). O ligante é imobilizado na fase sólida enquanto o contraligante (geralmente uma proteína) é adsorvido do extrato que esta passando na coluna cromatográfica. A força de interação entre o ligante e o contraligante é uma propriedade muito importante pois se for muito fraca não haverá adsorção e se for muito forte será difícil eluir a proteína adsorvida. Os principais tipos de materiais que compõem as matrizes de cromatografia de proteína são materiais inorgânicos tais como a sílica porosa, vidro com porosidade controlada, hidroxiapatita e polímeros orgânicos sintéticos tais como poliacrilamida, polimetacrilato, poliestireno, e polissacarídeos tais como celulose, dextrana e agarose.

O acoplamento do ligante à matriz geralmente é feito em três passos. Inicialmente a matriz é ativada pela introdução de grupos reativos. Em seguida o ligante é acoplado covalentemente a matriz pela reação com o grupo ativado. Finalmente a desativação do excesso de grupos reativos pelo bloqueio com uma substância com baixo peso molecular que possui baixa absortividade.

O processo de separação cromatográfico é simples, mas tem desvantagens tais como não utilizar completamente o leito adsorvente, consumir uma grande quantidade de dessorvente, requerer uma grande diferença no equilíbrio de adsorção entre os adsorbatos, e sua operação ser descontínua (Hashimoto *et al.*, 1983). Além do mais, apesar dos leitos empacotados maximizarem a resolução do produto, estes processos são limitados operacionalmente pela queda de pressão a altas taxas de fluxo e obstrução do leito quando

sólidos estão presentes (Gordon *et al.*, 1990a) sendo uma desvantagem especialmente relevante para operações em coluna, a necessidade de um fluxo de alimentação pré-tratado de baixa viscosidade e livre de impurezas sólidas (Pungor *et al.*, 1987).

II.1.2. Técnicas Cromatográficas

Uma separação de cromatografia típica consiste de quatro estágios: adsorção, lavagem, eluição e regeneração da coluna. O princípio da adsorção é transferir a substância de interesse da fase móvel para a fase estacionária. Para uma adsorção eficiente a coluna e a amostra devem estar equilibrados com o tampão contendo as condições ótimas para a ligação. A lavagem consiste da passagem de solução tampão para eliminação das impurezas. O estágio de eluição é o estágio onde ocorre a dessorção e a solução que a promove é chamada de eluente. A dessorção pode ser específica ou não. A eluição específica da proteína de interesse é o resultado de uma ação competitiva do eluente com o ligante. Um eluente que tenha uma afinidade maior pelo ligante do que a proteína alvo é escolhido, de forma a ele deslocar a proteína do ligante. O eluente pode então ser removido da matriz por uma limpeza posterior. A eluição não específica é promovida por agentes que enfraquecem as interações entre o ligante e a proteína, tais como mudanças de pH, concentração de sal, mudança de tempertatura.

Métodos de eluição não específicos, tais como elevação da força iônica, mudança no pH, ou adição de agentes caotrópicos, são econômicos e eficientes, especialmente para sistemas de alta afinidade onde poucas impurezas são co-adsorvidas (Clonis, 1987).

A regeneração tem como objetivo fazer com que o adsorvente retorne às condições iniciais de adsorção. O aspecto mais importante na regeneração é remover qualquer material ainda ligado ao adsorvente para que este possa ser reutilizado em uma outra adsorção. Se todo o material não for removido e o ligante não for adequadamente preparado, a eficiência do gel será prejudicada. Isto resultará em menos material ligado nas sucessivas corridas e uma concomitante perda na resolução. Com cuidados apropriados para não danificar o ligante ou alterar sua atividade, uma resina de afinidade pode ser usada múltiplas vezes. A quantidade de vezes que uma matriz pode ser usada depende da natureza da amostra, da estabilidade do ligante e das condições de eluição e limpeza utilizados. Em

alguns casos, altos níveis de sal causam alteração na conformação das proteínas. Se o ligante é uma proteína seu sítio ativo pode ser alterado, causando a perda parcial ou total de sua capacidade ou afinidade de ligação pela amostra (Deutscher, 1990).

II.1.3. Cromatografia de Afinidade

O princípio da técnica de separação por afinidade é ilustrada na Figura II-2. Inicialmente o material bruto é posto em contato com uma fase imobilizada, constituída de moléculas com afinidade pelo produto desejado, atadas firmemente a um suporte inerte. O produto desejado ligar-se-á à molécula atada ao suporte e ficará portanto adsorvido em uma fase imobilizada. Como a ligação é suficientemente forte, os outros compostos da mistura bruta podem ser lavados sem perda do adsorbato. Pela alteração das condições químicas ou fisicas, o adsorbato pode ser sequencialmente removido do adsorvente. Após a eluição, o adsorvente pode ser preparado para outro ciclo de operação (Chase, 1984a).



Figura II-2. Principais estágios de separações de afinidade (Chase, 1984a).

Entre as diversas técnicas de purificação, as que utilizam purificação por afinidade exploram as interações biológicas entre duas moléculas quando estas interagem reversivelmente para formar um complexo não-covalente forte. Tais interações incluem aquelas que ocorrem entre uma enzima e o seu substrato ou inibidor, um anticorpo e seu antígeno, hormônios e seus receptores, e aquelas interações entre sequências complementares presentes nos ácidos nucleicos (Chase, 1984b; Labrou & Clonis, 1994). Separações de afinidade são baseadas na formação seletiva e reversível deste complexo entre a substância a ser purificada e o ligante atado a um suporte adequado. Para ser útil para propósitos de separação, a constante de associação do complexo não deve ser muito baixa resultando em uma pequena capacidade de separação nem muito alta levando a problemas na recuperação da substância ativa e redução de vida do ligante.

Os ligantes podem ser extremamente seletivos, mas também podem ser específicos a grupos de moléculas. Estes dois tipos de interações têm se mostrado extremamente úteis na solução de muitos problemas de separação.

Um bom ligante de afinidade deve ser capaz de formar complexos reversíveis com a proteína a ser isolada ou separada; deve ter especificidade apropriada para a aplicação planejada; deve ter força de interação alta o suficiente para a formação de complexos estáveis ou para dar retardamento suficiente no procedimento cromatográfico; deve formar um complexo de fácil dissociação por uma simples mudança no meio, sem irreversibilidade que afete a proteína a ser isolada ou ele mesmo, o ligante deve ter propriedades químicas que permitam facilidade de imobilização em uma matriz (Janson & Rýden, 1989).

Um dos primeiros materiais usados com sucesso em coluna cromatográfica para separação de proteínas foi uma matriz trocadora de íons à base de celulose. Pó de celulose adequadamente tratado resulta em estruturas porosas nas quais as moléculas de proteína podem penetrar. Além do mais, a modificação da celulose com grupos carregados aumenta e estabiliza a porosidade como resultado da repulsão mútua entre as cargas. Tais materiais tem provado ser muito bons para cromatograria de troca iônica para proteínas, e são adsorventes amplamente usados. Outros adsorventes importantes, para trabalhos em coluna, são em geral baseados em biopolímeros como dextrose e agarose, e polímeros sintéticos também estão se tornando populares (Scopes, 1987).

Eupergit C, é um exemplo de matriz comercial macroporosa para imobilização de enzimas, de estabilidade mecânica excelente e com grande potencial para a produção industrial de substâncias de química fina e farmacêuticos. Esta matriz comercialmente disponível não apresentou fragmentação significativa após 650 ciclos em um reator tanque agitado com volumes de substratos maiores que 1000 litros (Katchalski-Katzir & Kraemer,

2000). Esta é uma matriz altamente compatível a reatores, já que pode ser usado em qualquer tipo de reator comum, tanque agitado ou leito fixo, equipado com uma peneira na base para reter as partículas. Não são necessários biorreatores especiais para Eupergit C.

II.1.4. Cromatografia de Interação Hidrofóbica

A cromatografia de interação hidrofóbica é uma técnica simples, com ampla aplicabilidade para separação de diversos tipos de proteínas embora seja menos seletiva que a cromatografia por afinidade. Em presença de sal, as proteínas são adsorvidas pelos grupos hidrofóbicos fixos na matriz. O tipo de ligante imobilizado (alquila ou arila) determina a seletividade da adsorção do adsorvente hidrofóbico. Com o aumento da concentração de sal, as interações hidrofóbicas aumentam de intensidade, aumentando a quantidade de proteína adsorvida. Em geral, a separação por interação hidrofóbica é eficiente pois a capacidade para proteínas é alta em comparação aos trocadores de íons e a adsorção ocorre apenas com a adição de sal tornando desnecessário a troca de tampão da amostra antes da aplicação na coluna. No entanto, a eficácia da interação hidrofóbica geralmente é reduzida se houver a presença de impurezas hidrofóbicas na alimentação. As proteínas são eluídas da matriz hidrofóbica por redução da força da ligação hidrofóbica através de mudanças na fase móvel, como a diminuição do teor salino, tipo de sal e pH (Taboada, 1999).

II.1.5. Cromatografia de Troca Iônica

O princípio de separação da cromatografia de troca iônica é a diferença de carga entre as moléculas. Os cátions ou ânions presentes em solução associam-se aos grupos funcionais da resina de acordo com sua carga. Como as proteínas possuem cargas distribuídas ao longo de sua estrutura e podem apresentar carga líquida positiva ou negativa, dependendo do seu pI e do pH do meio em que se encontram, as resinas trocadoras de íons podem ser utilizadas para adsorver proteínas. Os trocadores de ânions possuem grupos funcionais carregados positivamente e trocam os ânions presentes em solução por um número equivalente de contra-íons carregados negativamente enquanto que os trocadores de cátions possuem grupos funcionais carregados negativamente e trocam os cátions presentes em solução por um número equivalente de contra-íons carregados positivamente (Lucena, 1999).

II.1.6. Cromatografia Líquida de Afinidade de Alta Performance

A combinação de cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Cromatography - HPLC) e cromatografia de afinidade resultou em um técnica chamada de cromatografia líquida de afinidade de alta performance (High Performance Liquid Affinity Cromatography - HPLAC). Esta técnica combina a bioespecificidade da cromatografia de afinidade com o material de suporte robusto usado em HPLC. O resultado é uma técnica que apresenta especificidade, velocidade, e alta resolução. Esta técnica reduz o tempo de separação durante a aplicação, eluição e passos de lavagem (Ramadan & Porath, 1985; Sii *et al.*, 1990).

Tem havido considerável interesse na aplicação de técnicas de cromatografia líquida de alta performance nas separações por cromatografia de afinidade (Larsson *et al.*, 1979). A maioria das técnicas de HPLC requer o uso de partículas muito menores com uma significante queda de pressão ao longo do leito cromatográfico. Suportes adequados para o uso em métodos de HPLC devem possuir uma estrutura rígida suficiente para ser capaz de resistir a altas pressões (Chase, 1984a). Embora os métodos de HPLC sejam conduzidos normalmente em pequena escala e sejam adequados para técnicas analíticas ou procedimentos de purificação em escala de laboratório, estudos estão sendo feitos para aumentar a escala. Possivelmente o tempo de ciclo rápido capacitaria uma unidade pequena para processar volumes consideráveis de material e tal unidade poderia ter vantagens sobre o sistema de baixa pressão convencional.

II.1.7. Cromatografia de Leito Fluidizado & Cromatografia de Leito Expandido

Na literatura os termos cromatografía de leito fluidizado e cromatografía de leito expandido muitas vezes são utilizados para definir o mesmo processo. Adsorção em leito fluidizado ou expandido é particularmente adequada para captura de produtos solúveis de alimentações contendo material particulado ou sólidos coloidais, e aqueles com alta

viscosidade. Nestes processos pode-se combinar em uma única operação dois passos geralmente presentes em processos de purificação de proteínas que é a cromatografia em leito empacotado e a clarificação que a precede.

A cromatografia em um leito expandido estável capacita a recuperação de proteínas diretamente do cultivo de microrganismos ou células e preparados de células rompidas, sem a necessidade de uma remoção prévia dos sólidos suspensos. A performance geral de um leito expandido é comparável a de um leito empacotado devido a dependência da expansão do leito com o tamanho e densidade das partículas adsorventes bem como com a viscosidade e a densidade da solução estoque. Assim a cromatografia de leito expandido permite integrar a separação sólido-líquido, a redução do volume pela adsorção da proteína e purificação parcial em uma unidade de operação sem comprometer a eficiência de separação, economizando consideravelmente o tempo de processamento e capital de investimento (Anspach *et al.*, 1999).

A Figura II-3 apresenta algumas denominações de processos de purificação em leito de coluna segundo o grau de mobilidade das resinas de adsorção.



Figura II-3. Da esquerda para a direita a representação esquemática dos modos de operação de adsorção de proteína em leito de coluna em (a) recipiente com mistura, (b) leito fluidizado, (c) leito expandido e (d) leito empacotado.

II.1.8. Leito Fluidizado Estabilizado Magneticamente

Uma configuração interessante para providenciar fluxo contra corrente no leito fluidizado é o leito fluidizado estabilizado magneticamente (LFEM). Ao contrário do leito fluidizado padrão, a dispersão e retro mistura do adsorvente não ocorre, quando o campo magnético alinha as partículas adsorventes magnéticas e evitando mistura. O processo opera em dois estágios diferentes e está representado esquematicamente na Figura II-4. No centro do leito do primeiro estágio é feita a alimentação da mistura. A proteína desejada adsorve nas partículas da fase sólida contendo o ligante de afinidade, e todas as impurezas movem-se para o topo da coluna com o fluxo de solvente. A fase sólida que move-se contra corrente ao solvente, é coletada na saída e alimentada a um segundo LFEM onde um solvente que promove a dessorção é empregado. As partículas de adsorvente sólido coletadas na saída do segundo LFEM são recicladas para o primeiro LFEM (Gordon *et al.*, 1990a).



Figura II-4. Processo contínuo de separação usando leito fluidizado estabilizado magneticamente

O leito fluidizado estabilizado magneticamente, permite o contato sólido-fluido eficiente. O borbulhamento e mistura que ocorrem normalmente em um leito fluidizado são eliminados, e o contato contra-corrente contínuo é possibilitado. Esta técnica é adequada especialmente para separações bioquímicas, onde fragmentos de células obstruiriam um leito fixo comum (Burns & Graves, 1985).

II.1.9. Cromatografia de Leito Móvel de Fluxo Pistonado

A cromatografia de leito móvel de fluxo pistonado consiste de uma coluna equipada com um jato na base e entradas e saídas ao longo do comprimento da coluna (Figura II-5). Cada entrada e saída contém uma tela com tamanho apropriado para evitar a passagem da resina adsorvente. Durante a operação a natureza empacotada da coluna é mantida. Isto é executado por um pistão hidráulico no topo da coluna o qual evita a fluidização do leito, e a resina move-se para baixo do leito devido a ação do jato na base da coluna. A resina é retornada no topo do leito em um reciclo externo, para completar o ciclo contínuo. A coluna deve ser mantida em balanço hidráulico em todos os tempos para evitar a fluidização e fluxo concorrente da corrente de líquido e resina. Os benefícios deste projeto é a operação contra-corrente real, sem nenhuma retro-mistura e baixa queda de pressão já que não há necessidade de mover grandes quantidades de resina em tempos curtos; mas a resina se move constantemente a taxas de fluxo moderadas. Similares a operação em leito fixo, este tipo de coluna é suscetível ao entupimento e não pode utilizar alimentações contendo altas concentrações de sólidos suspensos. Além disso, o projeto mecânico e protocolos de operação são complexos, e assim sujeito a falhas (Gordon *et al.*, 1990a).



Figura II-5. Cromatografia de leito móvel de fluxo pistonado.

II.1.10. Leito Móvel Verdadeiro & Leito Móvel Simulado

A operação de uma unidade de leito móvel pode ser melhor entendida examinando de um modo dinâmico, o fenômeno de eluição cromatográfica em batelada. Considere uma única coluna cromatográfica e duas espécies, o componente A e o componente B, tendo maior e menor afinidade pela fase estacionária, respectivamente. Um pulso de uma mistura de A e B diluída na fase móvel é alimentada na coluna. Como resultado de suas afinidades diferentes, A e B movem-se mais lento e mais rápido, respectivamente, ao longo da coluna e se a coluna for longa o suficiente os componentes serão coletados separadamente na saída da coluna (Figura II-6) (Juza *et al.*, 2000).



Figura II-6. Coluna cromatográfica única. A espécie mais retida *A* move-se mais lentamente do que a espécie menos retida *B*.

Se as partículas sólidas de adsorvente fluírem ao longo da coluna contracorrente ao fluxo de fluido, a uma velocidade que torne a taxa de propagação de $A \in B$ negativa e positiva, respectivamente e se $A \in B$ puderem ser continuamente alimentados no meio da coluna, o perfil de concentração se desenvolve (Figura II-7), e amostras puras de $A \in B$ podem ser coletadas no extrato e refinado, respectivamente.



Figura II-7. Coluna cromatográfica contracorrente contínua. O fluxo de partículas sólidas flui contracorrente a fase fluida. A mistura *A* e *B* a ser separada é alimentada no meio da coluna e os dois componentes são coletados puros nas duas portas de retirada.

No leito móvel verdadeiro são usadas quatro zonas contracorrente similares aquela da Figura II-7, cada uma tendo uma função específica na separação (Figura II-8). A mistura a ser separada é alimentada entre as zonas dois e três onde A e B são separados. A espécie mais retida A e a menos retida B são coletados no extrato e no refinado, respectivamente. Na cromatografia clássica, um perfil de eluição é estabelecido em uma coluna quando uma alimentação bi-componente é injetada e eluída ao longo da coluna com a fase móvel. Os picos devem ser completamente resolvidos para obter produtos de alta pureza. Do ponto de vista conceitual, o perfil de eluição pode ser "mantido" fixo se a fase sólida se mover em uma direção e a fase móvel em outra direção. Se a alimentação é introduzida continuamente no meio da coluna, o perfil de concentração pode ser mantido, e as bandas são espalhadas ao longo de toda a coluna. Embora os perfis sejam apenas parcialmente resolvidos, produtos de alta pureza podem ser coletados em cada extremo das colunas.



Figura II-8. Unidade de leito móvel verdadeiro de quatro zonas. Cada zona compreende uma coluna cromatográfica contracorrente contínua e tem uma função específica na separação de $A \in B$.

No adsorvedor de leito móvel de quatro zonas a amostra da solução incluindo os componentes A e B é alimentado entre as zonas dois e três (Figura II-9). O componente A é recuperado no ponto de extração situado entre as zonas três e quatro com solvente de eluição suprido no ponto de dessorção situado entre as zonas quatro e um. A zona um funciona para adsorção do componente B bem como a regeneração do solvente. O componente B prossegue para a zona um com o fluxo de líquido por causa da menor adsorção na resina. O componente B pode ser recuperado no ponto de refinado situado entre as zonas um e dois (Hashimoto *et al.*, 1993).



Figura II-9. Diagrama esquemático do adsorvedor de leito móvel simulado de quatro zonas (adaptado de Hashimoto *et al.*, 1993).

Na operação do leito móvel, as partículas de resina se movem dentro da coluna e o fluxo contracorrente é difícil de se obter. Algumas partículas de resina frequentemente se quebram por causa da fricção entre as partículas e não fluem uniformemente na seção transversal da coluna. Portanto, na prática o movimento de sólidos é simulado usando leitos fixos (colunas cromatográficas) e movendo periodicamente as entradas e saídas das unidades na mesma direção do fluxo de líquido. A idéia do leito móvel simulado é baseado na eluição cromatográfica e pode ser compreendida usando os princípios cromatográficos. Isto é ilustrado na Figura II-10, onde o movimento contínuo do sólido na unidade de leito móvel verdadeiro é simulado de um modo discreto. Com o intuito de imitar aproximadamente este movimento, cada zona na unidade de leito móvel verdadeiro é dividida em diversas sub-zonas. Neste caso há um total de oito sub-zonas, que é um número típico para aplicações em pequena escala.

Assim, para facilidade de operação, ao invés de uma coluna infinita, a coluna é dividida em seções, o qual consiste de um número de colunas individuais. O número de leitos dentro de cada seção e o número total de colunas são ajustáveis. No entanto, sistemas com um número de colunas muito grande tornam o sistema de purificação complexo e caro. Na literatura geralmente são encontrados sistemas de até doze colunas e o número de colunas em cada zona não precisa necessariamente ser igual.



Figura II-10. Unidade de leito móvel simulado de quatro zonas. Com o intuito de fazer o movimento discreto mais próximo do movimento contínuo, cada zona da unidade de leito móvel verdadeiro é dividido em sub-zonas; neste exemplo estão presentes duas sub-zonas.

A fase estacionária e a fase móvel se movem simuladamente em direções opostas devido ao movimento das válvulas rotativas. Este conceito é a base da operação contracorrente contínua em um leito móvel simulado. Se o movimento da fase estacionária é interrompido, o perfil se move ao longo da coluna, e os pontos de alimentação e retirada não estarão mais na posição correta. Para compensar, os pontos de alimentação e retirada devem ser movidos continuamente, ou indexados, para manter o perfil. Ao invés de mover os pontos de alimentação e retirada continuamente, estes são indexados em pontos discretos (Gattuso, 1995). Como mostrado na Figura II-11, uma coluna longa empacotada é dividida em diversas pequenas colunas que são conectadas em série. Os pontos de entrada e saída das matérias-primas, solução eluente e produtos são mudados para a próxima coluna na direção do fluxo de líquido, resultando em um fluxo contracorrente do líquido e a resina (Hashimoto *et al.*, 1993). As válvulas rotativas mudam cada ponto de entrada e saída e o perfil de concentração é mantido, e dois produtos podem ser continuamente retirados.


Figura II-11. Adsorvedor de leito móvel simulado com quatro zonas e oito colunas (adaptado de Hashimoto *et al.*, 1993).

As taxas de fluxo de líquidos externas que entram e saem no leito móvel simulado são constantes, como é o intervalo de tempo entre os passos das válvulas. Para manter o balanço desejado das taxas de fluxo de líquido em cada zona, as bombas de circulação são programadas para bombear em quatro taxas distintas de fluxo, as quais correspondem às zonas individuais. As taxas de bombeamento mudam quando as válvulas rotativas causadas pela circulação das bombas cruzam as zonas de fronteira. As correntes de extrato e refinado são continuamente retirados pelas válvulas rotativas.

Quando um solvente diferente para a zona de dessorção (zona quatro) é usado, temos o leito móvel de três zonas representado esquematicamente na Figura II-12. O adsorvente se move da esquerda para a direita. A amostra da solução é alimentada continuamente no ponto de alimentação situado entre as zonas dois e três. O componente menos adsorvido, B, se move com o fluxo de líquido no sentido esquerdo e pode ser recuperado do lado esquerdo da zona dois. Por outro lado, o componente fortemente adsorvido, A, se move com o adsorvente através da zona três para a zona quatro. O componente A pode ser recuperado do lado esquerdo da zona quatro pela eluição com uma grande quantidade de adsorvente ou pelo aumento da temperatura na zona quatro (Hashimoto *et al.*, 1993).



Figura II-12. Diagrama esquemático do adsorvedor de leito móvel de três zonas ou adsorvedor de leito móvel simulado (adaptado de Hashimoto *et al.*, 1993).

Uma desvantagem do leito móvel simulado, é que ele requer vedação mecânica móvel complexa, cara, e válvulas automáticas para operar. Além disso, o risco de contaminação é alto quando o sistema envolve biomateriais (Burns & Graves, 1985).

Um adsorvedor móvel simulado foi usado pela primeira vez na indústria pela companhia Universal Oil Products (UOP) chamado sistema Sorbex (Broughton 1961; Broughton *et al.*, 1970). Adsorvedores de leito móvel simulado têm sido empregados para recuperar *n*-parafinas de nafta de baixo peso molecular, para separar p-xileno de hidrocarbonetos C₈, e para produzir açúcar de frutose concentrada pela conversão de açúcar. A tecnologia do leito móvel simulado tem enorme potencial de aplicação em problemas de separação encontrado nas áreas farmacêuticas e de química fina. As vantagens inerentes da operação contínua são um aumento na flexibilidade do processo, baixos custos operacionais e alta qualidade do produto. Com a tecnologia UOP Sorbex de leito móvel simulado, alta pureza pode ser obtida simultaneamente com alta recuperação. Misturas racêmicas são bem adequadas para separação por tecnologia de LMS porque a alimentação é essencialmente um sistema bi-componente.

O número de colunas em cada zona pode variar, no entanto sistemas com um número de colunas muito grande tornam o sistema de purificação complexo e caro. Na literatura geralmente são encontrados sistemas de até doze colunas e o número de colunas em cada zona não precisa necessariamente ser igual. Os líquidos usáveis nestes sistemas incluem solventes orgânicos, por exemplo, álcoois tais como metanol, etanol e isopropanol, hidrocarbonetos tais como hexano, etc., solventes orgânicos misturados consistindo de hidrocarbonetos e álcoois, ésteres ou éteres, e soluções aquosas contendo sal tal como sulfato de cobre, solução de ácido fosfórico, etc. O líquido dessorvente atualmente usado é escolhido de acordo com o tipo do componente ou composto a ser separado (Broughton, 1961).

Os fluidos de alimentação que podem ser tratados neste sistema de separação não são sujeitos a qualquer restrição específica. Eles incluem vários tipos de compostos usados no campo da medicina, farmácia, alimentos, perfumes. Entre outros fluidos que podem ser separados por este sistema estão misturas de compostos que possuem pontos de bolha próximos, por exemplo, um componente normal e seu isômero, como no caso de hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e cetonas, soluções aquosas contendo dextrose, frutose, e misturas de maltose e polissacarídeos tal como maltotriose ou sacarídeos com maior peso molecular (Broughton, 1961).

II.1.11. Cromatografia de Anel Rotatório & Cromatografia Anular Contínua

Na cromatografia de anel rotatório a fase estacionária é empacotada em um espaço anular formado por dois cilindros concêntricos. O aparato é rotacionado lentamente e o leito anular é uniformemente suprido com eluente. O tubo de alimentação não roda, enquanto a alimentação é introduzida continuamente em um ponto fixo no topo do leito (Figura II-13). Assim como na coluna em batelada a alimentação é conduzida através do leito pela fase móvel. O movimento do adsorbato será axial devido ao fluxo de eluente e tangencial devido a rotação do anel. Estes dois efeitos com as afinidades diferentes dos componentes pela fase estacionária fazem com que os componentes apareçam como bandas helicoidais com pontos de saída estacionários característicos.

O sistema de cromatografia de anel rotatório se assemelha à corrente cruzada já que a fase móvel desloca-se do topo para a base do reator enquanto o anel da coluna empacotada gira. Tal sistema com uma alimentação e portas de efluente estacionária pode aceitar um fluxo de alimentação contínua e separá-la em uma série de fluxos constituintes que aparecem como bandas helicoidais separadas no anel. As diferenças no tempo de detenção dos componentes da alimentação são traduzidos em deslocamentos físicos, resultando na retirada individual de cada componente. Apesar da cromatografia anular ser um processo cromatográfico contínuo promissor, sua operação é complexa e sujeita a problemas. Estes cromatógrafos entopem tão facilmente quanto colunas convencionais, e assim, os fluxos de alimentação devem ser pré-tratados. Além disso, a produtividade volumétrica é similar às obtidas em colunas padrão. Estes sistemas são operados continuamente em aplicações tais como filtração a gel onde a mudança das condições do meio entre aplicação da amostra, adsorção, eluição e regeneração não é necessária. Muitas cromatografias de proteína de afinidade e troca iônica requerem uma mudança nas condições de eluição do componente, e nesses casos as vantagens do processamento contínuo podem não ser obtidas usando este sistema (Gordon *et al.*, 1990a).



Figura II-13. Visão conceitual da cromatografia anular contínua.

II.2. Processos Não Cromatográficos

II.2.1. Fita Móvel

Um método para a purificação de biomoléculas em uma base de fluxo contínuo usando adsorção por afinidade, foi concebido. O ligante de afinidade é atado a uma fita de náilon a qual é passada sequencialmente através de quatro tambores nos quais flui o estoque de alimentação, meio de lavagem, eluição e regeneração. A representação esquemática deste sistema de purificação contínuo é apresentado na Figura II-14. Todos os quatro processos ocorrem simultaneamente em diferentes porções da fita quando ela progride através dos tambores. A solução estoque e o eluente são passados através de seu respectivo tambor resultando em uma transferência contínua da proteína alvo. O objetivo desta estratégia é facilitar a rápida reciclagem do ligante pelo uso em um material suporte robusto e barato. O composto alvo desta forma é removido do fluxo de alimentação e dessorvido em um fluxo contínuo de eluente (Niven & Scurlock, 1993).



Figura II-14. Diagrama esquemático do aparato usado para adsorção de afinidade contínua (adaptado de Niven & Scurlock, 1993).

II.2.2. Bolsa Adsorvente Móvel

Hughes & Charm (1979) operaram continuamente este processo de adsorção pelo transporte de suportes semelhantes a saquinhos de chá, usando uma fita móvel, através de uma série de quatro tambores. Desta forma, a adsorção, lavagem, eluição e regeneração são sequencialmente conduzidos de uma forma contínua. Os autores notaram que a cinética de adsorção foi extremamente lenta devido ao longo tempo requerido para a difusão da proteína para dentro e para fora da bolsa adsorvente. Além disso, o desvio de fluido pode ser um sério problema. O trabalho experimental foi executado em sistemas "limpos", e a habilidade de operar com alimentados brutos não foi demonstrada.

II.2.3. Processos Extrativos

A extração de proteínas através de sistemas líquido-líquido pode receber diversas nomenclaturas, entre elas sistema bifásico aquoso, extração polimérica aquosa, extração em micela reversa, extração bifásica líquida, separação por partição. Estes processos extrativos são processos em grande escala utilizados nas indústrias químicas e de antibióticos. Procedimentos de extração líquida oferecem alta capacidade e facilidade de aumentar a escala e operar continuamente. Estes sistemas de recuperação e purificação de proteína promovem a partição diferencial da proteína e impurezas em duas fases aquosas distintas. Em extração polimérica aquosa, a partição ocorre entre fases de diferentes concentrações de polímeros. A partição em micelas reversas ocorre entre as fases orgânica e aquosa; estas fases são separadas pelo surfatante o qual forma as micelas (Gordon *et al.*, 1990a).

Extração polimérica aquosa para extração de proteína em grande escala tem sido extensivamente estudada. Esta técnica é interessante quando é possível extrair diretamente proteínas dos fragmentos de células, ou separar proteínas dos ácidos nucleicos, polissacarídeos, ou outras proteínas. Embora os sistemas solventes mais comumente usados sejam soluções aquosas de polietilenoglicol (PEG) e dextran, ou PEG e sais, alternativas menos caras ao dextran, incluindo dextran bruta, goma de hidroxipropil e maltodextran também têm sido estudadas. Os parâmetros de partição do soluto incluem pH, temperatura, propriedades da superfície da proteína, tipo de polímero e iôns usados e concentração do polímero e sais (Gordon *et al.*, 1990a). Devido a alta concentração de água destes sistemas eles não causam desnaturação das proteínas. Este sistema tem as seguintes vantagens: operação sob condições brandas e não desnaturantes, boa seletividade, facilidade de aumento de escala, rápida transferência de massa, baixo consumo de energia, e possibilidade de operação em um modo contínuo (Alves & Meirelles, 1998).

Micelas reversas são agregados de moléculas surfatantes em um solvente orgânico circundando um centro aquoso. Os grupos da cauda hidrofóbica do surfatante estão em contato com a fase orgânica no seio exterior, enquanto o grupo cabeça hidrofílico contata o ambiente aquoso interior. As proteínas podem ser particionadas nas micelas com alguma seletividade pelo ajuste do pH, força iônica e tipo de sal, tipo e concentração de surfatante, e solvente orgânico usado (Gordon *et al.*, 1990a). Enquanto a habilidade de isolar e recuperar enzimas ativas em micelas reversas tem sido demonstrado para diversas proteínas, poucas aplicações comerciais tem sido propostas.

II.2.4. Extração Bifásica Aquosa Contínua

Hustedt *et al.* (1983) desenvolveu um processo bifásico, envolvendo uma série de misturadores e decantadores mostrados na Figura II-15. Polietilenoglicol (PEG) e sais são injetados em uma corrente de alimentação de células rompidas. A mistura é homogeneizada num primeiro misturador e segue para um separador. A fase inferior contendo os fragmentos de células e a maioria das impurezas é descartada e a fase superior contendo o produto é colocado em um recipiente de retenção. De lá, ela é bombeada a um segundo misturador, junto com uma segunda solução de sal. Um segundo separador gera uma fase inferior rica em sal, contendo o produto, e uma fase superior de PEG a qual pode ser reciclada se necessário. Eles demonstraram que a extração de aspartanase poderia ser feita continuamente com aproximadamente a mesma eficiência do processo batelada correspondente, mas em um tempo consideravelmente mais curto (Gordon *et al.*, 1990a).



Figura II-15. Purificação contínua de proteína por extração (Hustedt et al., 1983).

II.2.5. Sistema Bifásico Aquoso com Afinidade

Como já foi relatado anteriormente quando soluções aquosas de dois polímeros de alto peso molecular, dextran e polietilenoglicol (PEG), por exemplo, são misturados e então deixados assentar, duas fases podem ser formadas dependendo dos pesos moleculares dos polímeros, das concentrações e da temperatura. A seletividade deste sistema pode ser aumentada quando parte do PEG é substituído por PEG com ligante de afinidade imobilizado pois a proteína alvo se liga ao conjugado PEG-ligante e parte seletivamente para a fase superior rica em PEG, levando à purificação (Labrou & Clonis, 1994). Este

sistema também chamado de partição de afinidade combina aspectos de métodos adsortivos e extrativos. Partição de afinidade é uma tecnologia de purificação considerada barata. Em micelas reversas a adição de um surfatante bioespecífico, assim como na partição por afinidade, também pode aumentar significativamente a seletividade na proteína desejada (Gordon *et al.*, 1990a).

II.2.6. Separação em Emulsão de Perfluorcarbonos de Afinidade

Um método de afinidade usando suportes de fluorcarbonos líquidos tem a alta especificidade dos suportes sólidos e as vantagens mecânicas (transportabilidade) do sistema líquido-líquido. O suporte líquido é feito de ligantes de afinidade perfluoralquilados imobilizados na superfície de gotas líquidas de perfluorcarbono da ordem de dezenas de microns de diâmetro. As gotas líquidas de fluorcarbono suportam o ligante enquanto o ligante age como surfatante para estabilizar as gotas. Estes suportes têm baixa solubilidade em solventes aquosos e orgânicos e densidade entre 1,6 e 2,2 g/ml (Chang *et al.*, 1993). As vantagens de suportes líquidos de fluorcarbonos são que eles são química e biologicamente inertes e exibem ligação não específica ao suporte desprezível (Sii *et al.*, 1991).

Os macroligantes solúveis não requerem moléculas espaçadoras as quais são frequentemente necessárias em matrizes insolúveis. O ligante solúvel é provavelmente menos vulnerável à degradação por atrito e compressão, um sério problema que tem sido verificado em cromatografia convencional, onde matrizes de afinidade são empacotadas na coluna (Luong *et al.*, 1988).

Chang et al. (1993) projetaram e construíram uma unidade misturadora de quatro estágios denominada reator de emulsão de perfluorcarbono para separações de afinidade contínua (Perfluorocarbon Emulsion Reactor for Continuous Affinity Separations, PERCAS) com uso potencial para purificação contínua de proteína. Cada um dos quatro estágios consiste de um tanque de mistura para contatar a emulsão de afinidade de onde o fluxo de líquido é alimentado a um tanque de sedimentação adjacente no qual a fase densa de emulsão assenta antes de ser transportada para o próximo estágio (Figura II-16). Este sistema foi utilizado para purificação de soroalbumina humana (SAH) do plasma. O plasma é alimentado no primeiro tanque onde entra em contato com a fase em emulsão que adsorve

especificamente a SAH.; qualquer proteína não ligada aparece no topo da fase do decantador e são conduzidos pelo fluxo. Após irem ao segundo estágio, as proteínas não ligadas são lavadas e a emulsão vai para o estágio de eluição onde um agente de eluição dessorve a SAH. A soroalbumina humana dessorvida é coletada no topo do decantador (fração eluída), e a fase em emulsão é transportada para ao último estágio onde o eluente residual é lavado antes da emulsão ser reciclada ao primeiro estágio (Figura II-16).



Figura II-16. Princípio de operação de separação de afinidade contínua usando PERCAS.

Uma das vantagens deste processo é a possibilidade de obter um produto com elevada pureza e redução da quantidade de células contidas na alimentação. A unidade PERCAS, em um único passo foi capaz de separar SAH tanto das células quanto dos seus constituintes sendo coletada 87% pura e o conteúdo das células no escoamento de eluição foi reduzido em 94%. O aumento do espaçamento no leito expandido permite o processamento de soluções contendo partículas pois estas podem passar através dos vazios do leito (Chang *et al.*, 1993).

II.2.7. Extração Contracorrente Contínua

Um experimento de extração de malato dehidrogenase (MDH) contracorrente contínuo em quatro estágios em série foram conduzidos usando recipientes de contato ilustrado na Figura II-17. Esta extração contracorrente contínua em quatro estágios pode ser usada para extrair proteínas de soluções contendo particulados (tais como caldos de fermentação ou preparados de células rompidas) de forma contínua, e fornece fluxos clarificados do produto purificado (Owen *et al.*, 1997). Adsorventes desenvolvidos neste tipo de unidade de contato foram baseados em polivinil álcool coberto de perfluorcarbono derivatizado com ligantes de afinidade tais como corantes de triazina. Perfluorcarbono é uma molécula sintética constituída somente de carbono e fluor, e é caracterizada como sendo extremamente estável tanto química quanto biologicamente.



Figura II-17. Ilustração esquemática do contator contra corrente.

A expansão na base da coluna (Figura II-17) serve para reduzir drasticamente o grau de fluidização no ponto onde o adsorvente é removido. Isto assegura que a fração de vazios entre as partículas adsorventes seja baixa, para minimizar as perdas da solução de entrada do processo que é removida com o adsorvente. No estágio de adsorção, isto minimiza a perda da alimentação que acaba de entrar no processo.

Os recipientes de contato foram arranjados conforme a Figura II-18. Para alcançar maiores gradientes de transferência de massa, cada um dos quatro estágios associados com o tratamento do material adsorvente é projetado para operar contracorrente. Os reatores são arranjados em série em um circuito fechado para o carregamento, lavagem, eluição, e regeneração do adsorvente. A adsorção da proteína alvo acontece no estágio de carregamento, e então é conduzido como um produto no eluente. O estágio de lavagem serve para lavar o material particulado e as proteínas fracamente ligadas ao adsorvente, e o estágio de regeneração serve para reequilibrar o adsorvente em um tampão de adsorção.



Figura II-18. Arranjo esquemático contra corrente dos quatro estágios.

O procedimento inicial consiste de fluidizar o adsorvente em todos os quatro estágios até que as alturas do leito expandido alcance o estado estacionário. O adsorvente é continuamente carregado, lavado, eluído, e regenerado de uma maneira cíclica.

O processo foi operado, com o objetivo de extrair continuamente MDH de um fluxo de alimentação de homogenato bruto, liberando-o para o fluxo de eluição, até que o estado estacionário aproximado de hidrodinâmica e composição tenha sido alcançado ao longo do sistema. Devido ao fluxo ascendente das correntes de entrada do processo, cada coluna se comporta essencialmente como um leito expandido, na qual as partículas adsorventes são fluidizadas. Neste sistema, a remoção de adsorvente na base do leito resulta em um movimento descendente do material adsorvente. A fase contínua (solução do processo, eluente, etc.) é alimentado na base da coluna através do disco sinterizado e flui (aproximadamente de forma pistonada) ascendentemente contra as partículas em queda. Ela é removida do topo da coluna, logo acima do nível do leito expandido (Owen *et al.*, 1997).

II.2.8. Filtração com Membranas

Uma membrana é definida como uma barreira capaz de ser seletivamente permeável por alguns componentes de uma mistura ou, pelo menos, de mudar a composição de uma corrente de fluido que flui através dela devido a uma certa força motriz (uma pressão, concentração, ou um gradiente de potencial elétrico) (Saracco & Specchia, 1994).

Ultrafiltração conjuntamente com o processo de hiperfiltração ou osmose reversa constituem os primeiros processos contínuos de separação molecular que não envolvem uma mudança de fase ou transferência de massa na interface, sendo estas duas características importantes responsáveis pelo grande interesse de profissionais nas áreas alimentícia, farmacêutica e biológica. Os processos com membranas são operados a temperatura ambiente e podem ser aplicados no fracionamento de misturas envolvendo substâncias termo sensíveis. Os processos com membranas apresentam, ainda, a vantagem de serem extremamente simples do ponto de vista operacional e em termos de facilidade de aumento e operação em grande escala. A tecnologia de membranas já está em operação em grande escala em certas aplicações. Uma desvantagem de separação por membrana é a inabilidade de separar proteínas de tamanhos próximos. Estes sistemas são utilizados para separar moléculas com diferenças de tamanho maiores que dez vezes. O entupimento, também é uma das limitações da tecnologia de membranas.

II.2.9. Filtração de Afinidade

Novas tecnologias para separação têm surgido com a utilização da tecnologia de membranas juntamente com o uso de adsorção de afinidade. A técnica de filtração de afinidade, como o próprio nome indica, é a fusão de dois processos de separação, a adsorção de afinidade e a filtração.

O princípio da filtração de afinidade é um aumento da seletividade da membrana devido ao efeito de um macroligante de afinidade capaz de efetuar uma ligação seletiva e reversível com a proteína alvo. O ligante de afinidade é acoplado a um polímero ou micropartícula que não permeia através da membrana (Figura I-1). A membrana tem poros grandes o suficiente para permitir a passagem de todas as substâncias indesejadas bem como a proteína alvo, mas não do macroligante de afinidade. Quando a amostra bruta é filtrada na presença do macroligante de afinidade, apenas a proteína alvo forma um complexo com o macroligante e fica retida. A substância alvo é adsorvida pelo ligante e fica retida pela membrana enquanto outras substâncias da mistura que não são adsorvidas, permeiam através da membrana e são eliminadas. Após esta lavagem o complexo ligante-adsorbato isolado é então tratado com um eluente apropriado para dessorver o adsorbato do ligante. A proteína alvo dessorvida passa através da membrana e é coletada. O macroligante fica retido pela membrana e é reciclado e recondicionado se necessário (Labrou & Clonis, 1994).

A alta resolução e recuperação com a filtração de afinidade de fluxo cruzado junto com sua capacidade para processar não clarificados e caldos viscosos indicam seu grande potencial para processamento "downstream". A técnica pode ser usada para purificar qualquer substância bioquímica de um caldo de fermentação (Luong *et al.*, 1987a).

A técnica de filtração de afinidade é uma técnica de purificação muito potente pois combina a especificidade da adsorção de afinidade com a alta produtividade da ultrafiltração (Ghosh *et al.*, 1996). Uma vantagem da filtração de afinidade é que esta técnica pode separar substâncias que podem ter tamanhos próximos, mas com afinidades diferentes ao ligante. Esta técnica também é denominada na literatura como ultrafiltração de afinidade de fluxo cruzado ou ultrafiltração de fluxo tangencial.

O termo filtração em membrana de afinidade é usado algumas vezes quando o acoplamento do ligante é feito diretamente na membrana de filtração. Embora as membranas microporosas tenham sido inicialmente destinadas para serem usadas como meio de filtração, as altas razões de área por volume disponível têm permitido seu uso alternativo como um suporte eficiente para imobilização de ligantes. O componente central da tecnologia de filtração em membrana de afinidade é a fixação covalente de um ligante de afinidade em uma membrana microporosa de fibra oca, usada como suporte. A corrente de alimentação percorre o interior do espaço livre da fibra cujos poros são grandes o suficiente $(0,5-1,0 \ \mu m)$ para permitir fluxo convectivo através de seu corpo. Enquanto ocorre a ligação da proteína alvo ao ligante imobilizado, as substâncias não ligadas passam através da membrana e são coletados na superfície exterior. Esta tecnologia tem uma vantagem

importante, particularmente para aplicações em escala industrial, que é a não necessidade de remoção de sólidos do fluxo de alimentação. Isto possibilita que sejam executadas simultaneamente a separação sólido-líquido e a purificação do produto (Labrou & Clonis, 1994).

Uma limitação tecnológica para o uso de filtração de afinidade de fluxo cruzado é a necessidade de membranas adequadas em termos de peso molecular de corte, fluxo, tempo de vida de operação, etc. Hoje, entretanto, as membranas são produzidas com alta resistência a ácidos, bases, alcóois, e altas temperaturas, características que permitem limpezas muito efetivas. Também há a possibilidades de fabricação de membranas com peso molecular de corte entre 10^5 a 10^6 gmol, uma região de grande interesse para a separação de proteínas. Para um desenvolvimento satisfatório da filtração de afinidade de fluxo cruzado, a membrana deve exibir (Luong *et al.*, 1987b) alta permeabilidade hidráulica para o solvente (água); variação de peso molecular de corte estreita; boa durabilidade mecânica, estabilidade química e térmica; alta resistência ao entupimento; facilidade de limpeza e esterilização; e vida longa.

Uma das desvantagens deste processo é que com o andamento do processo pode haver uma redução na taxa de permeação devido a retenção de material sobre a superfície da membrana, fenômeno conhecido como polarização por concentração, bem como, a adsorção das enzimas no material da membrana. No entanto, após uma lavagem na membrana o fluxo retorna aos valores iniciais.

A interação entre o macroligante e a membrana é uma característica importante. A adsorção do macroligante na membrana pode resultar em uma redução significativa na taxa de permeação e pode formar uma membrana dinâmica com característica própria de rejeição. Este problema pode ser contornado pela adição de cargas eletrostáticas na membrana e/ou no macroligante (Luong *et al.*, 1987b).

II.2.10. Reator de Leito Fluidizado Adsortivo Contracorrente

Wielen (1997) avaliou configurações possíveis do sistema de Reator Adsortivo Contracorrente (Counteercurrent Adsorptive Reactor – CAR) para bioconversões. O sistema modelo selecionado foi a deacilação enzimática de benzil penicilina (Pen G) produzindo o intermediário farmacêutico chave ácido 6-amino penicilânico (6-APA) e o bioproduto fortemente inibidor ácido fenil acético (PhAc). A liberação de PhAc diminui a taxa de reação diretamente via inibição e indiretamente via diminuição de pH. Além disso, tanto o reagente (Pen G) e o produto desejado (6-APA) decompõem-se sob redução de pH. O perfil axial de pH neste reator é coletado por transporte contracorrente de partículas trocadoras de íons densas e carregadas de OH⁻. As partículas trocadoras de íons são, até certa extensão, seletivas ao ácido fenil acético, levando à neutralização.

O conceito de reator-separador não está restrito à produção de ácido 6aminopenicilânico, o qual foi investigado por Wielen (1997). Um campo interessante pode ser a sorção seletiva de produtos unidos de pequenas moléculas, tais como peptídeos pequenos ou antibióticos semi-sintéticos. O rendimento de síntese geralmente é baixo para estas reações mas pode ser aumentado pela remoção do produto alvo do reator. Outro campo interessante é o uso de adsorventes sólidos como um reservatório temporário para os intermediários de reação o qual pode ser transportado na forma adsorvida de um ambiente de biorreação para outro.



Figura II-19. Transporte adsorvente contracorrente seletivo em um reator de leito fluidizado de múltiplos estágios.

Wielen *et al.* (1990), reportou uma descrição preliminar de um reator de leito fluidizado de múltiplos estágios no qual é possível o transporte contracorrente seletivo da fase sólida pesada com retenção da fase mais leve no reator. Os termos pesado e leve poderiam ser substituídos neste caso por partículas grandes e pequenas. O reator de leito fluidizado multi-estágio é um reator de fluxo pistonado o qual é compartimentado por pratos perfurados. Os furos nos pratos são maiores que as partículas fluidizadas. Com o

aumento ou a diminuição periódica da velocidade superficial do líquido, parte do material do leito é transportado, através dos furos, para um compartimento inferior ou superior respectivamente. Assim o transporte contracorrente ou concorrente semi-contínuo pode ser obtido. A fluidização de uma mistura binária de partículas com densidade e ou tamanho suficientemente diferentes produz segregação dos dois tipos de partículas resultando em uma zona inferior das partículas mais pesadas e em uma zona superior do tipo mais leve. Em uma disposição de múltiplos estágios como mostrado na Figura II-19, isto resultará em um arranjo alternado de partículas de adsorvente e biocatalisador.

Se as partículas adsorventes formam a fase "pesada" e a enzima imobilizada a fase "leve", são formados em cada compartimento uma zona de adsorção na base e uma zona de reação no topo. Pela pulsação descendente, parte da zona da base com o material adsorvente é transportado para um compartimento mais baixo e a mistura do catalisador remanescente e o adsorvente segrega novamente. A pulsação periódica produzirá o transporte semi-contínuo contracorrente e contínuo da fase adsorvente. Este mecanismo é mostrado esquematicamente na Figura II-19. Um adsorvente suficientemente seletivo produzirá, em uma situação ideal, um fluxo de produto contendo adsorvente da base do reator.

Dam (1991), tem investigado uma configuração alternativa. A tendência de segregação de partículas densas em leitos fluidizados de partículas mais leves é explorado para criar um fluxo contracorrente de partículas adsorventes pesadas em sistemas fluidizados de biocatalisadores gel mais leves. A seção da base do reator contém uma placa-peneira com uma forma cônica interna. Em determinado gradiente de velocidade de líquido, a fase mais leve é retida no reator enquanto as partículas adsorventes mais pesadas podem passar seletivamente. Dirigiu-se a este arranjo, o qual é mostrado na Figura II-20, como um reator de leito fluidizado de fluxo gotejante.



Figura II-20. Transporte de adsorvente contracorrente seletivo em um reator de leito fluidizado de fluxo gotejante.

II.2.11. Membranas como Separadores-Reatores

Além da utilização em sistemas de purificações as membranas também são utilizadas em reatores catalíticos, onde a combinação da reação e separação tem como objetivo atingir maiores conversões pelo deslocamento da distribuição de equilíbrio dos produtos da reação através de uma permeação seletiva de pelo menos um desses produtos (Saracco & Specchia, 1994). Reação e separação acoplada junto em um único aparato leva, além de outras vantagens, à redução de custo.

Uma reação reversível, tem um limite de conversão ou rendimento ditado pelo equilíbrio da reação. Este limite, em princípio, pode ser deslocado pela imposição de um distúrbio ao equilíbrio, por exemplo, pela remoção de um ou mais produtos. Quando um ou mais produtos, mas não os reagentes, são removidos através de uma membrana, a reação se desloca no sentido da formação de mais produtos. Assim a permeabilidade dos produtos através da membrana pode aumentar a conversão dos reagentes. Este procedimento possibilita aumentar uma dada conversão a uma temperatura de operação mais baixa, ou forçar a conversão em uma reação termodinamicamente desfavorável (Hsieh, 1991).

A seletividade de um produto também pode ser aumentada pela capacidade da membrana de separar os componentes da reação. Um produto formado em contato com os reagentes pode levar a formação de produtos indesejados. A rápida remoção do produto, através da membrana pode reduzir ou evitar as reações paralelas (Hsieh, 1991). Outro

beneficio de se usar reatores de membrana está relacionado à segurança. Para reatores que envolvem rápida liberação de energia, a adição controlada de um reagente a outro minimiza a chance de geração repentina de uma grande quantidade de energia devido ao descontrole da reação (Hsieh, 1991).



Figura II-21. Algumas características dos reatores catalíticos com membrana inorgânica: (a) tipos de membranas; (b) combinações possíveis de catalisadores e membranas; (c) fluxos padrões.

Como mostrado na Figura II-21(a), membranas inorgânicas podem ser classificadas primeiro em densas e porosas, e secundariamente em suportadas (assimétricas) e não suportadas (simétricas). As membranas densas típicas são feitas de metais (ligas de prata ou paládio) ou eletrólitos sólidos (zircônio estabilizado), ambos permeáveis apenas ao hidrogênio e ao oxigênio. Entre as membranas cerâmicas porosas, as mais frequentemente usadas são alumina, e camadas de sol-gel titânio e zircônio. Membranas de eletrólitos sólidos geralmente são simétricas, enquanto que uma estrutura assimétrica é frequentemente necessária para os outros materiais para otimizar a seletividade, permeabilidade e resistência mecânica. Em reatores catalíticos de membranas inorgânicas a aplicação da membrana tem que ser acoplada de alguma forma com catalisadores heterogêneos. A Figura II-21(b) mostra como este acoplamento pode ser arranjado. O chamado reator incluso em membrana é feito de uma membrana inerte a qual contém um leito fixo tradicional de partículas catalíticas. No catalisador depositado em membrana, a membrana é suportada, pelo menos em um lado, algumas partículas de catalisador depositadas (eletrodos catalíticos colocados nas membranas de eletrólito sólido). A Figura II-21(c) mostra as diferentes formas que um reator catalítico de membrana inorgânica pode ser operado com respeito ao padrão de fluxo. Fluxos contracorrente ou concorrente são características de membranas tubulares, as quais provavelmente representam a melhor forma para as aplicações em engenharia.

II.2.12. Extração Contínua com Reciclo da Resina de Adsorção – Continuous Adsorption Recycle Extraction (CARE)

Pungor *et al.* (1987) desenvolveram um processo de extração contínua com reciclo da resina de afinidade ("Continuous Affinity Recycle Extraction" - CARE). A viabilidade técnica do sistema CARE foi estudada utilizando a purificação por afinidade de β galactosidase usando agarose como sistema teste de adsorção e soroalbumina bovina como impureza artificial. A viabilidade do sistema também foi demonstrada usando células não pré-tratadas. A remoção dos fragmentos de células foi visivelmente confirmada pela solução clara de β -galactosidase obtida no tampão de eluição removido do estágio de dessorção. A representação esquemática do sistema CARE é apresentado na Figura II-22(A).

No experimento de Pungor *et al.* (1987) a agitação das partículas e recirculação através de bombas peristálticas não resultaram na ruptura do ligante, observada por 24 horas, e a recirculação das esferas foi possível com a suspensão com porosidade do meio reacional em 0,6. Na primeira corrida teste, o fator de purificação foi 36,4; a concentração 9 vezes e o rendimento de recuperação excedeu 90%. A viabilidade do sistema também foi demonstrada usando homogenato de células não pré-tratadas. O sistema CARE permite o processamento de "material sujo" tal como o que contém fragmentos de células com proteínas contaminantes e ácidos nucleicos. Neste experimento, com alimentação não prétratada, o rendimento de recuperação foi de 70%, o fator de purificação foi de 35,0 (Pungor et al., 1987). Estes resultados mostram que o sistema CARE pode ser utilizado para purificação de homogenatos de células e portanto pode ser usado não apenas como um passo final de purificação mas também como uma ferramenta de purificação inicial de alta resolução. A operação do sistema não é afetada pela presença de células inteiras, fragmentos de células, ou macromoléculas que resultam da alimentação viscosa no estágio de adsorção. Isto é devido a diluição do fluxo de alimentação e a configuração em suspensão do adsorvente de afinidade. Adicionalmente, como o diâmetro de corte da membrana é muito maior que as impurezas sólidas, o entupimento da membrana é evitado.

Variáveis importantes no desempenho do sistema CARE são a taxa de adsorção de enzima no primeiro tanque e a taxa de dessorção no tanque de eluição. A etapa limitante no processo de adsorção pode ser a taxa de formação do complexo adsorvente-proteína, a taxa de transporte da proteína através da membrana ou a taxa de transporte de proteína dentro dos poros do material suporte de afinidade (Pungor *et al.*, 1987).

Os reatores experimentais do sistema CARE, utilizados originalmente por Pungor et al., (1987), consistem de dois estágios idênticos (Figura II-22(B)). Dois cilindros de 250 ml com dispositivos de filtração concêntricos. Os cilindros foram agitados em um agitador rotatório com o intuito de manter as partículas de afinidade em suspensão. As esferas de afinidade foram colocadas no compartimento externo da unidade e foram retidas por um filtro de membrana com diâmetro de corte de 20 μm, β-galactosidase bem como todas as impurezas foram transmitidos através do filtro sem formar uma camada de filtração secundária sobre a membrana. Cilindros de aço inoxidável com malha de 100 µm localizado no lado interno dos filtros, foram usados para suportar fisicamente a membrana. O lado externo da membrana foi coberto com uma malha de náilon para prevenir a ruptura da membrana de separação. A suspensão do adsorvente de afinidade foi recirculado entre os compartimentos externos das duas unidades por uma bomba peristáltica multicanal. O fluxo de alimentação contendo a β-galactosidase bruta e o tampão de lavagem foi misturado e alimentado na unidade de adsorção como um fluxo único. O volume de trabalho dos reatores (100 ml) foram mantidos constantes igualando as taxas de fluxos de entrada e saída de cada reator.



Figura II-22. (A) Representação esquemática do CARE. (B) Reator experimental.

No sistema "CARE" original, ao invés do empacotamento convencional das partículas adsorventes como em coluna cromatográfica, o contato sólido-líquido é alcançado em reatores de mistura com membranas. O diâmetro de corte da membrana é tal que não permite a passagem da matriz adsorvente mas permite que a corrente de líquidos e seus conteúdos solúveis a permeie. A alimentação da solução a ser purificada é feita no primeiro tanque, onde ocorre a adsorção da enzima ao ligante acoplado covalentemente a matriz. As impurezas e as enzimas que não foram adsorvidas e estão na fase líquida são eliminadas através da membrana. A mistura em suspensão do reator de adsorção é continuamente recirculada ao tanque de eluição, onde a adição do tampão de eluição promove a dessorção nas características do tampão, tais como, mudança no pH, na concentração de sal. Para que o processo opere continuamente a suspensão do tanque de eluição é recirculada ao tanque de adsorção.

Devido à configuração em suspensão da matriz adsorvente, este sistema pode ser operado em presença de fragmentos de células e de células inteiras, e, como o diâmetro de corte da membrana é muito maior que as impurezas sólidas, o entupimento da membrana é evitado. Assim, ocorre a integração da clarificação, concentração e purificação em um único passo, enquanto alto rendimento de recuperação de produto é obtido. Por exemplo, para uma proteína produzida intracelularmente, a purificação pode ser feita imediatamente após o passo de ruptura da célula, assim contornando o passo de remoção de fragmentos de células (Gordon *et al.*, 1990a). Como este sistema utiliza reatores de mistura contínuos (CSTR) que têm hidrodinâmica de fácil controle, caminho de difusão curto e a transferência de massa não limitante, sua operação pode ser facilmente controlada (Pungor *et al.*, 1987).

Gordon & Cooney (1990) verificaram experimentalmente o desempenho do processo CARE para purificação de β -galactosidase, utilizando troca iônica como princípio de adsorção. Observaram que, diferentemente da adsorção por afinidade, houve a adsorção de mais de uma proteína na fase sólida, necessitando de mais um estágio de dessorção.

Neste sistema a resina adsorvente deve conciliar as características de ser adequada à purificação desejada e ter uma resistência mecânica suficiente para suportar a fricção do meio em suspensão. A matriz utilizada para a fixação do ligante também pode ser substituída por um polímero de alta massa molecular que fique retido pela membrana, ampliando a aplicação do CARE para sistemas bifásicos aquosos.

III – MODELAGEM MATEMÁTICA

Os modelos matemáticos de adsorção e cromatografia geralmente são classificados em três categorias, modelo de equilíbrio, modelo de pratos e modelo da taxa (Ruthven 1984). O modelo de equilíbrio assume equilíbrio local direto entre a fase móvel e a fase estacionária, desprezando a dispersão axial e a resistência à transferência de massa. Esta teoria fornece uma boa interpretação dos resultados experimentais de colunas cromatográficas com taxa de transferência de massa rápida, que ocorrem em muitas colunas em escala analítica. Ela fornece a localização geral do perfil de concentração do sistema cromatográfico mas falha em fornecer detalhes acurados dos efeitos de tranferência de massa no sistema (Lee et al. 1989). Genericamente falando há dois tipos de modelos de pratos. O primeiro tipo é diretamente análogo a um modelo de tanques em série. Neste modelo a coluna é dividida em uma série de pequenos elementos artificiais cujo conteúdo é assumido completamente misturado. O segundo tipo de modelo de pratos é formulado baseado em fatores de distribuição que determinam o equilíbrio de cada componente em cada estágio artificial (Gu et al. 1993). Os modelos da taxa utilizam uma expressão para a taxa de transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária. Um modelo da taxa geralmente consiste de dois conjuntos de equações diferenciais de balanço de massa, um para o seio da fase fluida e o outro para a fase particulada (Gu et al. 1993).

Para um tanque de mistura perfeita em batelada de volume constante o balanço de massa de enzima na fase líquida pode ser escrito como:

$$\frac{dE}{dt} = -R \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \tag{III-1}$$

onde E é a concentração da enzima (proteína alvo), é a porosidade do meio (fração de vazios) e R é a taxa de transferência de massa na interface e t é o tempo. As diferenças entre os modelos teóricos da taxa de adsorção ocorrem principalmente devido às variações nas equações da taxa de transferência de massa na interface, ou seja, a especificação de R na Equação III-1. A taxa de transferência de massa na interface pode ser formulada pela (i) taxa de difusão no filme fluido controlando a transferência, (ii) pela taxa de reação de adsorção na superfície, e (iii) pela taxa de difusão no poro e/ou na partícula. Os vários

passos da transferência de massa são descritos na Figura III-1 (Cowan *et al.* 1986). Os passos limitantes da taxa que ocorrem em um processo de adsorção surgem das resistências ao transporte de material do seio do fluido para o interior das partículas.



Figura III-1. Natureza física e localização de passos individuais na transferência de massa do soluto de um fluido para uma partícula sólida (adaptado de Cowan *et al.* 1986).

Quando a taxa de difusão na partícula e/ou no poro é controladora do processo, dois tipos de aproximações têm sido usadas. O modelo do sólido homogêneo e o modelo da partícula porosa. O modelo do sólido homogêneo trata a partícula como uma matriz homogênea, independente de sua estrutura porosa (Cowan et al. 1986). Nestes modelos simplificados o processo de adsorção pode ser tratado como uma reação química reversível ou irreversível e assim a expressão de transferência pode ser simplificada por uma expressão cinética da taxa.

Chase (1984b) sugeriu a modelagem do sistema por uma reação de transferência de massa reversível na qual o adsorbato livre se liga ao adsorvente. Assume-se que o sítio de ligação imobilizado L no adsorvente tem afinidade por apenas uma única espécie de adsorbato P e que a interação pode ser descrita por uma relação de equilíbrio na forma:

$$P + L \xrightarrow{kl} P \cdot L \tag{III-2}$$

onde k1 e k2 são parâmetros cinéticos da taxa que governam a reação na direção de adsorção e dessorção respectivamente. A razão das constantes (k2/k1) é igual a constante de dissociação (Kd) que descreve a relação de equilíbrio da reação. As constantes da taxa kl e k2 não representam apenas as taxas de adsorção e de dessorção do adsorbato no sítio de ligação imobilizado na superfície do adsorvente mas também inclui as contribuições significativas das resistências à transferência de massa que ocorrem nestes sistemas desde o seio da fase móvel até o sítio de adsorção. Esta resistência à transferência de massa também inclui a resistência no fluido na região exterior à partícula (resistência à difusão no filme) e dentro das partículas devido à difusão nos poros (difusão no poro ou resistência à difusão na partícula) e a resistência a adsorção na superfície da parede do poro (resistência à reação na superfície). Este modelo ao invés de considerações rigorosas da natureza das resistências adota uma descrição empírica onde o processo de adsorção e dessorção é descrito por parâmetros cinéticos da taxa determinados experimentalmente (Chase 1984b). Apesar da formulação matemática empregada neste modelo paramétrico agregado ser simples e não distinguir explicitamente entre o transporte de massa e a cinética de ligação intrínseca, o sistema experimental é bem descrito (Chase 1984b).

A taxa progressiva da reação é proporcional a quantidade de enzima livre (P[=]E) multiplicado pela quantidade de sítios livres (L[=]Qm-Q) para se ligar com a enzima. A taxa reversa é proporcional a quantidade de enzima ligada ao adsorvente ($P\cdot L[=]Q$), isto é,

$$E \xrightarrow{kl(Qm-Q)} Q$$

$$E \xrightarrow{k2} Q$$
(III-3)

onde E é a concentração de enzima livre, Q é a concentração de enzima adsorvida, Qm é a capacidade máxima do adsorvente e k1 e k2, como já foi dito são as constantes cinéticas. A expressão da taxa de adsorção pode então ser definida pela equação:

$$R = \frac{dQ}{dt} = k1 \cdot E \cdot (Qm - Q) - k2 \cdot Q$$
(III-4)

Quando o sistema atinge o equilíbrio, dQ/dt=0, E=E* e Q=Q*:

$$k1 \cdot E^* \cdot \left(Qm - Q^*\right) - k2 \cdot Q^* = 0 \tag{III-5}$$

onde o sobrescrito * representa o valor no equilíbrio. Da Equação III-5, pode ser mostrado que no equilíbrio, a concentração na fase sólida do material adsorvido variará com a concentração do adsorbato de uma maneira descrita por:

$$Q^* = \frac{Qm \cdot E^*}{(Kd + E^*)} \tag{III-6}$$

onde Kd=k2/k1 é a constante de dissociação da (do complexo adsorvente-adsorbato). A Equação III-6 é conhecida como isoterma de Langmuir.

A predição do comportamento dos sistemas de afinidade durante o estágio de eluição do ciclo de purificação requer conhecimento dos parâmetros de interação na presença do eluente.

$$\begin{array}{cccc}
\mathcal{Q} & \xrightarrow{k2} & E \\
\stackrel{k1}{\longleftarrow} & E \\
\end{array} \tag{III-7}$$

Na eluição a constante da taxa de dessorção (k2) tende a aumentar enquanto o valor de kl tende a diminuir (o valor de Kd aumenta), pois geralmente o eluente além de prevenir a adsorção promove o colapso do complexo adsorvente-adsorbato. Em muitos casos a eluição tende a ser extremamente rápida e assim a eluição também pode ser definida como uma reação de primeira ordem irreversível, onde k3 é a constante de dissociação:

$$Q \xrightarrow{k3} E$$
 (III-8)

A taxa de dessorção fica:

$$\frac{dQ}{dt} = -k3 \cdot Q \tag{III-9}$$

Os resultados obtidos por Chase (1984b) confirmaram que uma relação simples de equilíbrio pode ser usada para descrever as interações que ocorrem em cromatografia de afinidade. Entretanto este modelo assume que os parâmetros que descrevem a reação de

ligação são os mesmos para todos os sítios de ligação do adsorbato o que pode não ocorrer sempre na prática.

Uma análise do desempenho de diferentes configurações derivadas do sistema CARE de purificação foi feita neste trabalho através de simulações computacionais utilizando os parâmetros cinéticos de adsorção por afinidade da enzima lisozima em Cibracon Blue apresentados por Chase (1984a) e Cowan *et al.* (1986). Também foram avaliados o desempenho de diferentes configurações derivadas do sistema CARE, do sistema de leito móvel simulado e do sistema de tanque de mistura móvel simulado utilizando os parâmetros cinéticos obtido por Taboada (1999) para a adsorção de lipase por interação hidrofóbica.

Taboada (1999) estudou a adsorção de lipase em resina de interação hidrofóbica (Bytil-Sepharose) cuja adsorção é favorecida com o aumento da concentração de cloreto de sódio (NaCl) e a dessorção é favorecida pela redução da concentração de NaCl presente no meio. Os parâmetros cinéticos (k1, k2, Qm) foram então obtidos em função da concentração de NaCl e as diferentes etapas, adsorção, lavagem e eluição puderam ser simuladas computacionalmente em função do teor de sal presente nos tampões utilizados em cada estágio.

A adsorção em batelada em tanque de mistura perfeita de volume constante, é representado esquematicamente na Figura III-2.



Figura III-2. Representação esquemática de adsorção em batelada. P enzima, L ligante, $P \cdot L$ enzima adsorvida.

A taxa de variação com o tempo da concentração de enzima na fase líquida (E) no reator batelada é igual ao negativo da taxa de variação com o tempo da concentração de enzima na fase sólida multiplicado pela razão entre os volumes das fases sólida e líquida devido a porosidade.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase líquida em reator batelada.

Acúmulo de enzima na fase líquida:

Taxa de transferência de massa de enzima para a fase sólida: $\frac{dQ}{dt} \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$

O balanço de massa de enzima na fase líquida em reator batelada de mistura perfeita fica:

$$\frac{dE}{dt} = -\frac{dQ}{dt} \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \tag{III-10}$$

$$\frac{dE}{dt} = -[k1 \cdot E \cdot (Qm - Q) - k2 \cdot Q] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-11)

A porosidade do meio () ou fração de vazios é definida como a razão entre o volume de líquido (V_l) e o volume total $(V=V_l+V_s)$, que é a soma do volume de líquido com o volume de sólido (V_s) :

$$\varepsilon = \frac{V_l}{V_l + V_s} = \frac{V_l}{V} \tag{III-12}$$

A adsorção em tanque de mistura contínuo com membrana, é representado esquematicamente na Figura III-3.

A taxa de variação com o tempo da concentração de enzima na fase líquida (E) no reator de mistura contínuo é igual ao que entra na alimentação menos o que permeia através da membrana, menos a taxa de variação com o tempo da concentração de enzima na fase sólida multiplicada pela razão entre os volumes das fases sólida e líquida devido a porosidade.

 $\frac{dE}{dt}$



Figura III-3. Representação esquemática de adsorção em reator de mistura perfeita contínuo com membrana. F1 fluxo volumétrico de solução, E0 concentração de enzima na alimentação, E concentração de enzima na saída.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase líquida no reator de mistura contínuo com membrana.

Acúmulo de enzima na fase líquida:	$\frac{dE}{dt}$
Enzima na fase líquida que entra no reator pela alimentação:	$\frac{F1}{V\cdot\varepsilon}E0$
Enzima na fase líquida que sai do reator através membrana:	$\frac{F1}{V \cdot \varepsilon} E$
Taxa de transferência de massa de enzima para a fase sólida:	$\frac{dQ}{dt}\left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$

O balanço de massa de enzima na fase líquida em reator de mistura contínuo com membrana fica:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (E0 - E) - \frac{dQ}{dt} \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-13)

$$\frac{dE}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (E0 - E) - [k1 \cdot E \cdot (Qm - Q) - k2 \cdot Q] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-14)

A adsorção em coluna cromatográfica de leito fixo de volume constante, é representado esquematicamente na Figura III-4.



Figura III-4. Representação esquemática de uma coluna cromatográfica de leito fixo. F1 fluxo volumétrico de solução, E0 concentração de enzima na alimentação, E concentração de enzima na saída.

A variação da concentração de enzima (E) no volume de controle em uma coluna cromatográfica de leito fixo é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle menos a variação de concentração de enzima na fase sólida multiplicado pela razão de proporção de volume entre as fases sólida e líquida devido a porosidade.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa da enzima por unidade de volume da fase líquida (fase móvel) em uma coluna cromatográfica de leito fixo sem difusão e dispersão axial.

Acúmulo de enzima na fase líquida no volume de controle: $\frac{dE}{dt}$

Enzima na fase líquida que entra menos a que sai no volume de controle: $\frac{F1}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{dE}{dz}\right)$

Taxa de transferência de massa de enzima para a fase sólida no volume de controle: $\frac{dQ}{dt} \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$

O balanço de massa de enzima na fase líquida em coluna cromatográfica de leito fixo fica:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{dE}{dz} \right) - \frac{dQ}{dt} \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right)$$
(III-15)

$$\frac{dE}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{dE}{dz} \right) - \left[k1 \cdot E \cdot \left(Qm - Q \right) - k2 \cdot Q \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)$$
(III-16)

Nesta tese de doutorado utilizou-se os parâmetros cinéticos de adsorção e dessorção da enzima lisozima adsorvida em Cibracon Blue apresentados por Chase (1984a) e Cowan *et al.* (1986) especificados a seguir. Os parâmetros cinéticos k1, k2 e k3 são constantes e k1 e k2 se referem a adsorção e k3 a eluição.

$$kl = 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ hr}^{-1}$$
 litro
 $k2 = 1.80 \text{ hr}^{-1}$

$$k_3 = 10^3 \text{ hr}^{-1}$$

 $Qm=1,0 \ge 10^{-3} \text{ mol litro}^{-1}$

Nesta tese de doutorado utilizou-se também os parâmetros cinéticos de adsorção e dessorção de lipase produzida pelo microorganismo *Geotricum sp*, obtidos por Taboada (1999), em um trabalho que faz parte do projeto do CNPq intitulado "Obtenção de Enzima Lipase Utilizando Reatores Não Convencionais Para Recuperação e Purificação" PADCT QEQ 01/95-01, no qual esta tese também está incluída. Taboada (1999) obteve a cinética de adsorção de lipase presente no caldo de fermentação em resina de interação hidrofóbica, Butyl-Sepharose, a diferentes concentrações de cloreto de sódio (de 0,5M a 2,0M), determinando as constantes cinéticas $Qm \ e \ Kd$ através do ajuste da equação de Langmuir aos valores experimentais. Os valores das constantes $k1 \ e \ k2 \ (Kd=k2/k1)$ foram ajustados utilizando dados obtidos no estado dinâmico e o método de Runge-Kutta de 4^ª ordem. Taboada (1999) utilizou as constantes cinéticas para simulação de curvas de ruptura (*breakthrough*), que foram comparadas com curvas de ruptura experimentais obtidas por injeção do caldo bruto de fermentação contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio sobtidas por injeção do caldo bruto de fermentação contendo diferentes concentrações de cloreto de sódia por seperimentais e as simuladas foi bom.

As interações hidrofóbicas desempenham um papel importante na adsorção de lipases sobre membranas hidrofóbicas devido a elevada hidrofobicidade das lipases, pouco comum entre as enzimas (Balcão *et al.* 1996). A desidratação das regiões hidrofóbicas tanto

nas proteínas como nos adsorventes pode contribuir para incrementear significativamente a força de adsorção.

Os parâmetros cinéticos de adsorção de lipase em Butyl-Sepharose obtidos experimentalmente por Taboada (1999) são apresentados a seguir. Os parâmetros cinéticos k1 e k2 e Qm foram obtidos em função da concentração de NaCl presente no meio. Na Tabela III-1 são apresentados os parâmetros cinéticos Qm e Kd. Pode-se verificar uma forte dependência destes parâmetros com a concentração de sal presente no meio. Com o aumento da concentração de sal há uma redução no valor de Kd, indicando um favorecimento do processo de adsorção. Com o aumento da concentração de NaCl também há um aumento da capacidade máxima de adsorção (Qm) da lipase na resina de interação hidrofóbica favorecendo a retenção desta enzima.

Os valores dos parâmetros cinéticos kl e k2 obtidos por Taboada (1999) são apresenteados na Tabela III-2.

Concentração de NaCl	Qm	Kd
(moles/litro)	(U/litro)	(U/litro)
0,5	31150	9420
1,0	69950	7340
2,0	80100	2990

Tabela III-1. Valores dos parâmetros cinéticos para adsorção de lipase por Butyl-Sepharose em função da concentração de NaCl.

Tabela III-2. Valores dos parâmetros cinéticos intrínsecos k1 e k2 na adsorção de lipase em Butyl-Sepharose em função da concentração de NaCl.

Concentração de NaCl	kl	k2
(moles/litro)	(litro/(U·hr))	(hr ⁻¹)
0,5	0,00027	2,5434
1,0	0,00036	2,6466
2,0	0,00057	1,7046

Visando a simulação computacional do processo CARE para purificação de lipase, Taboada (1999) fêz um ajuste dos parâmetros experimentais e obteve as equações que representam o comportamento destes parâmetros em função da concentração de sal. As equações matemáticas que representam a variação dos parâmetros cinéticos em função da concentração de sal, são apresentadas a seguir:

$$Qm = 13467 \cdot [NaCl] \cdot \exp(-0.1623 \cdot [NaCl]^2 + 1.7477) \qquad R^2 = 0.9596 \qquad (III-17)$$

$$k1 = 0,0001656 + 0,000216 \cdot [NaCl]$$
 $R^2 = 0,9988$ (III-18)

$$k2 = 2,601 - \frac{1,8114 \cdot [NaCl]^7}{128,13 + [NaCl]^7} \qquad R^2 = 0,9869 \qquad (III-19)$$

Com estas equações descrevendo a dependência dos parâmetros cinéticos com o teor de sal pode-se fazer uma simulação computacional mais realista pois a adsorção, a lavagem e a eluição podem ser simuladas em função da correspondente concentração de sal contido no meio reacional de cada etapa. Como o tampão de alimentação e lavagem contêm sal para favorecer a adsorção e o tampão de eluição não contém sal para promover a dessorção, a mistura que ocorre entre os tampões durante o processo de purificação gera uma alteração no teor de sal e consequentemente uma alteração nos parâmetros cinéticos, que são automaticamente computadas pelas equações dos parâmetros cinéticos (III-17 a III-19).

Na elaboração dos modelos dos sistemas de purificação estudados nesta tese foram feitas as seguintes hipóteses: o processo de adsorção é isotérmico; os coeficientes de transferência de massa da enzima são dependentes da concentração de sal (cinética de adsorção de lipase); apenas a enzima é adsorvida pela resina adsorvente enquanto que as impurezas não são: o transporte da biomolécula alvo (enzima) e impurezas através da membrana é desimpedido (100% de transmissão – exceto nos casos em que a membrana só

permite a passagem de tampão e seu conteúdo salino); o diâmetro de corte da membrana impede a passagem da resina adsorvente e por isso não há fluxo de enzima adsorvida através da membrana; o volume dentro de cada módulo é mantido constante pela igualdade de adição e remoção de tampão; a concentração por polarização da molécula ligante na superfície da membrana é desprezível nas condições de operação; a porosidade da partícula não está sendo considerada mas apenas a porosidade do meio. Com relação aos componentes presentes nos tampões utilizados em todos os sistemas de purificação simulados neste trabalho informa-se que o tampão de alimentação contém enzima, impureza e sal, o tampão de lavagem contém apenas sal na mesma concentração do tampão de alimentação e o tampão de eluição não contém sal para favorecer a dessorção.

Foram assumidas hipóteses específicas para os sistemas de purificação que apresentam características particulares que diferem das características comuns ou hipóteses que não estão expressas nas hipóteses gerais.

Entre as hipóteses específicas dos sistemas que utilizam tanques de mistura com membranas assume-se que as condições de mistura existentes dentro do tanque são ideais, ou seja, mistura perfeita. Para os sistemas com reatores de fluxo pistonado, considerou-se fluxo pistonado ideal e apenas a variação das concentrações axiais ao longo do duto tubular. Para os sistemas empregando colunas de leito fixo, a dispersão e difusão axial foram consideradas desprezíveis. No sistema com membrana modificada (com diâmetro de corte menor), esta só permite a passagem de sal e impede a passagem de impurezas e enzima.

III.1. Configurações Derivadas do Sistema CARE III.1.1. Sistema CARE de Dois Estágios (CARE2)

O modelo matemático do sistema CARE original, representado na Figura III-5, é apresentado a seguir. Este sistema consiste de dois tanques de mistura com uma membrana de ultrafiltração acoplada que impede a passagem da resina adsorvente. A alimentação é feita no primeiro estágio onde ocorre a adsorção e a eluição é feita no segundo estágio enquanto o meio reacional com a resina adsorvente é continuamente recirculada entre os

dois tanques. O fluxo de eluição é isento de sal para promover a dessorção. O fluxo de alimentação contém enzima, impurezas e sal.



Figura III-5. Representação esquemática do sistema CARE com dois estágios. A setas ⇒ e ⇐ indicam fluxo de líquido e sólido; a seta ↓ indica fluxo de líquido e a linha tracejada - - - - representa a membrana.

Balanço de massa no estágio de alimentação (estágio de adsorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no primeiro reator (*E1*). O acúmulo de enzima na fase líquida no primeiro reator é igual ao que entra pela alimentação menos o que sai através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, menos o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima, por unidade de volume da fase líquida no primeiro reator:

Acúmulo de enzima na fase líquida no primeiro reator:	$\frac{dE1}{dt}$
Enzima na fase líquida que entra no primeiro reator pela alimentação:	$\frac{F1}{V\cdot\varepsilon}E0$
Enzima na fase líquida que sai do primeiro reator através da membrana:	$\frac{F1}{V\cdot\varepsilon}E1$
Enzima na fase líquida que entra no primeiro reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}E2$
Enzima na fase líquida que sai do primeiro reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}E1$

Enzima que é adsorvida plela resina:

$$[k1E1\cdot(Qm-Q1)-k2Q1]\cdot\left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase líquida no primeiro reator fica:

$$\frac{dE1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (E0 - E1) + \frac{FR}{V} (E2 - E1) - [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-20)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no primeiro reator (*Q1*). O acúmulo de enzima na fase sólida no primeiro reator é igual, ao que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, mais o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase sólida no primeiro reator:

Acúmulo de enzima na fase sólida no primeiro reator: $\frac{dQ1}{dt}$

Enzima na fase sólida que entra no primeiro reator pelo fluxo de reciclo:

Enzima na fase sólida que sai do primeiro reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}Ql$

Enzima que adsorve na resina: $[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1]$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase sólida no primeiro reator fica:

$$\frac{dQ1}{dt} = \frac{FR}{V} (Q2 - Q1) + [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1]$$
(III-21)

<u>Balanço de massa de impurezas na fase líquida no primeiro reator (*C1*). O acúmulo de impurezas na fase líquida no primeiro reator é igual ao que entra na alimentação menos o que permeia através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo.</u>

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de impurezas por unidade de volume na fase liquida no primeiro reator:

Acúmulo de impurezas no primeiro reator:

dC1

 $\frac{FR}{V}Q^2$
Impurezas que entram no primeiro reator pela alimentação: $\frac{F1}{V \cdot \epsilon} C0$

Impurezas que saem do primeiro reator através da membrana:
$$\frac{F1}{V \cdot \epsilon} C1$$

Impurezas que entram no primeiro reator pelo fluxo de reciclo:

Impurezas que saem do primeiro reator pelo fluxo de reciclo:

Portanto o balanço de massa de impurezas no primeiro reator fica:

$$\frac{dC1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (C0 - C1) + \frac{FR}{V} (C2 - C1)$$
(III-22)

 $\frac{FR}{V}C2$

 $\frac{FR}{V}C1$

Balanço de sal (NaCl) na fase líquida no primeiro reator (S1). O acúmulo de sal no primeiro reator é igual ao que entra no tampão de alimentação menos o que permeia através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de sal por unidade de volume da fase líquida no primeiro reator:

Acúmulo de sal no primeiro reator:	$\frac{dS1}{dt}$
Sal que entra no primeiro reator pela alimentação:	$\frac{F1}{V\cdot\varepsilon}S0$
Sal que sai do primeiro reator através da membrana:	$\frac{F1}{V\cdot\varepsilon}S1$
Sal que entra no primeiro reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}S2$
Sal que sai do primeiro reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}S1$

Portanto o balanço de massa de sal no primeiro reator fica:

$$\frac{dS1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (S0 - S1) + \frac{FR}{V} (S2 - S1)$$
(III-23)

Balanço de massa no estágio de eluição (estágio de dessorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no segundo reator (E2). O acúmulo de enzima na fase líquida no segundo reator é igual a, menos o que sai através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, menos o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase líquida no segundo reator:

Acúmulo de enzima na fase líquida no segundo reator:
$$\frac{dE2}{dt}$$
Enzima na fase líquida que sai do segundo reator através da membrana: $\frac{F2}{V \cdot \varepsilon} E2$ Enzima na fase líquida que entra no segundo reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V} E1$ Enzima na fase líquida que sai do segundo reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V} E2$ Enzima na fase líquida que sai do segundo reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V} E2$ Enzima que é adsorvida pela resina: $[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2] \cdot (\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon})$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase líquida no segundo reator fica:

Enzima que é adsorvida pela resina:

$$\frac{dE2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} (-E2) + \frac{FR}{V} (E1 - E2) - [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-24)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no segundo reator (O2). O acúmulo de enzima na fase sólida no segundo reator é igual ao que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, mais o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase sólida no segundo reator:

Acúmulo de enzima na fase sólida no segundo reator:

 $\frac{dQ2}{dt}$

100

Enzima na fase sólida que entra no segundo reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}Q^{1}$

Enzima na fase sólida que sai do segundo reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}Q^2$

Enzima que adsorve na resina: $[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2]$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase sólida no segundo reator fica:

$$\frac{dQ2}{dt} = \frac{FR}{V}(Q1 - Q2) + [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2]$$
(III-25)

<u>Balanço de massa de impurezas na fase líquida no segundo reator (C2)</u>. O acúmulo de impurezas no segundo reator é igual a menos o que permeia através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de impurezas por unidade de volume da fase líquida no segundo reator:

Acúmulo de impurezas no segundo reator: $\frac{dC2}{dt}$

Impurezas que saem do segundo reator através da membrana: $\frac{F2}{V \cdot \varepsilon}C2$ Impurezas que entram no segundo reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}C1$

Impurezas que saem do segundo reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}C2$

Portanto o balanço de massa de impurezas no segundo reator fica:

$$\frac{dC2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} (-C2) + \frac{FR}{V} (C1 - C2)$$
(III-26)

Balanço de massa de sal (NaCl) na fase líquida no segundo reator (S2). O acúmulo de sal no segundo reator é igual a menos o que permeia através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo. A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de sal por unidade de volume da fase líquida no segundo reator:

Acúmulo de sal no segundo reator:	$\frac{dS2}{dt}$
Sal que sai do segundo reator através da membrana:	$\frac{F2}{V\cdot\varepsilon}S2$
Sal que entra no segundo reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}S1$
Sal que sai do segundo reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}S2$

Portanto o balanço de massa de sal no segundo reator fica:

$$\frac{dS2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} (-S2) + \frac{FR}{V} (S1 - S2)$$
(III-27)

Os parâmetros cinéticos de transferência de massa (Qm, kl, k2) utilizados no modelo matemático para cada estágio do sistema de purificação, foram calculados pelas respectivas equações (Equação III-28, III-29, III-30), sempre em função da concentração de sal no meio reacional que vigora no estágio naquele momento.

$$Qm = 13467 \cdot S \cdot \exp\left(-0,1623 \cdot S^2 + 1,7477\right)$$
(III-28)

$$k1 = 0,0001656 + 0,000216 \cdot S \tag{III-29}$$

$$k2 = 2,601 - \frac{1,8114 \cdot S^7}{128,13 + S^7}$$
(III-30)

Com isso toda variação na concentração de sal que ocorrer no interior do reator devido a mudança na concentração de sal da alimentação, mudança na vazão dos fluxos de entrada e saída e mudança na vazão dos fluxos de reciclo será computada pelo programa. O cálculo da concentração de sal do meio reacional a cada instante, possibilita a atualilização dos parâmetros cinéticos pelo próprio modelo.

III.1.2. Sistema CARE de Três Estágios (CARE3).

O sistema CARE de três estágios proposto por Gordon *et al.* 1990b é apresentado esquematicamente na Figura III-6. Neste sistema é feito a inclusão de um estágio intermediário de lavagem semelhante ao estágio de adsorção. A alimentação da solução a ser purificada é feita no primeiro tanque e a eluição é feita no terceiro tanque. A mistura reacional é continuamente circulada do primeiro tanque para o segundo, do segundo para o terceiro, e do terceiro para o primeiro. A concentração de sal na corrente de entrada do tampão de lavagem é igual à concentração da solução de alimentação (*S0*).



Figura III-6. Representação esquemática do sistema CARE com três estágios.

Balanço de massa no estágio de alimentação (estágio de adsorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no primeiro reator (E1). O acúmulo de enzima na fase líquida no primeiro reator é igual ao que entra pela alimentação menos o que sai através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, menos o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase líquida no primeiro reator:

Acúmulo de enzima na fase líquida no primeiro reator: $\frac{dE1}{dt}$

Enzima na fase líquida que entra no primeiro reator pela alimentação: $\frac{F1}{V \cdot c} E0$

Enzima na fase líquida que sai do primeiro reator pela membrana: $\frac{F1}{V+c}E1$

Enzima na fase líquida que entra no primeiro reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}E3$

Enzima na fase líquida que sai do primeiro reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}E1$

Enzima que adsorve na resina:

Portanto o balanço de massa de enzima na fase líquida no primeiro reator fica:

 $[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$

$$\frac{dE1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (E0 - E1) + \frac{FR}{V} (E3 - E1) - [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-31)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no primeiro reator (*Q1*). O acúmulo de enzima na fase sólida no primeiro reator é igual ao que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, mais o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase sólida no primeiro reator:

Acúmulo de enzima na fase sólida no primeiro reator: $\frac{dQ1}{dt}$

Enzima na fase sólida que entra no primeiro reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}Q^3$

Enzima na fase sólida que sai do primeiro reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}Ql$

Enzima que adsorve na resina: $[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1]$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase sólida no primeiro estagio fica:

$$\frac{dQ1}{dt} = \frac{FR}{V}(Q3 - Q1) + [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1]$$
(III-32)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no primeiro reator (C1). O acúmulo de impurezas no primeiro reator é igual ao que entra na alimentação menos o que permeia através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de impurezas por unidade de volume da fase líquida do primeiro reator:

Acúmulo de impurezas no primeiro reator:	$\frac{dC1}{dt}$
Impurezas que entram no primeiro reator pela alimentação:	$\frac{F1}{V\cdot\varepsilon}C0$
Impurezas que saem do primeiro reator pela membrana:	$\frac{F1}{V \cdot \varepsilon} C1$
Impurezas que entram no primeiro reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}C3$
Impurezas que saem do primeiro reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}C1$

Portanto o balanço de massa de impurezas no primeiro reator fica:

$$\frac{dC1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (C0 - C1) + \frac{FR}{V} (C3 - C1)$$
(III-33)

<u>Balanço de massa de sal (NaCl) na fase líquida no primeiro reator (SI)</u>. O acúmulo de sal na fase líquida no primeiro reator é igual ao que entra no tampão de alimentação menos o que permeia através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de sal por unidade de volume da fase líquida do primeiro reator:

Acúmulo de sal no primeiro reator:	dS1
	dt
Sal que entra no primeiro reator pela alimentação:	$\frac{F1}{V\cdot\varepsilon}S0$
Sal que sai do primeiro reator pela membrana:	$\frac{F1}{V+\varepsilon}S1$

Sal que entra no primeiro reator pelo fluxo de reciclo:

Sal que sai do primeiro reator pelo fluxo de reciclo:

Portanto o balanço de massa de sal no primeiro reator fica:

$$\frac{dS1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} \left(S0 - S1 \right) + \frac{FR}{V} \left(S3 - S1 \right)$$
(III-34)

Balanco de massa no estágio de lavagem.

Balanço de massa de enzima na fase líquida no segundo reator (E2). O acúmulo de enzima na fase líquida no segundo reator é igual a menos o que sai através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, menos o que adsorve na resina. O tampão de lavagem que entra no segundo reator não contém enzima.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase líquida no segundo reator:

Acúmulo de enzima na fase líquida no segundo reator:

Enzima na fase líquida que sai do segundo reator pela membrana:

Enzima na fase líquida que entra no segundo reator pelo fluxo de reciclo:

Enzima na fase líquida que sai do segundo reator pelo fluxo de reciclo:

Enzima que adsorve na resina:

Portanto o balanço de massa de enzima na fase líquida no segundo reator fica:

$$\frac{dE2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} (-E2) + \frac{FR}{V} (E1 - E2) - [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-35)

$$[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$$

$$\frac{dE2}{dt}$$

$$\frac{F2}{V-c}E2$$

 $\frac{FR}{V}S3$

 $\frac{FR}{V}S1$

$$\frac{1}{V \cdot \varepsilon}$$

 $\frac{FR}{V}E1$

 $\frac{FR}{V}E2$

Balanço de massa de enzima na fase sólida no segundo reator (Q2). O acúmulo de enzima na fase sólida no segundo reator é igual ao que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, mais o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase sólida no segundo reator:

Acúmulo de enzima na fase sólida no segundo reator: $\frac{dQ2}{dt}$

Enzima na fase sólida que entra no segundo reator pelo fluxo de reciclo:

Enzima na fase sólida que sai do segundo reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}Q^2$

Enzima que adsorve na resina: $[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2]$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase líquida no segundo reator fica:

$$\frac{dQ2}{dt} = \frac{FR}{V}(Q1 - Q2) + [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2]$$
(III-36)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no segundo reator (C2). O acúmulo de impurezas no segundo reator é igual a menos o que permeia através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de impurezas por unidade de volume da fase líquida do segundo reator:

Acúmulo de impurezas no segundo reator: $\frac{dC2}{dt}$

Impurezas que saem do segundo reator pela membrana:

Impurezas que entram no segundo reator pelo fluxo de reciclo:

Impurezas que saem do segundo reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}C2$

 $\frac{F2}{V \cdot \epsilon}C2$

 $\frac{FR}{V}C1$

 $\frac{FR}{V}Q^{1}$

Portanto o balanço de massa de impurezas no segundo reator fica:

$$\frac{dC2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(-C2\right) + \frac{FR}{V} \left(C1 - C2\right)$$
(III-37)

Balanço de massa de sal (NaCl) na fase líquida no segundo reator (S2). O acúmulo de sal no segundo reator é igual ao que entra no tampão de lavagem menos o que permeia através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de sal por unidade de volume da fase líquida do segundo reator:

Acúmulo de sal no segundo reator:	$\frac{dS2}{dt}$
Sal que entra no segundo reator pelo tampão de lavagem:	$\frac{F2}{V\cdot\varepsilon}S0$
Sal que sai do segundo reator pela membrana:	$\frac{F2}{V\cdot\varepsilon}S2$
Sal que entra no segundo reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}S1$
Sal que sai do segundo reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}S2$

Portanto o balanço de massa de sal no segundo reator fica:

$$\frac{dS2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(S0 - S2 \right) + \frac{FR}{V} \left(S1 - S2 \right)$$
(III-38)

Balanço de massa no estágio de eluição (estágio de dessorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no terceiro reator (E3). O acúmulo de enzima na fase líquida no terceiro reator é igual a menos o que sai através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, menos o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase líquida no terceiro reator (E3).

Acúmulo de enzima na fase líquida no terceiro reator:

Enzima na fase líquida que sai do terceiro reator pela membrana: $\frac{F3}{V \cdot s}E3$

Enzima na fase líquida que entra no terceiro reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}E2$

Enzima na fase líquida que sai do terceiro reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}E3$

Enzima que adsorve na resina: $[k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase líquida no terceiro reator fica:

$$\frac{dE3}{dt} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} (-E3) + \frac{FR}{V} (E2 - E3) - [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-39)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no terceiro reator (*Q3*). O acúmulo de enzima na fase sólida no terceiro reator é igual ao que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, mais o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase sólida no terceiro reator:

Acúmulo de enzima na fase sólida no terceiro reator: $\frac{dQ^3}{dt}$

Enzima na fase sólida que entra no terceiro reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}Q^2$

Enzima na fase sólida que sai do terceiro reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}Q^3$

Enzima que adsorve na resina: $[k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3]$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase sólida no terceiro reator fica:

$$\frac{dQ3}{dt} = \frac{FR}{V}(Q2 - Q3) + [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3]$$
(III-40)

 $\frac{dE3}{dt}$

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no terceiro reator (C3). O acúmulo de impurezas no terceiro reator é igual a menos o que permeia através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de impurezas por unidade de volume da fase líquida do terceiro reator:

Acúmulo de impurezas no terceiro reator:	$\frac{dC3}{dt}$
Impurezas que saem do terceiro reator pela membrana:	$\frac{F3}{V\cdot\varepsilon}C3$
Impurezas que entram no terceiro reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}C2$
Impurezas que saem do terceiro reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}C3$

Portanto o balanço de massa de impurezas no terceiro reator fica:

$$\frac{dC3}{dt} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} (-C3) + \frac{FR}{V} (C2 - C3)$$
(III-41)

Balanço de massa de sal (NaCl) na fase líquida no terceiro reator (S3). O acúmulo de sal no terceiro reator é igual a menos o que permeia através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo. O tampão de eluição que entra no terceiro estágio não contem sal, pois a dessorção é favorecida pela redução da concentração de sal.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de sal por unidade da fase líquida do terceiro reator:

Acúmulo de sal no terceiro reator:	$\frac{dS3}{dt}$
Sal que sai do terceiro reator pela membrana:	$\frac{F3}{V\cdot\varepsilon}S3$
Sal que entra no terceiro reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}S2$

Sal que sai do terceiro reator pelo fluxo de reciclo:

$$\frac{FR}{V}S3$$

Portanto o balanço de massa de sal no terceiro reator fica:

$$\frac{dS3}{dt} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} \left(-S3\right) + \frac{FR}{V} \left(S2 - S3\right)$$
(III-42)

A seguir são apresentadas outras configurações alternativas ao sistema CARE original para purificação de enzimas. As equações diferenciais dos modelos dos próximos sistemas de purificação serão apresentados sem o detalhamento minucioso apresentado anteriormente.

III.1.3. Sistema CARE de Quatro Estágios (CARE4)

O sistema CARE de quatro estágios é apresentado esquematicamente na Figura III-7. Neste sistema é feito a inclusão de dois estágios intermediários de lavagem semelhantes ao estágio de adsorção. A alimentação da solução a ser purificada é feita no primeiro tanque e a eluição é feita no quarto tanque. A mistura reacional é circulada continuamente entre os tanques.



Figura III-7. Representação esquemática do sistema CARE com quatro estágios.

Balanço de massa no estágio de alimentação (estágio de adsorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no primeiro reator (E1).

$$\frac{dE1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (E0 - E1) + \frac{FR}{V} (E4 - E1) - [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-43)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no primeiro reator (O1).

$$\frac{dQ1}{dt} = \frac{FR}{V} (Q4 - Q1) + [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1]$$
(III-44)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no primeiro reator (C1).

$$\frac{dC1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (C0 - C1) + \frac{FR}{V} (C4 - C1) \tag{III-45}$$

Balanço de massa de sal na fase líquida no primeiro reator (S1).

$$\frac{dS1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (S0 - S1) + \frac{FR}{V} (S4 - S1) \tag{III-46}$$

Balanço de massa no estágio de lavagem.

Balanço de massa de enzima na fase líquida no segundo reator (E2).

$$\frac{dE2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} (-E2) + \frac{FR}{V} (E1 - E2) - [k_1 E2 \cdot (Qm - Q2) - k_2 Q2] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-47)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no segundo reator (O2).

$$\frac{dQ2}{dt} = \frac{FR}{V}(Q1 - Q2) + [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2]$$
(III-48)

Balanço de massa de impurezass na fase líquida no segundo reator (C2).

$$\frac{dC2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(-C2\right) + \frac{FR}{V} \left(C1 - C2\right)$$
(III-49)

Balanço de massa de sal na fase líquida no segundo reator (S2).

$$\frac{dS2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} (S0 - S2) + \frac{FR}{V} (S1 - S2)$$
(III-50)

Balanço de massa no estágio de lavagem.

Balanço de massa de enzima na fase líquida no terceiro reator (E3).

$$\frac{dE3}{dt} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} (-E3) + \frac{FR}{V} (E2 - E3) - [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-51)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no terceiro reator (O3).

$$\frac{dQ3}{dt} = \frac{FR}{V}(Q2 - Q3) + [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3]$$
(III-52)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no terceiro reator (C3).

$$\frac{dC3}{dt} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} \left(-C3\right) + \frac{FR}{V} \left(C2 - C3\right)$$
(III-53)

Balanço de massa de sal na fase líquida no terceiro reator (S3).

$$\frac{dS3}{dt} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} (S0 - S3) + \frac{FR}{V} (S2 - S3)$$
(III-54)

Balanço de massa no estágio de eluição (estágio de dessorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no quarto reator (E4).

$$\frac{dE4}{dt} = \frac{F4}{V \cdot \varepsilon} (-E4) + \frac{FR}{V} (E3 - E4) - [k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-55)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no quarto reator (O4).

$$\frac{dQ4}{dt} = \frac{FR}{V}(Q3 - Q4) + [k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4]$$
(III-56)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no quarto reator (C4).

$$\frac{dC4}{dt} = \frac{F4}{V \cdot \varepsilon} \left(-C4\right) + \frac{FR}{V} \left(C3 - C4\right) \tag{III-57}$$

Balanço de massa de sal na fase líquida no quarto reator (S4).

$$\frac{dS4}{dt} = \frac{F4}{V \cdot \varepsilon} (-S4) + \frac{FR}{V} (S3 - S4)$$
(III-58)

III.1.4. Sistema CARE de Três Estágios com Reciclo Modificado (CARE3r).

O sistema CARE de três estágios com reciclo modificado é esquematicamente representado na Figura III-8. Neste sistema de purificação a resina adsorvente contida no meio reacional é reciclada do terceiro tanque para o segundo e do segundo para o primeiro, ao invés de reciclar diretamente do último tanque para o primeiro como no caso descrito anteriormente.

Figura III-8. Representação esquemática do sistema CARE com três estágios com reciclo modificado.

Balanço de massa no estágio de alimentação (estágio de adsorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no primeiro reator (E1).

$$\frac{dE1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (E0 - E1) + \frac{FR}{V} (E2 - E1) - [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-59)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no primeiro reator (O1).

$$\frac{dQ1}{dt} = \frac{FR}{V}(Q2 - Q1) + [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1]$$
(III-60)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no primeiro reator (C1).

$$\frac{dC1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (C0 - C1) + \frac{FR}{V} (C2 - C1)$$
(III-61)

Balanço de massa de sal na fase líquida no primeiro reator (S1).

$$\frac{dS1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (S0 - S1) + \frac{FR}{V} (S2 - S1)$$
(III-62)

Balanço de massa no estágio de lavagem.

Balanço de massa de enzima na fase líquida no segundo reator (E2).

$$\frac{dE2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} (-E2) + \frac{FR}{V} (E1 + E3 - 2 \cdot E2) - [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-63)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no segundo reator (O2).

$$\frac{dQ2}{dt} = \frac{FR}{V} (Q1 + Q3 - 2 \cdot Q2) + [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2]$$
(III-64)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no segundo reator (C2).

$$\frac{dC2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(-C2\right) + \frac{FR}{V} \left(C1 + C3 - 2 \cdot C2\right)$$
(III-65)

Balanço de massa de sal na fase líquida no segundo reator (S2).

$$\frac{dS2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(S0 - S2 \right) + \frac{FR}{V} \left(S1 + S3 - 2 \cdot S2 \right)$$
(III-66)

Balanço de massa no estágio de eluição (estágio de dessorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no terceiro reator (E3).

$$\frac{dE3}{dt} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} (-E3) + \frac{FR}{V} (E2 - E3) - [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-67)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no terceiro reator (Q3).

$$\frac{dQ3}{dt} = \frac{FR}{V} (Q2 - Q3) + [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3]$$
(III-68)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no terceiro reator (C3).

$$\frac{dC3}{dt} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} (-C3) + \frac{FR}{V} (C2 - C3)$$
(III-69)

Balanço de massa de sal na fase líquida no terceiro reator (S3).

$$\frac{dS3}{dt} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} (-S3) + \frac{FR}{V} (S2 - S3)$$
(III-70)

III.1.5. Sistema CARE de Três Estágios com Membrana de Filtração Modificada (CARE3m).

Neste sistema de purificação a membrana de filtração do primeiro reator possui um diâmetro de corte reduzido que permite apenas a passagem de tampão e de sal nele contido (Figura III-9). A enzima e as impurezas, da mesma forma que a resina adsorvente, ficam retidos pela membrana, possibilitando um maior tempo de contato entre a enzima e a resina

adsorvente. Assim a eliminação de impurezas só ocorre a partir do segundo reator quando uma maior quantidade de enzima estiver adsorvida. As membranas do segundo e do terceiro tanque retêm a resina e permitem a passagem de impurezas e enzimas não adsorvidas.



Figura III-9. Representação esquemática do sistema CARE com três estágios com membrana de filtração do primeiro reator modificada. A linha tracejada – – – representa a membrana e a linha dupla tracejada = = = representa a membrana modificada.

Balanço de massa no estágio de alimentação (estágio de adsorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no primeiro reator (E1).

$$\frac{dE1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (E0) + \frac{FR}{V} (E3 - E1) - [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-71)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no primeiro reator (O1).

$$\frac{dQ1}{dt} = \frac{FR}{V} (Q3 - Q1) + [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1]$$
(III-72)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no primeiro reator (C1).

$$\frac{dC1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (C0) + \frac{FR}{V} (C3 - C1)$$
(III-73)

Balanço de massa de sal na fase líquida no primeiro reator (S1).

$$\frac{dS1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (S0 - S1) + \frac{FR}{V} (S3 - S1) \tag{III-74}$$

Balanço de massa no estágio de lavagem.

Balanço de massa de enzima na fase líquida no segundo reator (E2).

$$\frac{dE2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} (-E2) + \frac{FR}{V} (E1 - E2) - [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-75)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no segundo reator (O2).

$$\frac{dQ^2}{dt} = \frac{FR}{V}(Q1 - Q2) + [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2]$$
(III-76)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no segundo reator (C2).

$$\frac{dC2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} (-C2) + \frac{FR}{V} (C1 - C2)$$
(III-77)

Balanço de massa de sal na fase líquida no segundo reator (S2).

$$\frac{dS2}{dt} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(S0 - S2 \right) + \frac{FR}{V} \left(S1 - S2 \right)$$
(III-78)

Balanço de massa no estágio de eluição (estágio de dessorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no terceiro reator (E3).

$$\frac{dE3}{dt} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} (-E3) + \frac{FR}{V} (E2 - E3) - [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-79)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no terceiro reator (O3).

$$\frac{dQ3}{dt} = \frac{FR}{V}(Q2 - Q3) + [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3]$$
(III-80)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no terceiro reator (C3).

$$\frac{dC3}{dt} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} (-C3) + \frac{FR}{V} (C2 - C3)$$
(III-81)

Balanço de massa de sal na fase líquida no terceiro reator (S3).

$$\frac{dS3}{dt} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} (-S3) + \frac{FR}{V} (S2 - S3)$$
(III-82)

III.1.6. Sistema CARE de Dois Estágios com Eluição em Reator de Fluxo Pistonado (CARE2pfr)

Nesta tese é feita a proposta de substituição do reator tanque de mistura com membrana por um reator de fluxo pistonado com membrana. O reator de fluxo pistonado com membrana consiste de um duto tubular que possui membranas posicionadas em lados opostos do duto tubular conforme representado esquematicamente na Figura III-10. Enquanto o meio reacional formado por sólido e líquido percorre o duto, o tampão de eluição é adicionado perpendicularmente através da membrana e promove a eluição ao longo do reator.



Figura III-10. Detalhe do duto tubular com membrana.

As equações diferenciais parciais obtidas pelo balanço de massa no reator tubular foram discretizadas em dez partes e as equações diferenciais obtidas foram resolvidas pelo método de Runge-Kutta de quarta ordem. As equações diferenciais parciais foram discretizadas em dez partes pois obteve-se o mesmo resultado com discretizações em cem e mil partes.

O sistema CARE de dois estágios com eluição em reator de fluxo pistonado com membrana é representado esquematicamente na Figura III-11. Neste sistema o reator de eluição de mistura com membrana é substituído por um reator tubular com membranas de filtração. Neste reator a resina contida no meio reacional se desloca de forma pistonada ao longo do reator. O tampão de eluição é adicionado ao longo do reator e flui perpendicularmente ao fluxo de resina.



Figura III-11. Sistema CARE de dois estágios com eluição em reator de fluxo pistonado.

Balanço de massa no estágio de alimentação (estágio de adsorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no primeiro reator (*E1*). O acúmulo de enzima na fase líquida no primeiro reator é igual ao que entra pela alimentação menos o que sai através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, menos o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase líquida no primeiro reator:

Acúmulo de enzima na fase líquida no primeiro reator: $\frac{dE1}{dt}$

Enzima na fase líquida que entra no primeiro reator pela alimentação: $\frac{F1}{V \cdot \epsilon} E0$

Enzima na fase líquida que sai do primeiro reator pela membrana: $\frac{F1}{V_{res}}E1$

Enzima na fase líquida que entra no primeiro reator pelo fluxo de reciclo:

Enzima na fase líquida que sai do primeiro reator pelo fluxo de reciclo:

Portanto o balanço de massa de enzima na fase líquida no primeiro reator fica:

$$\frac{dE1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (E0 - E1) + \frac{FR}{V} (E2|_{z=L} - E1) - [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-83)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no primeiro reator (*Q1*). O acúmulo de enzima na fase sólida no primeiro reator é igual ao que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, mais o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase sólida no primeiro reator:

Acúmulo de enzima na fase sólida no primeiro reator:
$$\frac{dQ1}{dt}$$

Enzima na fase sólida que entra no primeiro reator pelo fluxo de reciclo:

Enzima na fase sólida que sai do primeiro reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V}Ql$

Enzima que adsorve na resina:

Portanto o balanço de massa de enzima na fase sólida no primeiro reator fica:

$$\frac{dQ1}{dt} = \frac{FR}{V} (Q2|_{z=L} - Q1) + [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1]$$
(III-84)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no primeiro reator (*C1*). O acúmulo de impurezas na fase líquida no primeiro reator é igual ao que entra na alimentação menos o que permeia através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de impurezas por unidade de volume da fase líquida do primeiro reator:

 $\frac{FR}{V}E2|_{z=L}$

 $\frac{FR}{V}E1$

 $\frac{FR}{V}Q^2\Big|_{z=L}$

 $[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1]$

Acúmulo de impurezas no primeiro reator:	$\frac{dC1}{dt}$
Impurezas que entram no primeiro reator pela alimentação:	$\frac{F1}{V\cdot\varepsilon}C0$
Impurezas que saem do primeiro reator pela membrana:	$\frac{F1}{V\cdot\varepsilon}C1$
Impurezas que entram no primeiro reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}C2\big _{z=L}$
Impurezas que saem do primeiro reator pelo fluxo de reciclo:	$\frac{FR}{V}C1$

Portanto o balanço de massa de Impurezas no primeiro reator fica:

$$\frac{dC1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} \left(C0 - C1 \right) + \frac{FR}{V} \left(C2 \big|_{z=L} - C1 \right)$$
(III-85)

Balanço de massa de sal na fase líquida no primeiro reator (S1). O acúmulo de sal no primeiro reator é igual ao que entra no tampão de alimentação menos o que permeia através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de sal por unidade de volume da fase líquida no primeiro reator:

Acúmulo de sal no primeiro reator:
$$\frac{dS1}{dt}$$
Sal que entra no primeiro reator pela alimentação: $\frac{F1}{V \cdot \varepsilon} S0$ Sal que sai do primeiro reator pela membrana: $\frac{F1}{V \cdot \varepsilon} S1$ Sal que entra no primeiro reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V} S2|_{z=L}$ Sal que sai do primeiro reator pelo fluxo de reciclo: $\frac{FR}{V} S1$ Portanto o balanço de massa de sal no primeiro reator fica: $\frac{FR}{V} S1$

$$\frac{dS1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} \left(S0 - S1 \right) + \frac{FR}{V} \left(S2 \big|_{z=L} - S1 \right)$$
(III-86)

Balanço de massa no estágio de eluição (estágio de dessorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle (E2). O acúmulo de enzima na fase líquida no volume de controle é igual a menos o que sai através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, menos o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase líquida do segundo reator:

Acúmulo de enzima na fase líquida no volume de controle: $\frac{\partial E2}{\partial t}$

Enzima na fase líquida que sai do volume de controle pela membrana: $\frac{F2}{V_{1,2}}E2$

Enzima na fase líquida que entra menos a que sai no volume de controle pelo fluxo de reciclo $\frac{FR}{V}\left(-L\frac{\partial E2}{\partial z}\right)$, com a condição de contorno: $E2|_{z=0}=E1$

Enzima que adsorve na resina no volume de controle: $[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle fica:

$$\frac{\partial E2}{\partial t} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(-E2\right) + \frac{FR}{V} \left(-L\frac{\partial E2}{\partial z}\right) - \left[k1E2 \cdot \left(Qm - Q2\right) - k2Q2\right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-87)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle (*Q2*). O acúmulo de enzima na fase sólida no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo, mais o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima por unidade de volume da fase sólida:

Enzima na fase sólida que entra menos a que sai no volume de controle pelo fluxo de reciclo $\frac{FR}{V}\left(-L\frac{\partial Q^2}{\partial \tau}\right)$, com a condição de contorno: $Q^2|_{z=0}=QI$

 $[k_1E_2 \cdot (Qm - Q_2) - k_2Q_2]$ Enzima que adsorve na resina no volume de controle: Portanto o balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle fica:

$$\frac{dQ2}{dt} = \frac{FR}{V} \left(-L \frac{dQ2}{dz} \right) + \left[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2 \right]$$
(III-88)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no segundo reator (C2). O acúmulo de impurezas no volume de controle é igual a menos o que sai através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de impurezas no volume de controle (C2).

Acúmulo de impurezas no volume de controle:

Impurezas que saem do volume de controle pela membrana:

Impurezas que entram menos as que saem no volume de controle pelo fluxo de reciclo $\frac{FR}{V}\left(-L\frac{\partial C2}{\partial z}\right)$, com a condição de contorno: $C2|_{z=0}=CI$

Portanto o balanço de massa de impurezas no volume de controle fica:

$$\frac{\partial C2}{\partial t} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(-C2\right) + \frac{FR}{V} \left(-L\frac{\partial C2}{\partial z}\right)$$
(III-89)

Balanço de massa de sal na fase líquida no segundo reator (S2). O acúmulo de sal no volume de controle é igual a menos o que sai através da membrana, mais o que entra menos o que sai pelo fluxo de reciclo.

$$\frac{\partial C2}{\partial t}$$

 $\frac{F2}{V}C2$

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de sal por unidade de volume da fase líquida:

Acúmulo de sal no volume de controle: $\frac{\partial S}{\partial t}$

Sal que sai do volume de controle pela membrana:

Sal que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo de reciclo
$$\frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial S2}{\partial z}\right)$$

com a condição de contorno: $S2|_{z=0} = SI$

Portanto o balanço de massa de sal no volume de controle fica:

$$\frac{\partial S2}{\partial t} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(-S2\right) + \frac{FR}{V} \left(-L\frac{\partial S2}{\partial z}\right)$$
(III-90)

 $\frac{F2}{V \cdot \epsilon}S2$

III.1.7. Sistema CARE de Três Estágios com Lavagem e Eluição em Reator de Fluxo Pistonado (CARE3pfr)

O sistema CARE de três estágios com lavagem e eluição em reator de fluxo pistonado é representado esquematicamente na Figura III-12. Neste sistema os reatores de mistura com membrana de lavagem e eluição são substituídos por reatores tubulares com membranas de filtração. A resina contida no meio reacional se desloca de forma pistonada ao longo do reator. Os tampões de lavagem e eluição são adicionados ao longo dos reatores e fluem perpendicularmente ao fluxo de resina.



Figura III-12. Sistema CARE de três estágios com lavagem e eluição em reator de fluxo pistonado.

Balanço de massa no estágio de alimentação (estágio de adsorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no primeiro reator (E1).

$$\frac{dE1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (E0 - E1) + \frac{FR}{V} (E3|_{z=L} - E1) - [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-91)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no primeiro reator (O1).

$$\frac{dQ1}{dt} = \frac{FR}{V} \left(Q3 \big|_{z=L} - Q1 \right) + \left[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1 \right]$$
(III-92)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no primeiro reator (C1).

$$\frac{dC1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} \left(C0 - C1 \right) + \frac{FR}{V} \left(C3 \big|_{z=L} - C1 \right)$$
(III-93)

Balanço de massa de sal na fase líquida no primeiro reator (S1).

$$\frac{dS1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} \left(S0 - S1 \right) + \frac{FR}{V} \left(S3 \big|_{z=L} - S1 \right)$$
(III-94)

Balanço de massa no estágio de lavagem.

Balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle (E2).

$$\frac{\partial E2}{\partial t} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} (-E2) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial E2}{\partial z} \right) - \left[k_1 E2 \cdot (Qm - Q2) - k_2 Q2 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)$$
(III-95)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle (Q2).

$$\frac{\partial Q2}{\partial t} = \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial Q2}{\partial z} \right) + \left[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2 \right]$$
(III-96)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no volume de controle (C2).

$$\frac{\partial C2}{\partial t} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(-C2\right) + \frac{FR}{V} \left(-L\frac{\partial C2}{\partial z}\right)$$
(III-97)

Balanço de massa de sal na fase líquida no volume de controle (S2).

$$\frac{\partial S2}{\partial t} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(S0 - S2 \right) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial S2}{\partial z} \right)$$
(III-98)

Balanço de massa no estágio de eluição (estágio de dessorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle (E3).

$$\frac{\partial E3}{\partial t} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} (-E3) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial E3}{\partial z} \right) - \left[k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)$$
(III-99)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle (O3).

$$\frac{\partial Q3}{\partial t} = \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial Q3}{\partial z} \right) + \left[k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3 \right]$$
(III-100)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no volume de controle (C3).

$$\frac{\partial C3}{\partial t} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} \left(-C3\right) + \frac{FR}{V} \left(-L\frac{\partial C3}{\partial z}\right)$$
(III-101)

Balanço de massa de sal na fase líquida no volume de controle (S3).

$$\frac{\partial S3}{\partial t} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} \left(-S3\right) + \frac{FR}{V} \left(-L\frac{\partial S3}{\partial z}\right)$$
(III-102)

III.1.8. Sistema CARE de Três Estágios com Lavagem e Eluição em Reator de Fluxo Pistonado com Membrana de Filtração Modificada (CARE3pfrm)

O sistema CARE de três estágios com lavagem e eluição em reator de fluxo pistonado com membrana modificada é representado esquematicamente na Figura III-13. Neste sistema os reatores de mistura com membrana de lavagem e eluição são substituídos por dutos tubulares com membranas de filtração dispostas em lados opostos do duto tubular. A membrana de filtração do primeiro reator possui um diâmetro de corte reduzido que permite apenas a passagem de tampão e de sal nele contido.



Figura III-13. Sistema CARE de três estágios com lavagem e eluição em reator de fluxo pistonado com membrana modificada.

Balanço de massa no estágio de alimentação (estágio de adsorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no primeiro reator (E1).

$$\frac{dE1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (E0) + \frac{FR}{V} (E3|_{z=L} - E1) - [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-103)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no primeiro reator (O1).

$$\frac{dQ1}{dt} = \frac{FR}{V} (Q3|_{z=L} - Q1) + [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1]$$
(III-104)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no primeiro reator (C1).

$$\frac{dC1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} (C0) + \frac{FR}{V} (C3|_{z=L} - C1)$$
(III-105)

Balanço de massa de sal na fase líquida no primeiro reator (S1).

$$\frac{dS1}{dt} = \frac{F1}{V \cdot \varepsilon} \left(S0 - S1 \right) + \frac{FR}{V} \left(S3 \big|_{z=L} - S1 \right)$$
(III-106)

Balanço de massa no estágio de lavagem.

Balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle (E2).

$$\frac{\partial E2}{\partial t} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} (-E2) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial E2}{\partial z} \right) - \left[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)$$
(III-107)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle (Q2).

$$\frac{\partial Q2}{\partial t} = \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial Q2}{\partial z} \right) + \left[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2 \right]$$
(III-108)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no volume de controle (C2).

$$\frac{\partial C2}{\partial t} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(-C2\right) + \frac{FR}{V} \left(-L\frac{\partial C2}{\partial z}\right)$$
(III-109)

Balanço de massa de sal na fase líquida no volume de controle (S2).

$$\frac{\partial S2}{\partial t} = \frac{F2}{V \cdot \varepsilon} \left(S0 - S2 \right) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial S2}{\partial z} \right)$$
(III-110)

Balanço de massa no estágio de eluição (estágio de dessorção).

Balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle (E3).

$$\frac{\partial E3}{\partial t} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} (-E3) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial E3}{\partial z} \right) - \left[k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)$$
(III-111)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle (Q3).

$$\frac{\partial Q3}{\partial t} = \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial Q3}{\partial z} \right) + \left[k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3 \right]$$
(III-112)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no volume de controle (C3).

$$\frac{\partial C3}{\partial t} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} \left(-C3\right) + \frac{FR}{V} \left(-L\frac{\partial C3}{\partial z}\right)$$
(III-113)

Balanço de massa de sal na fase líquida no volume de controle (S3).

$$\frac{\partial S3}{\partial t} = \frac{F3}{V \cdot \varepsilon} \left(-S3\right) + \frac{FR}{V} \left(-L\frac{\partial S3}{\partial z}\right)$$
(III-114)

III.2. Configurações Derivadas do Sistema LMS

Fez-se simulações computacionais do sistema de purificação de leito móvel simulado, que é um sistema de purificação contínuo com o intuito de comparar seu desempenho com estas diferentes configurações de sistemas de purificação de proteínas contínuos derivadas do sistema CARE original. Vale lembrar que no sistema de leito móvel simulado o fluxo de sólido não ocorre de fato entre as colunas mas tem seu movimento simulado pelas válvulas rotativas que simulam o deslocamento das colunas em sentido contrário ao fluxo de líquido. No sistema CARE original e de configurações derivadas apresentadas até aqui o fluxo de sólido é real, havendo a transferência de resina entre os tanques. Como no modelo de adsorção da lipase em Butyl-Sepharose a eluição ocorre com tampão de eluição com características diferentes daquelas encontradas na adsorção e lavagem, o leito móvel de três zonas é o mais adequado para esta comparação. No leito móvel simulado de três zonas a mistura entre o tampão da zona de dessorção com as outras zonas do leito móvel simulado é reduzida melhorando o desempenho do sistema. Toda modificação na concentração de sal, devido a mistura entre os tampões, são computadas pelo programa e afetam os parâmetros cinéticos.

III.2.1. Sistema LMS de Três Zonas e Quatro Colunas (LMS4-e)

O sistema LMS de três zonas e quatro colunas é representado esquematicamente na Figura III-14. A alimentação é feita na primeira coluna, o tampão de lavagem é feito na segunda coluna e o tampão de eluição é feito na terceira coluna. A solução rica em enzima (extrato) é coletada na saída da terceira coluna e a solução com as impurezas (refinado) é coletada na saída da quarta coluna.



Figura III-14. Representação esquemática do LMS de três zonas e quatro colunas. As colunas são indicadas pelos algarismos arábicos e as zonas pelos algarismos romanos.

Balanço de massa na coluna 1 - zona dois:

FZ2 = FA + FZ3

onde FZ2 é o fluxo na zona dois, FA o fluxo de alimentação e FZ3 o fluxo na zona três. Balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle (E1). O acúmulo de enzima na fase líquida no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona dois, menos o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle:

	$\partial E1$
A cumulo de enzima na fase lídulda no volume de controle:	*****
	∂t

Enzima na fase líquida que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona

dois
$$\frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E1}{\partial z} \right)$$
, com a condição de contorno: $E1|_{z=0} = (FA \cdot E0 + FZ3 \cdot E2|_{z=L})/FZ2$

Enzima que adsorve na resina no volume de controle:

$$[k1E1\cdot(Qm-Q1)-k2Q1]\cdot\left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle fica:

$$\frac{\partial E1}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E1}{\partial z} \right) - \left[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)$$
(III-115)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle (*Q1*). O acúmulo de enzima na fase sólida no volume de controle é devido ao que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle:

Acúmulo de enzima na fase sólida no volume de controle: $\frac{dQl}{dt}$

Enzima que adsorve na resina no volume de controle: $[k_1E_1 \cdot (Qm - Q_1) - k_2Q_1]$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle fica:

$$\frac{dQ1}{dt} = \left[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1\right]$$
(III-116)

<u>Balanço de massa de impurezas na fase líquida no volume de controle (*C1*). O acúmulo de impurezas no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona dois.</u>

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de impurezas no volume de controle:

Acúmulo de impurezas no volume de controle:
$$\frac{\partial C1}{\partial t}$$

Impurezas que entram menos o que saem no volume de controle pelo fluxo na zona dois $\frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C1}{\partial z} \right), \text{ com a condição de contorno: } C1|_{z=0} = (FA \cdot C0 + FZ3 \cdot C2|_{z=L})/FZ2$

Portanto o balanço de massa de impurezas no volume de controle fica:

$$\frac{\partial C1}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C1}{\partial z} \right)$$
(III-117)

Balanço de massa de sal na fase líquida no volume de controle (S1). O acúmulo de sal no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona dois.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de sal no volume de controle:

Acúmulo de sal no volume de controle: $\frac{\partial S1}{\partial t}$

Sal que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona dois $\frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S1}{\partial z}\right), \text{ com a condição de contorno: } S1|_{z=0} = (FA \cdot S0 + FZ3 \cdot S2|_{z=L})/FZ2$

Portanto o balanço de massa de sal no volume de controle fica:

$$\frac{\partial S1}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S1}{\partial z} \right)$$
(III-118)

Balanço de massa na coluna 4 - zona dois:

Balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle (E4). O acúmulo de enzima na fase líquida no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona dois, menos o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle:

Acúmulo de enzima na fase líquida no volume de controle: $\frac{\partial E4}{\partial t}$

Enzima na fase líquida que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona dois $\frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E4}{\partial z} \right)$, com a condição de contorno: $E4|_{z=0} = E1|_{z=L}$

Enzima que adsorve na resina no volume de controle: $[k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle fica:

$$\frac{\partial E4}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E4}{\partial z} \right) - \left[k 1 E4 \cdot (Qm - Q4) - k 2Q4 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)$$
(III-119)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle (Q4). O acúmulo de enzima na fase sólida no volume de controle é devido ao que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle:

Acúmulo de enzima na fase sólida no volume de controle: $\frac{dQ4}{dt}$

Enzima que adsorve na resina no volume de controle: $[k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4]$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle fica:

$$\frac{dQ4}{dt} = [k_1 E 4 \cdot (Qm - Q4) - k_2 Q4]$$
(III-120)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no volume de controle (C4). O acúmulo de impurezas no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona dois.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de impurezas no volume de controle:

Acúmulo de impurezas no volume de controle: $\frac{\partial C4}{\partial t}$

Impurezas que entram menos o que saem no volume de controle pelo fluxo na zona dois $\frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C4}{\partial z} \right), \text{ com a condição de contorno: } C4|_{z=0} = C1|_{z=L}$

Portanto o balanço de massa de impurezas no volume de controle fica:

$$\frac{\partial C4}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C4}{\partial z} \right)$$
(III-121)

Balanço de massa de sal na fase líquida no volume de controle (S4). O acúmulo de sal no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona dois.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de sal no volume de controle:

$$\frac{\partial S^4}{\partial t}$$

Sal que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona dois $\frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S4}{\partial z} \right), \text{ com a condição de contorno: } S4|_{z=0} = S1|_{z=L}$

Portanto o balanço de massa de sal no volume de controle fica:

$$\frac{\partial S4}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S4}{\partial z} \right)$$
(III-122)

Balanço de massa na coluna 3 - zona quatro:

Balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle (E3). O acúmulo de enzima na fase líquida no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona quatro, menos o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle:

Acúmulo de enzima na fase líquida no volume de controle: $\frac{\partial E3}{\partial t}$

Enzima na fase líquida que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona

quatro
$$\frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E3}{\partial z} \right)$$
, com a condição de contorno: $E3|_{z=0}=0$

Enzima que adsorve na resina no volume de controle: $[k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle fica:

$$\frac{\partial E3}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E3}{\partial z} \right) - \left[k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)$$
(III-123)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle (*Q3*). O acúmulo de enzima na fase sólida no volume de controle é devido ao que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle:
Acúmulo de enzima na fase sólida no volume de controle:

Enzima que adsorve na resina no volume de controle: $[k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3]$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle fica:

$$\frac{dQ3}{dt} = [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3]$$
(III-124)

Balanço de massa de impurezas na fase líquida no volume de controle (C3). O acúmulo de impurezas no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona quatro.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de impurezas no volume de controle:

Acúmulo de impurezas no volume de controle: $\frac{\partial C3}{\partial t}$

Impurezas que entram menos o que saem no volume de controle pelo fluxo na zona quatro $\frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C3}{\partial z}\right), \text{ com a condição de contorno: } C3|_{z=0}=0$

Portanto o balanço de massa de impurezas no volume de controle fica:

$$\frac{\partial C3}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C3}{\partial z} \right)$$
(III-125)

Balanço de massa de sal na fase líquida no volume de controle (S3). O acúmulo de sal no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona quatro.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de sal no volume de controle:

Acúmulo de sal no volume de controle: $\frac{\partial S3}{\partial t}$

Sal que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona quatro $\frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S3}{\partial z}\right), \text{ com a condição de contorno: } S3|_{z=0}=0$

Portanto o balanço de massa de sal no volume de controle fica:

$$\frac{\partial S3}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S3}{\partial z} \right)$$
(III-126)

Balanço de massa na coluna 2 - zona três:

Balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle (*E2*). O acúmulo de enzima na fase líquida no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona três, menos o que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle:

Acúmulo de enzima na fase líquida no volume de controle: $\frac{\partial E2}{\partial t}$

Enzima na fase líquida que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona

três
$$\frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E2}{\partial z} \right)$$
, com a condição de contorno: $E2|_{z=0}=0$

Enzima que adsorve na resina no volume de controle: $[k_1E2 \cdot (Qm - Q2) - k_2Q2] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase líquida no volume de controle fica:

$$\frac{\partial E2}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E2}{\partial z} \right) - \left[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)$$
(III-127)

Balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle (*Q4*). O acúmulo de enzima na fase sólida no volume de controle é devido ao que adsorve na resina.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle:

Acúmulo de enzima na fase sólida no volume de controle: $\frac{dQ^2}{dt}$

Enzima que adsorve na resina no volume de controle: $[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2]$

Portanto o balanço de massa de enzima na fase sólida no volume de controle fica:

$$\frac{dQ2}{dt} = [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2]$$
(III-128)

<u>Balanço de massa de impurezas na fase líquida no volume de controle (C2)</u>. O acúmulo de impurezas no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona três.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de impurezas no volume de controle:

Acúmulo de impurezas no volume de controle: $\frac{\partial C2}{\partial t}$

Impurezas que entram menos o que saem no volume de controle pelo fluxo na zona três $\frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C2}{\partial z}\right), \text{ com a condição de contorno: } C2|_{z=0}=0$

Portanto o balanço de massa de impurezas no volume de controle fica:

$$\frac{\partial C2}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C2}{\partial z} \right)$$
(III-129)

Balanço de massa de sal na fase líquida no volume de controle (S2). O acúmulo de sal no volume de controle é igual ao que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona três.

A seguir são apresentados os termos do balanço de massa de sal no volume de controle:

Acúmulo de sal no volume de controle: $\frac{\partial S2}{\partial t}$

Sal que entra menos o que sai no volume de controle pelo fluxo na zona três $\frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S2}{\partial z}\right), \text{ com a condição de contorno: } S2|_{z=0} = S0$

Portanto o balanço de massa de sal no volume de controle fica:

$$\frac{\partial S2}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S2}{\partial z} \right)$$
(III-130)

III.2.2. Sistema LMS de Três Zonas e Oito Colunas - Duas Colunas de Eluição (LMS8-2e)

O sistema LMS de três zonas e oito colunas, com duas colunas na zona de eluição, é representado esquematicamente na Figura III-15. A alimentação é feita na primeira coluna, o tampão de lavagem é introduzido na terceira coluna e o tampão de eluição é introduzido na quinta coluna. A solução rica em enzima (extrato) é coletada na saída da quarta coluna e a solução com as impurezas (refinado) é coletada na saída da sexta coluna.



Figura III-15. Sistema LMS de três zonas e oito colunas - duas colunas de eluição.

Balanco de massa na coluna 1 - zona dois:

dt

FZ2 = FA + FZ3 $E1|_{z=0} = (FA \cdot E0 + FZ3 \cdot E2|_{z=L})/FZ2$ $C1|_{z=0} = (FA \cdot C0 + FZ3 \cdot C2|_{z=L})/FZ2$ $SI|_{z=0} = (FA \cdot SO + FZ3 \cdot S2|_{z=L})/FZ2$ $\frac{\partial E1}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E1}{\partial z} \right) - \left[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)$ (III-131)

$$V \cdot \varepsilon \left(\begin{array}{c} D \\ \partial z \end{array}\right) \quad \left[V \cdot 2QI \right] \left(\begin{array}{c} \varepsilon \end{array}\right)$$

$$\frac{dQl}{dt} = \left[k1E1 \cdot (Qm - Ql) - k2Ql \right] \quad (III-132)$$

$$\frac{\partial C1}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C1}{\partial z} \right)$$
(III-133)

$$\frac{\partial S1}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S1}{\partial z} \right)$$
(III-134)

Balanço de massa na coluna 8 – zona dois:

$$E8|_{z=0} = E1|_{z=L} \qquad C8|_{z=0} = C1|_{z=L} \qquad S8|_{z=0} = S1|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E8}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E8}{\partial z} \right) - \left[k1E8 \cdot (Qm - Q8) - k2Q8 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \qquad (\text{III-135})$$

$$\frac{dQ8}{dt} = [k1E8 \cdot (Qm - Q8) - k2Q8]$$
(III-136)

$$\frac{\partial C8}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C8}{\partial z} \right)$$
(III-137)

$$\frac{\partial S8}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S8}{\partial z} \right)$$
(III-138)

Balanço de massa na coluna 7 – zona dois:

$$E7|_{z=0} = E8|_{z=L} \qquad C7|_{z=0} = C8|_{z=L} \qquad S7|_{z=0} = S8|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E7}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E7}{\partial z} \right) - \left[k1E7 \cdot (Qm - Q7) - k2Q7\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-139})$$

$$\frac{dQ7}{dt} = [k1E7 \cdot (Qm - Q7) - k2Q7]$$
(III-140)

$$\frac{\partial C7}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C7}{\partial z} \right)$$
(III-141)

$$\frac{\partial S7}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S7}{\partial z} \right)$$
(III-142)

Balanço de massa na coluna 6 – zona dois:

$$E6|_{z=0} = E7|_{z=L} \qquad C6|_{z=0} = C7|_{z=L} \qquad S6|_{z=0} = S7|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E6}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E6}{\partial z} \right) - \left[k1E6 \cdot (Qm - Q6) - k2Q6 \right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \qquad (\text{III-143})$$

$$\frac{dQ6}{dt} = \left[k1E6 \cdot (Qm - Q6) - k2Q6\right] \tag{III-144}$$

$$\frac{\partial C6}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C6}{\partial z} \right)$$
(III-145)

100

$$\frac{\partial S6}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S6}{\partial z} \right)$$
(III-146)

Balanço de massa na coluna 5 – zona quatro:

$$E5|_{z=0} = 0 \qquad C5|_{z=0} = 0 \qquad S5|_{z=0} = 0$$
$$\frac{\partial E5}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E5}{\partial z} \right) - \left[k1E5 \cdot (Qm - Q5) - k2Q5\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-147})$$

$$\frac{dQ5}{dt} = [k1E5 \cdot (Qm - Q5) - k2Q5]$$
(III-148)

$$\frac{\partial C5}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C5}{\partial z} \right)$$
(III-149)

$$\frac{\partial S5}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S5}{\partial z} \right)$$
(III-150)

Balanço de massa na coluna 4 – zona quatro:

$$E4|_{z=0} = E5|_{z=L} \qquad C4|_{z=0} = C5|_{z=L} \qquad S4|_{z=0} = S5|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E4}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E4}{\partial z} \right) - \left[k1E4 \cdot (Qm-Q4) - k2Q4\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-151})$$

$$\frac{dQ4}{dt} = \left[k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4\right] \tag{III-152}$$

$$\frac{\partial C4}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C4}{\partial z} \right)$$
(III-153)

$$\frac{\partial S4}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S4}{\partial z} \right)$$
(III-154)

Balanço de massa na coluna 3 – zona três:

$$E3|_{z=0} = 0 \qquad C3|_{z=0} = 0 \qquad S3|_{z=0} = S0$$
$$\frac{\partial E3}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E3}{\partial z} \right) - \left[k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-155})$$

$$\frac{dQ_3}{dt} = [k_1 E_3 \cdot (Qm - Q_3) - k_2 Q_3] \quad . \tag{III-156}$$

$$\frac{\partial C3}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C3}{\partial z} \right)$$
(III-157)

$$\frac{\partial S3}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S3}{\partial z} \right)$$
(III-158)

Balanço de massa na coluna 2 - zona três:

$$E2|_{z=0} = E3|_{z=L} \qquad C2|_{z=0} = C3|_{z=L} \qquad S2|_{z=0} = S3|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E2}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E2}{\partial z}\right) - \left[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-159})$$

$$\frac{dQ2}{dt} = [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2]$$
(III-160)

$$\frac{\partial C2}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C2}{\partial z} \right)$$
(III-161)

$$\frac{\partial S2}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S2}{\partial z} \right)$$
(III-162)

III.2.3. Sistema LMS de Quatro Zonas e Oito Colunas (LMS8)

O sistema LMS de quatro zonas e oito colunas, com duas colunas em cada zona, é representado esquematicamente na Figura III-16. A alimentação é feita na primeira coluna, o tampão de eluição é feito na quinta coluna. A solução rica em enzima é coletada na saída da quarta coluna (extrato) e a solução com as impurezas (refinado) é coletada na saída da oitava coluna.



Figura III-16. Sistema LMS de quatro zonas e oito colunas

Balanço de massa na coluna 1 - zona dois:

$$FZ2 = FA + FZ3 \qquad E1|_{z=0} = (FA \cdot E0 + FZ3 \cdot E2|_{z=L})/FZ2$$
$$C1|_{z=0} = (FA \cdot C0 + FZ3 \cdot C2|_{z=L})/FZ2 \qquad S1|_{z=0} = (FA \cdot S0 + FZ3 \cdot S2|_{z=L})/FZ2$$

$$\frac{\partial E1}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E1}{\partial z} \right) - \left[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)$$
(III-163)

$$\frac{dQ1}{dt} = \left[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1\right]$$
(III-164)

$$\frac{\partial C1}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C1}{\partial z} \right)$$
(III-165)

$$\frac{\partial S1}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S1}{\partial z} \right)$$
(III-166)

Balanço de massa na coluna 8 - zona dois:

$$E8|_{z=0} = E1|_{z=L} \qquad C8|_{z=0} = C1|_{z=L} \qquad S8|_{z=0} = S1|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E8}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E8}{\partial z} \right) - \left[k1E8 \cdot (Qm - Q8) - k2Q8\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-167})$$

$$\frac{dQ8}{dt} = [k1E8 \cdot (Qm - Q8) - k2Q8]$$
(III-168)

$$\frac{\partial C8}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C8}{\partial z} \right)$$
(III-169)

$$\frac{\partial S8}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S8}{\partial z} \right)$$
(III-170)

Balanço de massa na coluna 7 – zona um:

$$E7|_{z=0} = E8|_{z=L} \qquad C7|_{z=0} = C8|_{z=L} \qquad S7|_{z=0} = S8|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E7}{\partial t} = \frac{FZ1}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E7}{\partial z} \right) - \left[k1E7 \cdot (Qm - Q7) - k2Q7\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-171})$$

$$\frac{dQ7}{dt} = [k_1 E7 \cdot (Qm - Q7) - k_2 Q7]$$
(III-172)

$$\frac{\partial C7}{\partial t} = \frac{FZ1}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C7}{\partial z} \right)$$
(III-173)

$$\frac{\partial S7}{\partial t} = \frac{FZ1}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S7}{\partial z} \right)$$
(III-174)

Balanço de massa na coluna 6 – zona um:

$$E6|_{z=0} = E7|_{z=L} \qquad C6|_{z=0} = C7|_{z=L} \qquad S6|_{z=0} = S7|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E6}{\partial t} = \frac{FZ1}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E6}{\partial z} \right) - \left[k1E6 \cdot (Qm - Q6) - k2Q6\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-175})$$

$$\frac{dQ6}{dt} = [k1E6 \cdot (Qm - Q6) - k2Q6]$$
(III-176)

$$\frac{\partial C6}{\partial t} = \frac{FZ1}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C6}{\partial z} \right)$$
(III-177)

$$\frac{\partial S6}{\partial t} = \frac{FZ1}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S6}{\partial z} \right)$$
(III-178)

Balanço de massa na coluna 5 – zona quatro:

$$FZ4 = FD + FZ1$$

$$E5|_{z=0} = (FZ1 \cdot E6|_{z=L})/FZ4$$

$$S5|_{z=0} = (FZ1 \cdot S6|_{z=L})/FZ4$$

$$\frac{\partial E5}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E5}{\partial z}\right) - \left[k1E5 \cdot (Qm-Q5) - k2Q5\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-179)

$$\frac{dQ5}{dt} = [k1E5 \cdot (Qm - Q5) - k2Q5]$$
(III-180)

$$\frac{\partial C5}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C5}{\partial z} \right)$$
(III-181)

$$\frac{\partial S5}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S5}{\partial z} \right)$$
(III-182)

Balanço de massa na coluna 4 – zona quatro:

$$E4|_{z=0} = E5|_{z=L} \qquad C4|_{z=0} = C5|_{z=L} \qquad S4|_{z=0} = S5|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E4}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E4}{\partial z}\right) - \left[k1E4 \cdot (Qm-Q4) - k2Q4\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-183})$$

$$\frac{dQ4}{dt} = \left[k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4\right] \tag{III-184}$$

$$\frac{\partial C4}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C4}{\partial z} \right)$$
(III-185)

$$\frac{\partial S4}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S4}{\partial z} \right)$$
(III-186)

Balanço de massa na coluna 3 – zona três:

$$E3|_{z=0} = E4|_{z=L} \qquad C3|_{z=0} = C4|_{z=L} \qquad S3|_{z=0} = S4|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E3}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E3}{\partial z} \right) - \left[k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-187})$$

$$\frac{dQ3}{dt} = [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3]$$
(III-188)

$$\frac{\partial C3}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C3}{\partial z} \right)$$
(III-189)

$$\frac{\partial S3}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S3}{\partial z} \right)$$
(III-190)

Balanço de massa na coluna 2 - zona três:

$$E2|_{z=0} = E3|_{z=L} \qquad C2|_{z=0} = C3|_{z=L} \qquad S2|_{z=0} = S3|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E2}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E2}{\partial z} \right) - \left[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-191})$$

$$\frac{dQ2}{dt} = [k_1 E_2 \cdot (Qm - Q_2) - k_2 Q_2]$$
(III-192)

$$\frac{\partial C2}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C2}{\partial z} \right)$$
(III-193)

$$\frac{\partial S2}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S2}{\partial z} \right)$$
(III-194)

III.2.4. Sistema LMS de Três Zonas e Oito Colunas – Uma Coluna de Eluição (LMS8e)

O sistema LMS de três zonas e oito colunas, com uma coluna na zona de eluição, é representado esquematicamente na Figura III-17. A alimentação é feita na primeira coluna, o tampão de lavagem é introduzido na quarta coluna e o tampão de eluição é introduzido na quarta coluna e o tampão de eluição é introduzido na quinta coluna. A solução rica em enzima (extrato) é coletada na saída da quinta coluna e a solução com as impurezas (refinado) é coletada na saída da sexta coluna.



Figura III-17. Sistema LMS de três zonas e oito colunas – uma coluna de eluição

Balanço de massa na coluna 1 - zona dois:

 $FZ2 = FA + FZ3 \qquad E1|_{z=0} = (FA \cdot E0 + FZ3 \cdot E2|_{z=L})/FZ2$ $C1|_{z=0} = (FA \cdot C0 + FZ3 \cdot C2|_{z=L})/FZ2 \qquad S1|_{z=0} = (FA \cdot S0 + FZ3 \cdot S2|_{z=L})/FZ2$

$$\frac{\partial E1}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E1}{\partial z} \right) - \left[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right)$$
(III-195)

$$\frac{dQ1}{dt} = \left[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1\right]$$
(III-196)

$$\frac{\partial C1}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C1}{\partial z} \right)$$
(III-197)

$$\frac{\partial S1}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S1}{\partial z} \right)$$
(III-198)

Balanço de massa na coluna 8 – zona dois:

$$E8|_{z=0} = E1|_{z=L} \qquad C8|_{z=0} = C1|_{z=L} \qquad S8|_{z=0} = S1|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E8}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E8}{\partial z} \right) - \left[k1E8 \cdot (Qm - Q8) - k2Q8\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-199})$$

$$\frac{dQ8}{dt} = \left[k1E8 \cdot (Qm - Q8) - k2Q8\right] \tag{III-200}$$

$$\frac{\partial C8}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C8}{\partial z} \right)$$
(III-201)

$$\frac{\partial S8}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S8}{\partial z} \right)$$
(III-202)

Balanço de massa na coluna 7 – zona dois:

$$E7|_{z=0} = E8|_{z=L} \qquad C7|_{z=0} = C8|_{z=L} \qquad S7|_{z=0} = S8|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E7}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E7}{\partial z} \right) - \left[k1E7 \cdot (Qm-Q7) - k2Q7\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-203})$$

$$\frac{dQ7}{dt} = [k1E7 \cdot (Qm - Q7) - k2Q7]$$
(III-204)

$$\frac{\partial C7}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C7}{\partial z} \right)$$
(III-205)

$$\frac{\partial S7}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S7}{\partial z} \right)$$
(III-206)

Balanço de massa na coluna 6 - zona dois:

$$E6|_{z=0} = E7|_{z=L} \qquad C6|_{z=0} = C7|_{z=L} \qquad S6|_{z=0} = S7|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E6}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E6}{\partial z} \right) - \left[k1E6 \cdot (Qm - Q6) - k2Q6\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-207})$$

$$\frac{dQ6}{dt} = [k_1 E6 \cdot (Qm - Q6) - k_2 Q6]$$
(III-208)

$$\frac{\partial C6}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C6}{\partial z} \right)$$
(III-209)

$$\frac{\partial S6}{\partial t} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S6}{\partial z} \right)$$
(III-210)

Balanço de massa na coluna 5 – zona quatro:

$$E5|_{z=0} = 0 \qquad C5|_{z=0} = 0 \qquad S5|_{z=0} = 0$$
$$\frac{\partial E5}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E5}{\partial z} \right) - \left[k1E5 \cdot (Qm - Q5) - k2Q5\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-211})$$

$$\frac{dQ5}{dt} = [k1E5 \cdot (Qm - Q5) - k2Q5]$$
(III-212)

$$\frac{\partial C5}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C5}{\partial z} \right)$$
(III-213)

$$\frac{\partial S5}{\partial t} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S5}{\partial z} \right)$$
(III-214)

Balanço de massa na coluna 4 – zona três:

$$E4|_{z=0} = 0 \qquad C4|_{z=0} = 0 \qquad S4|_{z=0} = S0$$
$$\frac{\partial E4}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E4}{\partial z} \right) - \left[k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4 \right] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \qquad (\text{III-215})$$

$$\frac{dQ4}{dt} = [k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4]$$
(III-216)

$$\frac{\partial C4}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C4}{\partial z} \right)$$
(III-217)

$$\frac{\partial S4}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S4}{\partial z} \right)$$
(III-218)

Balanço de massa na coluna 3 – zona três:

$$E3|_{z=0} = E4|_{z=L} \qquad C3|_{z=0} = C4|_{z=L} \qquad S3|_{z=0} = S4|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E3}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L\frac{\partial E3}{\partial z} \right) - \left[k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3\right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-219})$$

$$\frac{dQ3}{dt} = [k_1 E_3 \cdot (Qm - Q_3) - k_2 Q_3]$$
(III-220)

$$\frac{\partial C3}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C3}{\partial z} \right)$$
(III-221)

$$\frac{\partial S3}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S3}{\partial z} \right)$$
(III-222)

Balanço de massa na coluna 2 – zona três:

$$E2|_{z=0} = E3|_{z=L} \qquad C2|_{z=0} = C3|_{z=L} \qquad S2|_{z=0} = S3|_{z=L}$$
$$\frac{\partial E2}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial E2}{\partial z} \right) - \left[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2 \right] \cdot \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \qquad (\text{III-223})$$

$$\frac{dQ2}{dt} = \left[k_1 E 2 \cdot (Qm - Q2) - k_2 Q2\right] \tag{III-224}$$

$$\frac{\partial C2}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial C2}{\partial z} \right)$$
(III-225)

$$\frac{\partial S2}{\partial t} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} \left(-L \frac{\partial S2}{\partial z} \right)$$
(III-226)

III.3. Configurações Derivados do TMMS

Um novo sistema de separação tanque de mistura móvel simulado (TMMS) é apresentado. Este novo sistema é caracterizado por ser constituído por reatores tanques de mistura ("Continuous Stirred Tank Reactor" – CSTR) com uma membrana acoplada cujos fluxos são interligados por válvulas rotativas. Este sistema de purificação pode ser utilizado como um sistema alternativo em substituição em todos os sistemas em que a técnica de separação cromatográficas de leito móvel simulado são utilizadas. O uso do sistema TMMS é interessante pois possui grande potencial de aumento de escala e pode ser utilizado como um sistema inicial de purificação de alta resolução, reduzindo o número de etapas necessárias para purificação de proteínas. Outras aplicações potenciais do sistema TMMS seriam para processos que utilizam reatores catalíticos.

Um sistema de separação de tanque de mistura móvel simulado composto por um conjunto de tanques de mistura com membranas, válvulas rotativas e bombas de circulação é proposto. O conjunto de tanques de mistura com membranas compreendem uma pluralidade de unidades tanques de mistura com membranas contendo resina em suspensão. Cada tanque de mistura com membrana é conectado em série com outro tanque de mistura com membrana via uma passagem de fluido e arranjado para formar uma passagem para circulação unidirecional de um fluido por intermédio da unidade tanque de mistura.

Cada unidade de tanque de mistura é formada por um reator tanque agitado, que possui uma membrana acoplada que impede a passagem da resina adsorvente. Este reator pode ser definido como semelhante ao usado por Pungor *et al.* (1987) para o sistema CARE, exceto no fato de que não há o transporte da matriz em suspensão entre os tanques mas apenas de líquido. O transporte da resina entre os tanques é simulado pelas válvulas rotativas que simulam o fluxo contracorrente melhorando a eficiência da resina adsorvente. Como no sistema de purificação de leito móvel simulado apenas o fluido, é transferido entre as unidades de adsorção. Isto faz com que a matriz não necessite ser transferida entre os tanques além do que o transporte apenas de líquido entre os reatores de mistura é bem mais simples que o transporte da matriz em suspensão.

O sistema de purificação de tanque de mistura móvel simulado, é semelhante quanto a configuração ao sistema de purificação de leito móvel simulado, diferindo apenas

pelo tipo de reator de adsorção utilizado. Como no LMS quando o mesmo solvente para a zona quatro pode ser usado em qualquer outra zona para eluição dos componentes, as zonas três e quatro podem ser conectadas, e uma nova zona, a zona um, pode ser formada ao lado esquerdo da zona dois para recuperar o solvente. Um diagrama esquemático de um adsorvedor de tanque de mistura móvel simulado de quatro zonas é mostrado na Figura III-18. Uma amostra da solução incluindo os componentes A e B é alimentado entre as zonas dois e três. O componente A é recuperado no ponto de extração situado entre as zonas três e quatro com uma quantidade de solvente de eluição suprido no ponto de dessorção situado entre as zonas quatro e um. A zona um funciona para adsorção do componente B bem como a regeneração do solvente. O componente B prossegue para a zona um com o fluxo de líquido por causa da menor adsorção na resina. O componente B pode ser recuperado no ponto de refinado situado entre as zonas um e dois. No sistema de purificação de tanque de mistura móvel simulado, cada zona é constituída por um ou mais tanques de mistura com membrana enquanto que no LMS é formado por uma ou mais colunas cromatográficas.



Figura III-18. Representação esquemática do Tanque de Mistura Móvel Simulado (TMMS) de quatro zonas e oito reatores.

A Figura III-19 mostra um diagrama esquemático do sistema de tanque de mistura móvel simulado de três zonas e oito reatores. O sistema de tanque de mistura móvel simulado é dividido em três zonas, dois, três, e quatro. Cada zona de mistura pode conter um ou mais reatores tanques de mistura contínuos com membranas. As válvulas rotativas simulam o movimento do adsorvente no sentido da esquerda para a direita. A amostra da solução é alimentada continuamente no ponto de alimentação situado entre as zonas dois e três. O componente menos adsorvido, B, se move com o fluxo de líquido no sentido

esquerdo e pode ser recuperado do lado esquerdo da zona dois. Por outro lado, o componente fortemente adsorvido, *A*, se move com o adsorvente através da zona três para a zona quatro. O componente *A* pode ser recuperado do lado esquerdo da zona quatro pela eluição com dessorvente ou pelo aumento da temperatura na zona quatro.



Figura III-19. Representação esquemática do Tanque de Mistura Móvel Simulado (TMMS) de três zonas e oito reatores.

Na operação do sistema CARE, as partículas de resina estão em suspensão dentro do tanque de mistura. Algumas partículas de resina frequentemente se quebram por causa da fricção entre as partículas e devido ao transporte entre os tanques de mistura feito pela bomba peristáltica. Na operação do leito móvel, as partículas de impurezas sólidas entopem as colunas exigindo que a solução de alimentação seja pré purificada. A idéia do tanque de mistura móvel simulado surgiu inspirada no sistema de purificação de leito móvel simulado e no sistema contínuo de purificação por afinidade com reciclo da resina (CARE) e pode ser melhor compreendido usando os princípios do leito móvel simulado. No leito móvel simulado clássico do ponto de vista conceitual, o perfil de eluição de uma alimentação bicomponente pode ser "mantido" fixo se a fase estacionária se mover em uma direção e a fase móvel em outra direção. Se a alimentação é introduzida continuamente no meio da coluna, o perfil de concentração pode ser mantido, e as bandas são espalhadas ao longo de toda a coluna. Embora os perfis sejam apenas parcialmente resolvidos, produtos de alta pureza podem ser coletados em cada estremo das colunas. A Figura III-20, abaixo representa esquematicamente o perfil contínuo de concentrações dos componentes no LMS.



Figura III-20. Representação esquemática do perfil de concentrações no LMS.

No tanque de mistura móvel simulado a eficiência em separar as bandas de cada componente é reduzida pela mistura da solução em suspensão no interior dos tanques, no entanto, a utilização dos reatores tanques de mistura com membrana permitem a purificação de soluções sem uma pré purificação, o que não é possível ser feito em colunas do sistema LMS. Assim como no LMS o TMMS também tem o movimento de sólido contra corrente simulado pelo giro das válvulas. O TMMS permite o isolamento com razoável purificação e eliminação das impurezas com uma boa utilização da fase estacionária. O número de tanques de mistura dentro de cada seção e o número total de tanques são ajustáveis. A Figura III-21 apresenta esquematicamente o perfil de concentração obtido no TMMS. Ao contrário do LMS o perfil de concentração no TMMS varia em valores discretos correspondendo a concentração no interior de cada tanque de mistura dos componentes.



Figura III-21. Representação esquemática do perfil de concentrações no TMMS.

A fase estacionária e a fase móvel se movem em direções opostas mantendo uma separação entre os componentes, e o produto desejado e as impurezas podem ser continuamente retirados. Este conceito é a base da operação contracorrente contínua de um tanque de mistura móvel simulado. Assim como no LMS, os pontos de alimentação e retirada devem ser movidos continuamente, ou indexados, para manter o perfil. Os pontos de entrada e saída das matérias primas, solução eluente e produtos são mudados para o próximo tanque de mistura na direção do fluxo de líquido, resultando em um fluxo contracorrente do líquido e a resina.

Assim como no LMS as taxas de fluxos de líquidos externas que entram e saem no tanque de mistura móvel simulado são constantes, como é o intervalo de tempo entre os passos das válvulas. Para o TMMS manter o balanço desejado das taxas de fluxo de líquido em cada zona, as bombas de circulação são programadas para bombear em quatro taxas distintas de fluxo, o qual correspondem a zonas individuais, semelhantemente ao LMS. As taxas de bombeamento mudam quando as válvulas rotativas causadas pela circulação das bombas cruzam as zonas de fronteira. As correntes de extrato e refinado são continuamente retiradas pelas válvulas rotativas.

Este sistema de purificação (TMMS) possui diversas vantagens sobre os processos de purificação. No TMMS, todo adsorvente no interior do tanque de mistura pode ser usado mais eficientemente do que na coluna cromatográfica, pois como o meio reacional esta sob constante mistura os sítios de adsorção da resina ficam melhor expostos além do aumento de choques entre o ligante e o contraligante que favorece a cinética de adsorção. No entanto esta agitação deve ser suficiente para que ocorra a mistura sem prejudicar a resina adsorvente devido ao cisalhamento. O sistema TMMS neste sentido é superior ao sistema CARE pois o transporte da matriz não é feito entre os tanques, como ocorre no sistema CARE, e sim simulado pelas válvulas rotativas. O transporte de matriz entre os tanques, que ocorre no sistema CARE, aumenta o cisalhamento e requer bombas adequadas ao transporte de sólidos em suspensão, enquanto que no TMMS as bombas transportam apenas líquido. Assim como no LMS o TMMS é operado continuamente o que possibilita a alimentação da solução a ser purificada diretamente após sua produção. A maior porosidade do meio no interior do tanque de mistura permite que possam ser purificadas soluções contendo fragmentos de células que em geral entopem as colunas e impedem que estas sejam usadas diretamente sem a necessidade de uma pré purificação. Assim o TMMS pode reduzir o número total de etapas necessárias para a purificação de um determinado produto. A maior porosidade do meio também acarreta em uma maior facilidade de fluxo de líquidos do que o LMS e consequentemente uma menor perda de carga. Assim como no LMS, no TMMS há o contato contracorrente entre a fase estacionária e a fase móvel o que otimiza a utilização da resina adsorvente. O TMMS é um sistema que tem grande vocação para utilização em grande escala devido a utilização de membranas, possibilitando o processamento de grandes volumes, alta produtividade e facilidade de aumento de escala, além do que tem vantagens sobre os sistemas de purificação por membranas pois pode separar substâncias com diferença de tamanho menor que dez vezes devido a resina de adsorção.

A inovação do sistema TMMS sobre o LMS é a utilização de reatores tanques de mistura ao invés de colunas, possibilitando a purificação de soluções sem uma pré purificação. O TMMS pode ser usado não apenas como um passo de purificação final, mas também como uma ferramenta de purificação global. Considerando a seletividade dos adsorventes operando sob condições controladas, a introdução antecipada do sistema TMMS no processo global gera a expectativa de minimizar a necessidade de passos de purificação posteriores. Além disso, a purificação em um único passo para proteínas altamente instáveis é particularmente atrativa devido a brandura das separações por adsorção. A eliminação de unidades de processamento reduz o tempo de contato e tempo de manuseio da proteína.

III.3.1. Sistema TMMS de Três Zonas e Quatro Tanques (TMMS4-e)

O sistema TMMS de três zonas e quatro tanques é representado esquematicamente na Figura III-22. A alimentação é feita no primeiro tanque, o tampão de lavagem é feito no segundo tanque e o tampão de eluição é introduzido no terceiro tanque. A solução rica em enzima (extrato) é coletada na saída do terceiro tanque e a solução com as impurezas (refinado) é coletada na saída do quarto tanque.



Figura III-22. Sistema TMMS de três zonas e quatro tanques

Balanço de massa no reator 1 – zona dois:

$$FZ2 = FA + FZ3$$
 $E10 = (FA \cdot E0 + FZ3 \cdot E2)/FZ2$ $C10 = (FA \cdot C0 + FZ3 \cdot C2)/FZ2$ $S10 = (FA \cdot S0 + FZ3 \cdot S2)/FZ2$

$$\frac{dE1}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (E10 - E1) - [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-227)

$$\frac{dQ1}{dt} = \left[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1\right]$$
(III-228)

$$\frac{dC1}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (C10 - C1) \tag{III-229}$$

$$\frac{dS1}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (S10 - S1) \tag{III-230}$$

Balanço de massa no reator 4 – zona dois:

$$E40 = E1 \qquad C40 = C1 \qquad S40 = S1$$
$$\frac{dE4}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (E40 - E4) - [k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (III-231)$$

$$\frac{dQ4}{dt} = \left[k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4\right] \tag{III-232}$$

$$\frac{dC4}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (C40 - C4)$$
(III-233)

$$\frac{dS4}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (S40 - S4) \tag{III-234}$$

Balanço de massa no reator 3 – zona quatro:

$$E30 = 0$$
 $C30 = 0$ $S30 = 0$

$$\frac{dE3}{dt} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} (E30 - E3) - [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-235)

$$\frac{dQ3}{dt} = [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3]$$
(III-236)

$$\frac{dC3}{dt} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} (C30 - C3) \tag{III-237}$$

$$\frac{dS3}{dt} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} (S30 - S3) \tag{III-238}$$

Balanço de massa no reator 2 - zona três:

$$E20 = 0 \qquad C20 = 0 \qquad S20 = S0$$
$$\frac{dE2}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (E20 - E2) - [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (III-239)$$

$$\frac{dQ2}{dt} = \left[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2\right] \tag{III-240}$$

$$\frac{dC2}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (C20 - C2) \tag{III-241}$$

$$\frac{dS2}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (S20 - S2) \tag{III-242}$$

III.3.2. Sistema TMMS de Três Zonas e Oito Tanques – Dois Tanques de Eluição (TMMS8-2e)

O sistema TMMS de três zonas e oito tanques, com dois tanques na zona de eluição, é representado esquematicamente na Figura III-23. A alimentação é feita no primeiro tanque, o tampão de lavagem é introduzido no terceiro tanque e o tampão de eluição é introduzido no quinto tanque. A solução rica em enzima é coletada na saída do quarto tanque e a solução com as impurezas é coletada na saída do sexto tanque.



Figura III-23. Sistema TMMS de três zonas e oito tanques – dois tanques de eluição

Balanço de massa no reator 1 - zona dois:

$$FZ2 = FA + FZ3$$
 $E10 = (FA \cdot E0 + FZ3 \cdot E2)/FZ2$ $C10 = (FA \cdot C0 + FZ3 \cdot C2)/FZ2$ $S10 = (FA \cdot S0 + FZ3 \cdot S2)/FZ2$

$$\frac{dE1}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (E10 - E1) - [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-243)

$$\frac{dQ1}{dt} = \left[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1\right] \tag{III-244}$$

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{FZ_2}{V \cdot \varepsilon} (C10 - C1) \tag{III-245}$$

$$\frac{dS1}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (S10 - S1) \tag{III-246}$$

Balanço de massa no reator 8 - zona dois:

$$E80 = E1 \qquad C80 = C1 \qquad S80 = S1$$
$$\frac{dE8}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (E80 - E8) - [k1E8 \cdot (Qm - Q8) - k2Q8] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (III-247)$$

$$\frac{dQ8}{dt} = \left[k1E8 \cdot (Qm - Q8) - k2Q8\right] \tag{III-248}$$

$$\frac{dC8}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (C80 - C8) \tag{III-249}$$

$$\frac{dS8}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (S80 - S8) \tag{III-250}$$

Balanço de massa no reator 7 – zona dois:

$$E70 = E8 \qquad C70 = C8 \qquad S70 = S8$$
$$\frac{dE7}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (E70 - E7) - [k1E7 \cdot (Qm - Q7) - k2Q7] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-251})$$

$$\frac{dQ7}{dt} = \left[k1E7 \cdot (Qm - Q7) - k2Q7\right] \tag{III-252}$$

$$\frac{dC7}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (C70 - C7) \tag{III-253}$$

$$\frac{dS7}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (S70 - S7) \tag{III-254}$$

Balanço de massa no reator 6 – zona dois:

$$E60 = E7 \qquad C60 = C7 \qquad S60 = S7$$
$$\frac{dE6}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (E60 - E6) - [k1E6 \cdot (Qm - Q6) - k2Q6] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (III-255)$$

$$\frac{dQ6}{dt} = [k1E6 \cdot (Qm - Q6) - k2Q6]$$
(III-256)

$$\frac{dC6}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (C60 - C6) \tag{III-257}$$

$$\frac{dS6}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (S60 - S6) \tag{III-258}$$

Balanço de massa no reator 5 – zona quatro:

$$E50 = 0 C50 = 0 S50 = 0$$

$$\frac{dE5}{dt} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} (E50 - E5) - [k1E5 \cdot (Qm - Q5) - k2Q5] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) (III-259)$$

$$\frac{dQ5}{dt} = [k_1 E5 \cdot (Qm - Q5) - k_2 Q5]$$
(III-260)

$$\frac{dC5}{dt} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} (C50 - C5) \tag{III-261}$$

$$\frac{dS5}{dt} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} (S50 - S5) \tag{III-262}$$

Balanço de massa no reator 4 – zona quatro:

$$E40 = E5 \qquad C40 = C5 \qquad S40 = S5$$
$$\frac{dE4}{dt} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} (E40 - E4) - [k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-263})$$

$$\frac{dQ4}{dt} = [k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4]$$
(III-264)

$$\frac{dC4}{dt} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} (C40 - C4) \tag{III-265}$$

$$\frac{dS4}{dt} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} (S40 - S4) \tag{III-266}$$

Balanço de massa no reator 3 – zona três:

$$E30 = 0 C30 = 0 S30 = S0$$

$$\frac{dE3}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (E30 - E3) - [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) (III-267)$$

$$\frac{dQ3}{dt} = [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3]$$
(III-268)

$$\frac{dC3}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (C30 - C3) \tag{III-269}$$

$$\frac{dS3}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (S30 - S3) \tag{III-270}$$

Balanço de massa no reator 2 – zona três:

$$E20 = E3 \qquad C20 = C3 \qquad S20 = S3$$
$$\frac{dE2}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (E20 - E2) - [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (III-271)$$

$$\frac{dQ2}{dt} = [k_1 E_2 \cdot (Qm - Q_2) - k_2 Q_2]$$
(III-272)

$$\frac{dC2}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (C20 - C2) \tag{III-273}$$

$$\frac{dS2}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (S20 - S2) \tag{III-274}$$

III.3.3. Sistema TMMS de Três Zonas e Oito Tanques – Um Tanque de Eluição (TMMS8-e)

O sistema TMMS de três zonas e oito tanques, com um tanque na zona de eluição, é representado esquematicamente na Figura III-24. A alimentação é feita no primeiro tanque, o tampão de lavagem é introduzido no quarto tanque e o tampão de eluição é introduzido no quinto tanque. A solução rica em enzima é coletada na saída do quinto tanque e a solução com as impurezas é coletada na saída do sexto tanque.



Figura III-24. Sistema TMMS de três zonas e oito tanques - um tanque de eluição

Balanço de massa no reator 1 – zona dois:

$$FZ2 = FA + FZ3 \qquad E10 = (FA \cdot E0 + FZ3 \cdot E2)/FZ2$$

$$C10 = (FA \cdot C0 + FZ3 \cdot C2)/FZ2 \qquad S10 = (FA \cdot S0 + FZ3 \cdot S2)/FZ2$$

$$\frac{dE1}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (E10 - E1) - [k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (III-275)$$

$$\frac{dQ1}{dt} = \left[k1E1 \cdot (Qm - Q1) - k2Q1\right] \tag{III-276}$$

$$\frac{dC1}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (C10 - C1) \tag{III-277}$$

$$\frac{dS1}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (S10 - S1) \tag{III-278}$$

Balanço de massa no reator 8 – zona dois:

$$E80 = E1 \qquad C80 = C1 \qquad S80 = S1$$
$$\frac{dE8}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (E80 - E8) - [k1E8 \cdot (Qm - Q8) - k2Q8] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (III-279)$$

$$\frac{dQ8}{dt} = \left[k1E8 \cdot (Qm - Q8) - k2Q8\right] \tag{III-280}$$

$$\frac{dC8}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (C80 - C8) \tag{III-281}$$

$$\frac{dS8}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (S80 - S8) \tag{III-282}$$

Balanço de massa no reator 7 – zona dois:

E70 = E8 C70 = C8 S70 = S8

$$\frac{dE7}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (E70 - E7) - [k1E7 \cdot (Qm - Q7) - k2Q7] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-283)

$$\frac{dQ7}{dt} = [k1E7 \cdot (Qm - Q7) - k2Q7]$$
(III-284)

$$\frac{dC7}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (C70 - C7) \tag{III-285}$$

$$\frac{dS7}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (S70 - S7) \tag{III-286}$$

Balanço de massa no reator 6 - zona dois:

$$E60 = E7 \qquad C60 = C7 \qquad S60 = S7$$
$$\frac{dE6}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (E60 - E6) - [k1E6 \cdot (Qm - Q6) - k2Q6] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (III-287)$$

$$\frac{dQ6}{dt} = [k1E6 \cdot (Qm - Q6) - k2Q6]$$
(III-288)

$$\frac{dC6}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (C60 - C6) \tag{III-289}$$

$$\frac{dS6}{dt} = \frac{FZ2}{V \cdot \varepsilon} (S60 - S6) \tag{III-290}$$

Balanço de massa no reator 5 – zona quatro:

$$E50 = 0 \qquad C50 = 0 \qquad S50 = 0$$
$$\frac{dE5}{dt} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} (E50 - E5) - [k1E5 \cdot (Qm - Q5) - k2Q5] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (\text{III-291})$$

$$\frac{dQ5}{dt} = [k1E5 \cdot (Qm - Q5) - k2Q5]$$
(III-292)

$$\frac{dC5}{dt} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} (C50 - C5) \tag{III-293}$$

$$\frac{dS5}{dt} = \frac{FZ4}{V \cdot \varepsilon} (S50 - S5) \tag{III-294}$$

Balanço de massa no reator 4 – zona três:

 $E40 = 0 \qquad \qquad C40 = 0 \qquad \qquad S40 = S0$

$$\frac{dE4}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (E40 - E4) - [k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right)$$
(III-295)

$$\frac{dQ4}{dt} = \left[k1E4 \cdot (Qm - Q4) - k2Q4\right] \tag{III-296}$$

$$\frac{dC4}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (C40 - C4) \tag{III-297}$$

$$\frac{dS4}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (S40 - S4) \tag{III-298}$$

Balanço de massa no reator 3 – zona três:

$$E30 = E4 \qquad C30 = C4 \qquad S30 = S4$$
$$\frac{dE3}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (E30 - E3) - [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (III-299)$$

$$\frac{dQ3}{dt} = [k1E3 \cdot (Qm - Q3) - k2Q3]$$
(III-300)

$$\frac{dC3}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (C30 - C3) \tag{III-301}$$

$$\frac{dS3}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (S30 - S3) \tag{III-302}$$

Balanço de massa no reator 2 - zona três:

$$E20 = E3 \qquad C20 = C3 \qquad S20 = S3$$
$$\frac{dE2}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (E20 - E2) - [k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2] \cdot \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}\right) \qquad (III-303)$$

$$\frac{dQ2}{dt} = \left[k1E2 \cdot (Qm - Q2) - k2Q2\right] \tag{III-304}$$

$$\frac{dC2}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (C20 - C2) \tag{III-305}$$

$$\frac{dS2}{dt} = \frac{FZ3}{V \cdot \varepsilon} (S20 - S2) \tag{III-306}$$

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis de saída analisadas foram o rendimento (REND), produtividade (PROD) e fator de purificação (FP) definidas pelas equações IV-1, IV-2 e IV-3:

$$REND = 100 \cdot \frac{Ff \cdot Ef}{FA \cdot E0} \cdot \%$$
 (IV-1)

$$PROD = Ff \cdot Ef \tag{IV-2}$$

$$FP = \frac{Ef/E0}{Cf/C0}$$
(IV-3)

onde o índice "f" corresponde ao produto final que sai do processo de purificação, o indice "0" corresponde aos valores na solução de alimentação e FA corresponde ao fluxo inicial de alimentação.

Em um sistema de purificação tanto o rendimento quanto o fator de purificação são características importantes do desempenho e quanto maior o valor destas variáveis melhor o desempenho do processo.

A fórmula do fator de purificação utilizada neste trabalho indica que a purificação ocorre para valores de FP maiores que um, pois se o produto sair exatamente como entrou $(Ef=E0 \ e \ Cf=C0)$ a fórmula fica FP=(E0/E0)/(C0/C0)=1, e que a medida que a purificação aumenta FP tende ao infinito pois a quantidade de impureza que sai no produto (Cf) tende a zero.

IV.1. Configurações Derivadas do Sistema CARE

IV.1.1. Resultados de Purificação da Lisozima

Inicialmente serão apresentados os resultados obtidos nas simulações dos sistemas de purificação utilizando a cinética de adsorção da lisozima adsorvida em Cibracon Blue.

A seguir são apresentados os parâmetros experimentais e operacionais utilizados na simulação computacional da purificação da lisozima nas diferentes configurações derivadas do sistema CARE.

$$V = 0,1$$
 litros

$$\varepsilon = 0,70$$

 $kI = 10^{6} \text{ hr}^{-1}$
 $k2 = 1,80 \text{ hr}^{-1}$
 $k3 = 10^{3} \text{ hr}^{-1}$
 $Qm = 1,0 \ge 10^{-3} \text{ mol } 1^{-1}$
 $E0 = 7,1 \ge 10^{-6} \text{ mol } 1^{-1}$,
 $C0 = 5,68 \ge 10^{-5} \text{ mol } 1^{-1}$,
 $F1 = F2 = F3 = F4 = 0,3825 \text{ l/hr}$

Onde V é o volume de cada reator, ε a porosidade do meio, k1 e k2 são as constantes cinéticas do estágio de adsorção e lavagem nas direções direta e inversa respectivamente, k3 é a constante cinética do estágio de eluição (dessorção), Qm é a capacidade máxima de enzima que pode ser adsorvida na resina, E0 é a concentração de enzima na alimentação, C0 é a concentração de impureza na alimentação, F1, F2, F3 e F4 são os fluxos volumétricos de líquido que entram e permeiam através da membrana nos estágios 1, 2, 3 e 4 respectivamente, FR é o fluxo volumétrico total de líquido mais sólido no reciclo.

Na Tabela IV-1, são apresentados o rendimento, a produtividade e o fator de purificação no estado estacionário, dos sistemas de purificação com reatores tanque de mistura com membrana e reatores de fluxo pistonado com membrana, utilizando a cinética de adsorção da lisozima. Estes resultados foram obtidos para mesmas condições de operação e volume de cada reator de 0,1 litro, variando portanto o volume total do sistema.

O desempenho entre as diferentes configurações pode ser melhor analisado se estes sistemas forem divididos e avaliados em subgrupos. O efeito do aumento do número de estágios no desempenho do sistema CARE pode ser avaliado analisando os sistemas CARE2, CARE3 e CARE4. Pode-se verificar que com o aumento do número de estágios há uma redução no rendimento e na produtividade e um aumento no fator de purificação. O rendimento e a produtividade apresentam sempre a mesma tendência de comportamento, devido à semelhança entre suas fórmulas de definição, que diferem apenas por uma

constante, e portanto os comentários pertinentes ao rendimento podem ser estendidos à produtividade. Podemos verificar que com a inclusão de estágios intermediários de lavagem há um aumento na perda de proteína alvo e por isso a redução no rendimento. No entanto podemos verificar que há um aumento no fator de purificação, melhorando a pureza do produto obtido. Assim o objetivo de aumentar a eliminação de impurezas com a inclusão de estágios intermediários de lavagem é obtido apesar do aumento da perda de proteína alvo.

Sistema de Purificação		REND (%)	PROD (mol/hr)	FP
CARE2		86,587	2,351x10 ⁻⁶	20,6
CARE3		76,552	2,078x10 ⁻⁶	418,2
CARE3r	<u>क्रिन्</u> कन्क्	64,721	1,758x10 ⁻⁶	367,7
CARE3m		87,635	2,380x10 ⁻⁶	20,9
CARE4		68,058	1,848x10 ⁻⁶	8.498,7
CARE2pfr		86,894	2,359x10 ⁻⁶	19,9
CARE3pfr		76,631	2,081x10 ⁻⁶	1.885.920,0
CARE3pfrm		87,458	2,372x10 ⁻⁶	94.184,7

Tabela IV-1. Desempenho dos diferentes sistemas de purificação derivados do sistema CARE utilizando a cinética de adsorção da lisozima.

O efeito do aumento do número de estágios também pode ser avaliado analisando os sistemas de purificação que possuem reatores de fluxo pistonado com membrana, que são o CARE2pfr e o CARE3pfr. Pode-se verificar a mesma tendência observada nos sistemas formados por reatores tanques de mistura com membrana, ou seja, com a inclusão de um estágio intermediário de lavagem há uma redução no rendimento e um aumento no fator de purificação.

Analisando simultaneamente o tipo de reator utilizado e o número de estágios, podemos verificar, observando a Figura IV-1, que o rendimento obtido nos sistemas constituídos por reatores tanques de mistura e reatores de fluxo pistonado com mesmo número de estágios foram quase idênticos, e que o aumento do número de estágios causou uma redução no rendimento para ambos os tipos de reatores. Assim, para a cinética estudada, o rendimento obtido nos sistemas com dois (CARE2 e CARE2pfr) e três estágios (CARE3 e CARE3pfr), não foi afetado pelo tipo de reator utilizado.



Figura IV-1. Efeito do aumento do número de estágios sobre o rendimento.

O fator de purificação nos sistemas de dois estágios formados por reatores de mistura e reatores de fluxo pistonado foram quase idênticos como pode ser observado na Figura IV-2. Nos sistemas de três estágios, verifica-se que o fator de purificação do sistema formado por reatores de fluxo pistonado com membrana (CARE3pfr) foi muito maior que o sistema formado por reatores tanque de mistura com membrana (CARE3). Assim, o aumento no fator de purificação devido ao aumento do número de estágios foi percentualmente muito maior para o sistema formado por reatores de fluxo pistonado com membrana de fluxo pistonado com membrana, indicando uma melhor capacidade de purificação deste sistema devido a uma maior eliminação das impurezas.



Figura IV-2. Efeito do aumento do número de estágios sobre o fator de purificação.

O efeito no desempenho devido à modificação na membrana pode ser analisado comparando o desempenho dos sistemas de três estágios formados por reatores de mistura CARE3 e CARE3m. Pode-se verificar que a substituição da membrana no primeiro estágio do sistema CARE3 por uma com menor diâmetro de corte levou a um aumento no rendimento e uma redução no fator de purificação. Isto provavelmente ocorre porque a membrana com diâmetro de corte menor do primeiro reator impede também a passagem de enzima livre e impureza além da resina de adsorção, o que aumenta o tempo disponível

para que a enzima alvo seja adsorvida pela resina, aumentando, assim, o rendimento. Com a membrana modificada, as impurezas não são eliminadas no primeiro estágio fazendo com que o fator de purificação diminua.

Analisando o tipo de reator utilizado com a modificação na membrana do primeiro estágio, podemos verificar (Figura IV-3), que o rendimento obtido entre os sistemas constituídos por reatores tanques de mistura e reatores de fluxo pistonado com mesmo tipo de membrana tiveram valores bem próximos, e a modificação na membrana causou um aumento de mesma intensidade no rendimento.



Figura IV-3. Efeito da modificação da membrana no rendimento.

Os fatores de purificação obtidos nos sistemas empregando reatores de mistura e de fluxo pistonado com mesmo tipo de membrana são diferentes mas a modificação na membrana gerou uma redução no fator de purificação proporcional logaritmicamente, como pode ser observado na Figura IV-4.



Figura IV-4. Efeito da modificação da membrana no fator de purificação.

Analisando os resultados apresentados até aqui pode-se verificar que para os sistemas com reatores tanque de mistura, o rendimento obtido no CARE3m é bem próximo ao valor obtido para o sistema CARE2. O rendimento do CARE2 é aproximadamente 86%; com a inclusão de mais um estágio (CARE3) o rendimento cai para aproximadamente 76%, e com a modificação na membrana (CARE3m) o rendimento retorna ao valor de aproximadamente 87%. O mesmo acontece com o fator de purificação, que é de aproximadamente 20 para o CARE2; com a inclusão de um estágio intermediário (CARE3) sobe para aproximadamente 418, e com a modificação na membrana (CARE3m) retorna a aproximadamente 20.

Analisando os resultados apresentados até aqui pode-se verificar que para os sistemas com reatores de fluxo pistonado, o rendimento obtido no CARE3pfrm é bem próximo ao valor obtido para o sistema CARE2pfr. O rendimento do CARE2pfr é aproximadamente 86%; com a inclusão de mais um estágio (CARE3pfr) o rendimento cai para aproximadamente 76%, e com a modificação na membrana (CARE3pfrm) o rendimento retorna ao valor de aproximadamente 87%, como acontece para os sistemas formados por tanques de mistura. No entanto com o fator de purificação, que é de

aproximadamente 20 para o CARE2pfr, com a inclusão de um estágio intermediário (CARE3pfr) sobe para aproximadamente 1.885.920,0; e com a modificação na membrana (CARE3pfrm) cai para aproximadamente 94.185,7; valor bem superior a 20 que foi o inicialmente obtido pelo CARE2. Assim podemos concluir mais uma vez que o sistema formado por reatores de fluxo pistonado com membrana apresentam um melhor desempenho.

Nas Figuras IV-5 e IV-6 é apresentado o comportamento dinâmico do rendimento dos sistemas estudados até aqui para uma pertubação de +10% na concentração inicial de enzima. Pode-se observar que os sistemas com dois estágios têm uma dinâmica um pouco mais rápida, porque estes alcançam o estado estacionário mais cedo do que os sistemas com três estágios. Entre os sistemas com três estágios, pode-se verificar que o sistema com membrana modificada apresenta uma dinâmica um pouco mais lenta e demora mais para alcançar o estado estacionário. Comparando a dinâmica do sistema formado por reatores CSTR com membrana com o sistema formado por reatores PFR com membrana, pode-se verificar que o sistema com reatores PFR tem uma dinâmica um pouco mais rápida do que o sistema com reatores CSTR. Portanto, de um modo geral, pode-se considerar que as diferenças entre o comportamento dinâmico destes sistemas excetuando-se o valor absoluto do rendimento, não são tão grandes.

Avaliou-se também o efeito da modificação do reciclo para o sistema formado por tanques de mistura com três estágios (CARE3r). Ao invés de reciclar a mistura reacional do terceiro para primeiro estágio como ocorre no CARE3, o reciclo é feito do terceiro para o segundo e do segundo para o terceiro. No CARE3 o rendimento e fator de purificação no estado estacionário foi 76,5% e 418,2 respectivamente, enquanto que no CARE3r estes valores foram de 64,7% e 367,7 respectivamente. Assim para esta cinética de adsorção estudada, e para as condições operacionais adotadas, a modificação no reciclo do sistema com três estágios não promoveu nenhuma melhora no desempenho do sistema, ao contrário tanto o rendimento quanto o fator de purificação foram menores comparados com o sistema de reciclo original.



Figura IV-5. Comportamento dinâmico dos sistemas formados por reatores de mistura com membrana.



Figura IV-6. Comportamento dinâmico dos sistemas formados por reatores de fluxo pistonado com membrana.
IV.1.2. Resultados de Purificação da Lipase

A seguir será apresentado o resultado obtido nas simulações dos sistemas de purificação utilizando a cinética de adsorção da lipase de *Geotrichum sp.*, adsorvida em resina de interação hidrofóbica (Taboada 1999). Os parâmetros cinéticos de adsorção e dessorção, e a capacidade máxima de adsorção da resina foram obtidos experimentalmente e expressos em função da quantidade de sal do tampão na mistura. Esta representação matemática é mais realística porque considera a dependência dos parâmetros cinéticos com a quantidade de sal do tampão na mistura.

A seguir são apresentados os parâmetros experimentais e operacionais utilizados na simulação computacional da purificação da lipase nas diferentes configurações do sistema CARE original e derivadas.

V = 0,1 litro $\varepsilon = 0,85$ S0 = 2,0 moles/litro $E0 = 2,0x10^4 \text{ U/litro}$ C0 = 4,0 gramas/litro F1 = F2 = F3 = 0,15 litro/hora FR = 0,0558 litro/hora

onde V é o volume de cada reator, ε é a porosidade do meio, S0 é a concentração de sal na alimentação, E0 é a concentração de enzima na alimentação, C0 é a concentração de impureza na alimentação, F1, F2 e F3 são os fluxos volumétricos de líquido que entram e permeiam através da membrana nos estágios 1, 2 e 3 respectivamente, FR é o fluxo volumétrico total de líquido mais sólido no reciclo. Uma unidade de atividade lipolítica (U) da lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera um mol de ácido graxo por minuto de reação.

Tabela IV-2. Desempenho dos diferentes sistemas de purificação utilizando a cinética de adsorção da lipase.

Sistema de Purificação		REND	PROD	FP
		(%)	(U/hr)	
CARE2		26,903	8,071x10 ²	1,389
CARE3		11,839	3,552x10 ²	2,663
CARE2pfr		31,909	9,573x10 ²	1,397
CARE3pfr		10,438	3,131x10 ²	7,239

Na Tabela IV-2, são apresentados o rendimento, a produtividade e o fator de purificação no estado estacionário, dos sistemas de purificação com reatores tanque de mistura com membrana e reatores de fluxo pistonado com membrana, utilizando a cinética de adsorção da lipase. Estes resultados foram obtidos para as mesmas condições de operação e volume de cada reator de 0,1 litro, variando portanto o volume total do sistema.

Entre os sistemas com dois estágios, pode-se verificar que o sistema formado por reatores de fluxo pistonado com membrana (CARE2pfr) teve um rendimento 5% maior do que o sistema formado por reatores tanque de mistura com membrana (CARE2) enquanto que o fator de purificação obtido nestas duas configurações foram quase idênticos. Este resultado, obtido a partir de uma cinética de adsorção que leva em conta as modificações nos parâmetros cinéticos devido às modificações na concentração de sal no meio reacional, mostra que entre estas duas configurações, o sistema formado por tanque de fluxo pistonado possui um desempenho superior. Pode-se afirmar que os resultados obtidos utilizando a cinética da lipase estão mais próximos do que ocorreria na realidade pois os parâmetros cinéticos utilizados no modelo estão sempre relacionados com a concentração atual de sal no meio reacional e também são computados o efeito da mistura entre os tampões de alimentação e eluição com diferentes concentrações de sal. No modelo da lisozima os parâmetros cinéticos são constantes e mudam de forma discreta entre os estágios de adsorção e eluição, ou seja, assume-se que quando a mistura reacional entra no tanque de eluição, esta imediatamente entra em equilíbrio com as condições de eluição com a utilização de um valor fixo para a constante de eluição (k3), hipótese esta mais distante do que ocorre na realidade. No caso do sistema CARE2pfr por exemplo, a mistura que entra no estágio de eluição (k3), sendo que na realidade esta mudança na constante cinética de eluição ocorre devido a mudança de tampão que obviamente não ocorre de uma forma instantânea. Com o modelo cinético da lipase, tendo ainda como exemplo o sistema CARE2pfr, a mistura reacional que entra no estágio de eluição terá sua dessorção computada acomo exemplo o sistema CARE2pfr, a mistura reacional que entra no estágio de eluição terá sua dessorção de luição de sal gerada pelos parâmetros cinéticos em função da modificação na concentração de sal gerada pelo tampão de eluição, como ocorre na realidade. Assim os resultados obtidos com a cinética da lipase apesar do pior desempenho estão mais próximos do que ocorre na realidade.

Entre os sistemas com três estágios podemos verificar que o rendimento do sistema formado por tanques de mistura (CARE3) foi 1,4% superior ao sistema formado por tanques de fluxo pistonado (CARE3pfr). Quanto ao fator de purificação o sistema formado por reatores de fluxo pistonado (CARE3pfr) teve um fator de purificação quase três vezes maior que o sistema formado por tanques de mistura (CARE3) indicando novamente uma superioridade dos sistemas que empregam reatores de fluxo pistonado.

Pode-se verificar através das Figuras IV-7 e IV-8 que com o aumento do número de estágios a tendência de reduzir o rendimento e aumentar o fator de purificação se manteve para a cinética da lipase do mesmo modo como foi verificado para a cinética da lisozima.



Figura IV-7. Efeito do aumento do número de estágios sobre o rendimento.



Figura IV-8. Efeito do aumento do número de estágios sobre o fator de purificação.

Nas Figuras IV-9 e IV-10 é apresentada a resposta dinâmica do rendimento a uma perturbação de 10% na concentração inicial de enzima. Os sistemas apresentaram comportamentos similares principalmente aqueles com dois estágios. Nos sistemas com três estágios há um tempo morto que é mais acentuado no sistema com reatores PFR. Contudo, as diferenças entre o comportamento dinâmico destes sistemas verificadas com a cinética de adsorção da lipase não são tão significativas desde que o valor absoluto do rendimento não seja considerado nesta análise.



Figura IV-9. Comportamento dinâmico do rendimento nos sistemas com dois estágios.



Figura IV-10. Comportamento dinâmico do rendimento nos sistemas com três estágios.

Os resultados obtidos utilizando a cinética de adsorção da lipase mostram um desempenho ruim do sistema CARE original e de configurações derivadas, pois obteve-se baixos rendimentos e baixos fatores de purificação, o que reduz a perspectiva de utilização destes sistemas diante de outras técnicas como a do leito móvel simulado.

IV.2. Configurações Derivadas do Sistema LMS

A seguir são apresentados os parâmetros operacionais utilizados na simulação computacional da purificação da lipase nas diferentes configurações do sistema de leito móvel simulado (LMS).

V = 0,1 litro $\varepsilon = 0,418$ S0 = 2,0 moles/litro $E0 = 2,0 \times 10^4$ U/litro C0 = 4,0 gramas/litro

FA = FZ3 = FZ4 = 0,15 litro/hora (para o LMS de três zonas)

FA = FZI = FZ3 = FD = 0,15 litro/hora (para o LMS de quatro zonas)

onde V é o volume de cada reator, ε é a porosidade do meio, S0 é a concentração de sal na alimentação, E0 é a concentração de enzima na alimentação, C0 é a concentração de impureza na alimentação, FA é o fluxo volumétrico de líquido na alimentação, FZ1, FZ3 e FZ4 é o fluxo volumétrico de líquido nas zonas 1, 3 e 4.

Simulou-se então o sistema de purificação de leito móvel simulado em diferentes configurações utilizando a cinética da lipase com o objetivo de comparar o desempenho do sistema CARE com o deste sistema contínuo de purificação de proteína. No entanto esta comparação é feita apenas quanto à configuração utilizada, uma vez que aspectos favoráveis ao sistema CARE, como a possibilidade de processar soluções sem pré tratamento, não são explicitamente levados em conta pelo modelo, além de outros aspectos como menor porosidade do sistema de leito móvel simulado, maior facilidade de entupimento do leito móvel simulado, maior cisalhamento no sistema CARE que também não são explicitamente levados do sistema CARE e do sistema LMS permite avaliar a eficácia destas configurações quando todos os outros parâmetros, como resina utilizada, concentração de enzima alvo na alimentação, fluxo de alimentação são mantidos os mesmos em todos os sistemas. Permite também comparar um sistema de purificação ainda pouco divulgado na literatura, como é o sistema CARE, com um sistema de purificação também contínuo, amplamente divulgado na literatura, como é o LMS.

Uma característica do leito móvel simulado é que em intervalos de tempo regulares, denominado de tempo de troca (TT), é feito o giro das válvulas simulando o movimento das colunas. O tempo de troca tem grande influência no desempenho do leito móvel simulado e por isso o desempenho das diferentes configurações de leito móvel, utilizando a cinética de adsorção da lipase foram avaliadas com tempos de troca na faixa de zero a três horas. O desempenho no estado estacionário das diferentes configurações em função do tempo de troca são apresentados na Tabela IV-3 e nas Figuras IV-11 a IV-20.

Estes resultados foram obtidos para mesmas condições de operação e volume de cada reator de 0,1 litro, variando portanto o volume total do sistema.

Pode-se verificar que para os três primeiros sistemas apresentados na Tabela IV-3, que são os sistemas de três zonas, ou seja, sistemas em que todo tampão que sai da zona de eluição é coletado como produto, as curvas de desempenho obtidas foram semelhantes. O rendimento, por exemplo, variou de forma semelhante, pois conforme o tempo de troca aumenta há uma queda inicial do rendimento, em seguida há um crescimento do rendimento até um valor máximo, indicando um tempo de troca ótimo para o rendimento e em seguida uma queda contínua do rendimento para tempos de troca superiores ao ótimo. O fator de purificação, a medida que o tempo de troca a partir de 0,4 horas, aumenta exponencialmente com o aumento do tempo de troca de 0,90 horas (54 minutos) com um fator de purificação de 3,19x10⁷. No caso do LMS8-e o maior rendimento foi de 85,56% obtido no tempo de troca de 0,80 horas (48 minutos) com um fator de purificação de 1,41x10²⁷. No caso do LMS8-2e o maior rendimento foi de 99.05% para o tempo de 0,90 horas com um fator de purificação de 1,01x10¹⁹.

O quarto sistema de purificação apresentado na Tabela IV-3, é um sistema de quatro zonas, pois parte do tampão de eluição onde o produto é coletado permanece no sistema. Este sistema de quatro zonas é recomendado para purificações onde não há diferença entre os tampões de alimentação e eluição, o que não é o caso da cinética da lipase estudada aqui. Este sistema realmente teve desempenho inferior aos sistemas de três zonas. No LMS8 o maior rendimento foi de 99,36% obtido no tempo de troca de 0,25 horas (15 minutos) e fator de purificação de 16,97. Apesar do alto rendimento obtido neste sistema de leito móvel de quatro zonas, o fator de purificação foi muito inferior aos obtidos nos sistemas de leito móvel de três zonas. Um desempenho tão superior deste sistema de leito móvel simulado de três zonas sobre o de quatro zonas, ocorre provavelmente devido a não mistura direta entre os fluxos de eluição e lavagem.

Tabela IV-3. Desempenho no estado estacionário do leito móvel simulado em função do tempo de troca (TT) utilizado.

TT (hr)								
	LMS4-	e (ε=0,418)	LMS8-	e (e=0,418)	LMS8-2e (==0,418)		LMS8 (c=0,418)	
	REND	FP	REND	FP	REND	FP	REND	FP
0.0041	33,333	0,999	33,331	0,999	33,333	0,999	49,999	0,999
0.0083	33,333	0,999	33,335	1,000	33,340	1,000	50,019	1,000
0,0125	33,333	1,000	33,326	0,997	33,354	0,998	49,789	0,992
0,0166	33,351	1,000	33,065	0,981	32,808	0,967	48,866	0,969
0,0208	33,362	0,999	33,192	1,003	32,742	0,983	51,558	1,054
0,0250	33,094	0,982	34,062	1,080	34,402	1,109	56,160	1,202
0,0291	32,657	0, 964	34,441	1,113	35,340	1,179	55,960	1,192
0,0333	32,504	0,972	34,645	1,134	35,904	1,230	54,273	1,132
0,0416	34,165	1,121	34,925	1,137	37,594	1,322	49,913	0,990
0,05	37,082	1,328	34,466	1,024	39,196	1,252	43,891	0,817
0,0666	40,359	1,378	34,073	0,860	38,964	0,951	33,848	0,571
0,0833	39,823	1,067	33,543	0,738	34,731	0,704	26,580	0,415
0,10	30,920	0,630	27,411	0,510	26,093	0,461	18,994	0,272
0,1166	17,918	0,296	16,462	0,262	15,523	0,242	10,776	0,138
0,1333	10,323	0,149	6,954	0,097	_6,688	0,092	4,019	0,045
0,15	9,805	0,146	9,410	0,137	9,024	0,131	4,456	0,053
0,175	10,434	0,199	10,671	0,204	9,799	0,186	51,258	0,855
0,20	10,387	0,278	10,791	0,293	9,122	0,246	83,024	2,123
0,225	10,535	0,423	11,146	0,484	8,204	0,353	96,043	3,962
0,25	11,252	0,714	12,094	1,071	7,171	0,611	99,226	8,349
0,275	12,758	1,323	13,892	5,164	6,283	1,590	99,360	16,967
0,30	15,335	2,646	16,834	99,912	6,943	8,465	98,869	13,425
0,325	19,194	5,565	21,108	3916,634	25,765	200,990	98,168	8,743
0,35	24,286	11,891	26,599	164179,902	50,483	2702,831	78,870	5,447
0,40	36,395	51,552	39,083	2,0066x10 ⁸	74,378	168421,732	53,253	2,834
0,45	47,834	201,082	50,377	1,3682x10 ¹¹	84,236	6292970,996	45,306	2,120
0,50	57,256	739,270	59,471	5,7157x10 ¹³	89,426	1,7585x10 ⁸	40,254	1,747
0,65	75,464	35609,793	76,629	5,2196x10 ²⁰	96,076	1,8553x10 ¹²	27,697	1,050
0,80	85,151	1989807,867	85,558	1,4082x10 ²⁷	98,361	1,8998x10 ¹⁶	18,203	0,624
0,90	89,155	3,1962x10 ⁷	83,169	2,6051x10 ³¹	99,054	1,0154x10 ¹⁹	14,971	0,499
1,00	83,820	5,0008x10 ⁸		4,9040x10 ³⁵	89,553	5,3341x10 ²¹	12,650	0,417
1,10	76,470	8,1231x10⁹	67,992	9,9502x10 ³⁹	78,331	2,9208x10 ²⁴	10,588	0,345
1,20	69,772	1,3969x10 ¹¹	61,454	2,1521x10 ⁴⁴	69,063	1,7155x10 ²⁷	8,745	0,281
1,30	63,731	2,5248x10 ¹²	55,613	4,9172x10 ⁴⁸	61,330	1,0695x10 ³⁰	7,166	0,228
1,40	58,312	4,7667x10 ¹³	50,417	1,1782x10 ⁵³	54,810	7,0188x10 ³²	5,880	0,185
1,50	53,463	9,3534x10 ¹⁴	45,803	2,9437x10 ⁵⁷	49,262	4,8160x10 ³⁵	4,836	0,152
2,00	35,837	4,2691x10 ²¹	29,334	4,6299x10 ⁷⁹	30,842	1,2127x10 ⁵⁰	16,169	0,510
2,50	25,329	3,3141x10 ²⁸	19,790	1,2705×10 ¹⁰²	20,803	5,4148x10 ⁶⁴	21,182	0,661
3,00	18,664	3,6493x10 ³⁵	13,886	4,9972x10 ¹²⁴	14,696	3,4794x10 ⁷⁹	24,011	0,742

Uma vantagem deste processo de leito móvel simulado é que dado uma especificação da pureza requerida para um produto, é possível que acima do tempo de troca ótimo, esta pureza seja atingida em uma unidade única com uma única passagem pelo sistema. Com isto, ao invés de processamentos múltiplos utilizando o tempo de troca ótimo, para o qual o rendimento é máximo mas a purificação é menor, pode ser vantajoso operar a tempos de troca maiores para os quais, apesar do menor rendimento, obtêm-se maiores

fatores de purificação e assim, a pureza requerida do produto pode ser alcançada com uma única passagem pela unidade de purificação, reduzindo as perdas por deterioração das proteínas além da economia de tempo. Este aumento no fator de purificação é possível modificando-se apenas o tempo de troca, ou seja, o intervalo de tempo em que é feito o giro das válvulas, sem que seja necessário variar qualquer outro parâmetro operacional ou de projeto. O sistema CARE além do fator de purificação bem menor, só pode ser melhorado com modificações operacionais ou de projeto, ainda assim aumentando muito pouco o fator de purificação.



Figura IV-11. Rendimento do sistema LMS4-e no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-12. Fator de purificação do sistema LMS4-e no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-13. Rendimento do sistema LMS8-e no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-14. Fator de purificação do sistema LMS8-e no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-15. Rendimento do sistema LMS8-2e no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-16. Fator de purificação do sistema LMS8-2e no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-17. Rendimento do sistema LMS8 no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-18. Fator de purificação do sistema LMS8 no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-19. Rendimento do sistema LMS no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-20. Fator de purificação do sistema LMS no estado estacionário em função do tempo de troca.

Podemos verificar que o leito móvel simulado teve um desempenho muito superior ao do sistema CARE original e de configurações derivadas. Mesmo o leito móvel simulado de quatro zonas que teve o pior desempenho entre as configurações estudadas foi superior ao sistema CARE. Este baixo desempenho do sistema CARE original e de configurações derivadas pode acabar com a vantagem de operar estes reatores com membrana, sem pré tratamento das soluções.

IV.3. Leito Móvel Simulado de Quatro Colunas

A seguir são apresentados os resultados obtidos para o leito móvel simulado de quatro colunas e três zonas (LMS4-e) utilizando o tempo de troca ótimo para este sistema que é de 0,9 horas. Estes resultados foram obtidos partindo-se de colunas inicialmente

isentas de enzima, impurezas e sal, simulando o início da operação do sistema. Nas Figuras IV-21, IV-22, IV-23 e IV-24 são apresentados os perfis temporais da concentração de enzima na saída das colunas 4 e 3 juntamente com a concentração de enzima média durante o intervalo do tempo de troca. Pode-se verificar que a concentração de enzima na saída se modifica continuamente ao longo do tempo e quando chega o tempo de troca, há uma variação brusca na concentração. Estas variações contínuas da concentração de enzima são devido à perturbação causada pelo giro das válvulas do sistema ou o giro das colunas, que causa uma modificação abrupta na concentração de enzima que entra em cada coluna e, consequentemente, causa uma modificação abrupta na concentração de saída de cada coluna. Podemos verificar que a concentração média que sai do sistema a cada intervalo de tempo de troca se modifica até atingir um valor estacionário, ou seja, a partir de um certo tempo as variações de concentração de enzima dentro de cada intervalo de tempo de troca são sempre as mesmas e a concentração média de saída não se modifica. Esta situação que ocorre no LMS pode ser visualizada como um estado pseudo-estacionário, pois a concentração que atinge o estado estacionário é a concentração média coletada dentro de cada intervalo de tempo de troca enquanto que a concentração de saída varia continuamente.



Figura IV-21. Concentração de enzima na saída da coluna quatro (*E4*) do sistema LMS4-e em função do tempo. (TT=0,9 hr).



Figura IV-22. Concentração de enzima na saída da coluna três (*E3*) do sistema LMS4-e em função do tempo. (TT=0,9 hr).

Podemos verificar através das Figuras IV-23 e IV-24, que após 20 horas, a concentração de saída média dentro de cada intervalo de tempo de troca atingiu um valor constante.

Na Figura IV-25 é apresentada a resposta dinâmica do rendimento médio do sistema de LMS de quatro colunas e três zonas. O rendimento médio é a média do rendimento obtido dentro de cada intervalo de tempo de troca.



Figura IV-23. Concentração de enzima na saída da coluna quatro (*E4*) do sistema LMS4-e em função do tempo (TT=0,9 hr).



Figura IV-24. Concentração de enzima na saída da coluna três (*E3*) do sistema LMS4-e em função do tempo (TT=0,9 hr).



Figura IV-25. Rendimento médio do sistema LMS4-e em função do tempo. TT=0,9 hr.

Assim como ocorre com a concentração de enzima, a concentração de impurezas e de sal também oscilam ao longo do tempo (Figuras IV-26, IV-27, IV-28 e IV-29), até que esta oscilação dentro de cada intervalo de tempo de troca, se estabiliza fazendo com que a concentração de saída média dentro de cada intervalo de tempo se mantenha constante. A concentração média de sal e impurezas dentro do intervalo de tempo de troca atinge o valor estacionário a partir do terceiro giro das válvulas enquanto que para a enzima isto ocorre a partir do décimo giro de válvulas. Este maior tempo ocorre devido às interações entre a enzima e a resina adsorvente.



Figura IV-26. Concentração de impureza na saída da coluna quatro (C4) do sistema LMS4-e em função do tempo. (TT=0,9 hr).



Figura IV-27. Concentração de impureza na saída da coluna três (*C3*) do sistema LMS4-e em função do tempo. (TT=0,9 hr).

A concentração média de enzima na saída da coluna três onde o produto é coletado (extrato) é maior que a concentração na saída da coluna quatro (refinado) enquanto que a concentração média de impurezas é maior na saída da coluna quatro do que na saída da coluna três. Esta situação é muito favorável para a purificação pois a concentração de enzima no extrato é maior do que no refinado. Entretanto a purificação pode ocorrer mesmo para casos onde a concentração de enzima no extrato é menor do que no refinado ao mesmo tempo em que a concentração de impurezas no extrato é muito menor do que no refinado, ou seja, proporcionalmente, a redução na quantidade de impurezas no extrato foi maior do que a redução na quantidade de enzima. Obviamente na primeira situação, mais favorável, o rendimento é maior.



Figura IV-28. Concentração de sal na saída da coluna quatro (S4) do sistema LMS4-e em função do tempo. (TT=0,9 hr).



Figura IV-29. Concentração de sal na saída da coluna três (S3) do sistema LMS4-e em função do tempo. (TT=0,9 hr).

Nas Figuras IV-30 e IV-31 são apresentados os perfis de concentração de enzima alvo e impurezas ao longo das quatro colunas no instante imediatamente anterior ao giro das válvulas do sistema. Este perfil de concentração é observado ao final de cada intervalo de tempo de troca após a concentração de saída média atingir o estado pseudo-estacionário. Assim como a concentração de saída da coluna, o perfil ao longo das colunas do leito móvel simulado se modifica continuamente. No entanto pode-se também obter um perfil médio de concentração dentro de cada intervado de tempo de troca.

Nestes perfis o fluxo de líquido ocorre da direita para a esquerda e portanto a entrada de cada coluna está à direita e a saída à esquerda da abscissa. No LMS4-e a alimentação é feita na coluna 1, o tampão de eluição é introduzido na coluna 3 (lado direito da Figura IV-30 e IV-31), o tampão de lavagem é introduzido na coluna 2, enquanto o extrato é coletado na saída da coluna 3 e o refinado na saída da coluna 4 (lado esquerdo da Figura IV-30 e IV-31). O perfil de enzima e impurezas ao longo das colunas foram bem

diferentes. Podemos verificar no perfil de enzima (Figura IV-30) que a concentração de enzima na coluna 3 vai aumentando ao longo da coluna até um valor máximo que é a concentração de enzima no extrato, esta concentração de enzima cai bruscamente no início da coluna 2 onde ocorre a entrada do tampão de lavagem e vai aumentando ao longo da coluna. No início da coluna 1 é feito a introdução da solução de alimentação mais o que sai da coluna 2, e a concentração de enzima aumenta bruscamente e em seguida cai continuamente até a saída da coluna quatro onde é coletado o refinado. No perfil de concentração de impurezas (Figura IV-31), obtido ao final do tempo de troca, a concentração de impurezas é zero nas colunas 2 e 3, aumenta bruscamente no início da coluna 1 devido a alimentação e se mantém igual a concentração de impurezas da alimentação ao longo das colunas 1 e 4. Isto ocorre porque as impurezas não são adsorvidas pela resina, o movimento simulado do sólido para a direita não transporta impurezas. As impurezas só são transportados pela fase líquida para a direita devido ao movimento simulado das colunas neste sentido, e como este perfil corresponde ao final do tempo de troca, neste tempo toda a impureza foi carregada pela fase líquida para a esquerda. Por isso a concentração de impurezas é igual a da alimentação nas colunas 1 e 4.



Figura IV-30. Perfil de concentração de enzima ao final de cada tempo de troca ao longo das quatro colunas do sistema LMS4-e.



Figura IV-31. Perfil de concentração de impureza ao final de cada tempo de troca ao longo das quatro colunas do sistema LMS4-e.

IV.4. Configurações Derivadas do Sistema TMMS

Outro sistema de purificação que teve seu desempenho avaliado no estado estacionário foi o tanque de mistura móvel simulado. A seguir são apresentados os parâmetros operacionais utilizados na simulação computacional da purificação da lipase nas diferentes configurações do sistema de tanque de mistura móvel simulado.

$$V = 0,1$$
 litro
 $\varepsilon = 0,85$
 $S0 = 2,0$ moles/litro
 $E0 = 2,0x10^4$ U/litro
 $C0 = 4.0$ gramas/litro

FA = FZ3 = FZ4 = 0,15 litro/hora (para o TMMS de três zonas)

O desempenho das diferentes configurações do sistema de purificação tanque de mistura móvel simulado também foram avaliadas com tempos de troca na faixa de zero a três horas e os resultados são apresentados na Tabela IV-4 e Figuras IV-32 a IV-39. Estes resultados foram obtidos para mesmas condições de operação e volume de cada reator de 0,1 litro, variando portanto o volume total do sistema. Podemos verificar que, de uma forma geral, há uma queda no rendimento e um aumento no fator de purificação com o aumento do tempo de troca utilizado. A ocorrência de um rendimento ótimo se dá para valores de tempo de troca próximos de zero onde o fator de purificação é baixo. Para os sistemas formados por oito reatores tanques ocorre uma oscilação mais acentuada do rendimento para tempos de troca próximos de zero do que no sistema formado por quatro tanques. No sistema TMMS8-2e esta oscilação faz com que o rendimento máximo seja deslocado para 0,0834 horas (5 minutos). Contudo o rendimento máximo também ocorre na região de baixo fator de purificação. Quanto ao fator de purificação, este tende a se manter constante com pequenas variações até o tempo de troca de 0,5 horas. Para tempos de troca maiores que 0,5 horas o fator de purificação aumenta exponencialmente como ocorreu para o sistemas de leito móvel simulado de três zonas.

O TMMS assim como o LMS tem a vantagem de poder aumentar o fator de purificação modificando-se apenas o tempo de troca. Esta capacidade de alterar o rendimento e o fator de purificação destes sistemas através da alteração no tempo de troca, deve-se ao fato de que o tempo de troca juntamente com o fluxo de líquido no interior das zonas estão diretamente ligados ao movimento contra-corrente simulado. O movimento contra-corrente simulado entre a fase líquida e a fase sólida interfere nas velocidades relativas com que as proteínas e as impurezas percorrem os reatores, alterando o rendimento e o fator de purificação.

Tabela IV-4. Desempenho no estado estacionário do tanque de mistura móvel simulado em função do tempo de troca (TT) utilizado.

	FA EO CO SO		FA #0 C0 30 0 50		FA ED CO SO 50 50		
TT (hr)	<u></u>		÷÷÷				
	TMACA		TMAKER -	TH (22 / 22)		Thanks 2 - (0.95)	
	<u>1MMS4-e (ε=0,85)</u>		TIVIIVIS8-C	1 MMS8-e (E=0,85)		1 MM58-20 (E=0,85)	
	REND	FP	REND	FP	REND	<u>۲۳</u>	
0,0041	33,379	0,999	33,380	0,999	33,489	0,999	
0,0083	33,450	0,999	33,452	0,999	33,645	0,999	
0,0125	33,515	0,999	33,520	0,999	33,798	0,999	
0,0166	33,5/4	0,999	33,581	0,998	33,946	0,999	
0,0208	33,627	0,998	33,636	0,998	34,089	0,998	
0,0250	33,683	0,997	33,695	0,996	34,256	0,997	
0,0291	33,719	0,996	33,733	0,995	34,380	0,996	
0,0333	33,749	0,995	33,764	0,994	34,494	0,995	
0,0416	33,784	0,993	33,801	0,990	34,689	0,991	
0,05	33,785	0,989	33,806	0,985	34,854	0,985	
0,0666	33,692	0,981	33,732	0,974	35,014	0,970	
0,0833	33,470	0,970	33,563	0,960	35,028	0,951	
0,10	33,146	0,958	33,333	0,944	34,928	0,929	
0,1166	32,775	0,947	33,080	0,929	34,763	0,907	
0,1333	32,339	0,936	32,793	0,913	34,540	0,884	
0,15	31,883	0,927	32,500	0,898	34,290	0,862	
0,175	31,220	0,918	32,092	0,880	33,920	0,832	
0,20	30,602	0,915	31,754	0,871	33,612	0,811	
0,225	30,051	0,919	31,531	0,873	33,450	0,802	
0,25	29,574	0,931	31,451	0,891	33,500	0,809	
0,275	29,167	0,951	31,501	0,928	33,790	0,835	
0,30	28,821	0,978	31,618	0,986	34,283	0,882	
0,325	28,519	1,012	31,695	1,064	34,887	0,950	
0,35	28,246	1,053	31,598	1,162	35,465	1,038	
0,40	27,725	1,154	30,487	1,401	35,981	1,259	
0,45	27,161	1,278	28,214	1,694	35,196	1,520	
0,50	26,503	1,420	25,507	2,068	33,519	1,825	
0,65	24,044	1,950	18,828	4,253	28,301	3,270	
0,80	21,432	2,643	14,760	10,088	24,552	6,211	
0,90	19,837	3,219	12,885	18,525	22,412	9,546	
1,00	18,395	3,905	11,397	34,159	20,357	14,493	
1,10	17,094	4,721	10,168	62,659	18,363	21,642	
1,20	15,914	5,685	9,120	113,810	16,461	31,772	
1,30	14,836	6,822	8,209	204,292	14,688	45,931	
1,40	13,845	8,155	7,404	362,238	13,070	65,535	
1,50	12,930	9,716	6,686	634,646	11,619	92,506	
2,00	9,237	22,275	4,030	9000,667	6,563	468,960	
2,50	6,651	48,417	2,420	106966,895	3,917	2196,651	
3,00	4,848	102,340	1,450	1150276,584	2,456	10000,047	



Figura IV-32. Rendimento do sistema TMMS4-e no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-33. Fator de purificação do sistema TMMS4-e no estado estacionário em função do tempo de troca.


Figura IV-34. Rendimento do sistema TMMS8-e no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-35. Fator de purificação do sistema TMMS8-e no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-36. Rendimento do sistema TMMS8-2e no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-37. Fator de purificação do sistema TMMS8-2e no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-38. Rendimento do sistema TMMS no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-39. Fator de purificação do sistema TMMS no estado estacionário em função do tempo de troca.

IV.5. Tanque de Mistura Móvel Simulado de Quatro Tanques

A seguir são apresentados os resultados obtidos para o tanque de mistura móvel simulado de quatro tanques e três zonas (TMMS4-e) utilizando o tempo de troca de 3,0 horas. O tempo de troca ótimo deste sistema é de 0,05 horas para o qual obtém rendimento máximo de 33,79% mas com fator de purificação de apenas 0,98, ou seja, não houve purificação alguma. Escolhemos o tempo de troca de três horas pois é o tempo de troca que se obtém o maior fator de purificação (102,34) apesar do baixo rendimento (4,85%). Estes resultados foram obtidos partindo-se de reatores tanque de mistura inicialmente isentos de enzima, impurezas e sal, simulando o início da operação do sistema. Nas Figuras IV-40 e IV-41 são apresentados os perfis temporais da concentração de enzima na saída dos tanques 4 e 3 juntamente com a concentração de enzima média durante o intervalo do tempo de troca. Podemos verificar que no tanque de mistura móvel simulado, assim como no sistema de leito móvel simulado, a concentração de enzima na saída se modifica continuamente ao

longo do tempo e quando chega o tempo de troca há uma variação brusca na concentração devido a perturbação causada pelo giro das válvulas do sistema ou o giro dos tanques de mistura. Podemos verificar que a concentração média de saída do sistema a cada intervalo de tempo de troca, também atinge um valor estacionário a partir de certo tempo, quando as variações de concentração de enzima dentro de cada intervalo de tempo de troca são sempre as mesmas e a concentração média de saída não se modifica.



Figura IV-40. Concentração de enzima na saída do tanque quatro (E4) do sistema TMMS4e em função do tempo. (TT=3,0 hr).



Figura IV-41. Concentração de enzima na saída do tanque três (*E3*) do sistema TMMS4-e em função do tempo. (TT=3,0 hr).

Na Figura IV-42 é apresentada a resposta dinâmica do rendimento médio do sistema de TMMS de quatro colunas e três zonas. O rendimento médio é a média do rendimento obtido dentro de cada intervalo de tempo de troca.



Figura IV-42. Rendimento médio do sistema TMMS4-e em função do tempo. TT=3,0 hr.

Assim como ocorre para o LMS, no TMMS a concentração média de impurezas e de sal (Figuras IV-43, IV-44, IV-45 e IV-46) atinge um valor estacionário dentro de cada intervalo de tempo de troca após decorrido três tempos de troca. No TMMS a concentração média de enzima atingiu um valor constante a partir do quarto intervalo de tempo de troca.



Figura IV-43. Concentração de impureza na saída do tanque quatro (C4) do sistema TMMS4-e em função do tempo. (TT=3,0 hr).



Figura IV-44. Concentração de impureza na saída do tanque três (*C3*) do sistema TMMS4-e em função do tempo. (TT=3,0 hr).



Figura IV-45. Concentração de sal na saída do tanque quatro (S4) do sistema TMMS4-e em função do tempo. (TT=3,0 hr).



Figura IV-46. Concentração de sal na saída do tanque três (S3) do sistema TMMS4-e em função do tempo. (TT=3,0 hr).

Tanto a concentração média de enzima quanto a de impurezas foram menores na saída do reator três (extrato) do que na saída do reator quatro (refinado). Apesar desta menor concentração de enzima no extrato levar a um baixo rendimento, a purificação ocorreu pois a redução da concentração de impurezas no extrato foi maior do que a redução da concentração de enzima.

Nas Figuras IV-47 e IV-48 são apresentados os perfis discretos de concentração de enzima alvo e impurezas dos quatro reatores do sistema TMMS4-e no instante imediatamente anterior ao giro das válvulas do sistema. Este perfil de concentração é observado ao final de cada intervalo de tempo de troca após a concentração de saída média adquirir um valor constante. Como o sistema TMMS é formado por tanques de mistura a concentração no interior de cada reator tanque é uniforme. Assim, diferentemente do LMS, cujo perfil de concentração ao longo do sistema de purificação varia de forma contínua, o

perfil de concentração no TMMS varia de forma discreta. O fluxo de líquido ocorre da direita para a esquerda, enquanto que o fluxo simulado de sólido é da esquerda para a direita. A concentração de enzima no tanque de eluição (tanque 3) é baixa, aumenta um pouco no tanque de lavagem (tanque 2). A concentração de enzima no tanque 1 aumenta significativamente devido à introdução da solução de alimentação e aumenta um pouco no tanque 4. Este resultado mostra que o transporte de enzima da esquerda para a direita feito pelo movimento simulado da fase sólida não foi muito eficaz comparado ao resultado obtido com o leito móvel simulado. Esta menor eficácia no transporte de enzima pelo movimento simulado do sólido deve-se à diferença entre o reator de mistura e de coluna e a diferença de porosidade do meio nos dois sistemas. O perfil de concentração de impureza do TMMS4-e foi semelhante ao obtido no LMS4-e e também se concentrou do lado esquerdo do sistema de purificação (Figura IV-48).



Figura IV-47. Perfil de concentração de enzima ao final de cada tempo de troca no interior de cada tanque do sistema TMMS4-e.



Figura IV-48. Perfil de concentração de impureza ao final de cada tempo de troca no interior de cada tanque do sistema TMMS4-e.

IV.6. Comparação entre os Sistemas LMS4-e & TMMS40-10e

Sabe-se que uma série infinita de reatores tanques de mistura equivale a um reator de fluxo pistonado. Portanto, se o número de reatores tanques de mistura de cada zona forem aumentando com redução proporcional de volume de forma a manter o volume total do sistema constante, o comportamento do sistema de tanque de mistura móvel simulado tenderá ao sistema de leito móvel simulado exceto pela diferença de porosidade.

Para sistemas onde um grande número de reatores tanques de mistura se torna viável, o sistema de reator tanque de mistura móvel simulado pode ser uma alternativa interessante. Assim, um sistema formado por quarenta tanques de mistura, pode ter um desempenho muito próximo do de um leito móvel simulado de quatro colunas, tendo a vantagem de trabalhar com soluções sem pré-purificação e a desvantagem do grande número de tanques necessário.

A seguir são apresentados os parâmetros operacionais utilizados na simulação computacional da purificação da lipase nas diferentes configurações do sistema de leito móvel simulado e de tanque de mistura móvel simulado.

V = 0,1 litro (para cada reator do LMS de três zonas)

 $\varepsilon = 0,418$ (para o LMS de três zonas)

V = 0,01 litro (para cada reator do TMMS de três zonas)

 $\varepsilon = 0.85$ (para o TMMS de três zonas)

S0 = 2,0 moles/litro

 $E0 = 2,0 \times 10^4$ U/litro

C0 = 4,0 gramas/litro

FA = FZ3 = FZ4 = 0,15 litro/hora

A Tabela IV-5 mostra os resultados do leito móvel simulado de três zonas e quatro colunas e do tanque de mistura móvel simulado de três zonas e quarenta tanques. Para esta comparação o volume total foi mantido constante, ou seja, o volume de dez tanques de mistura é igual ao volume de uma coluna. Avaliou-se o desempenho do sistema formado por tanques de mistura para porosidades de 0,85 e 0,65. O desempenho do sistema TMMS40-10e com porosidade de 0,65; que corresponde a um tanque de mistura mais compacto, tem exatamente o mesmo desempenho de um sistema LMS4-e com porosidade de 0,65; que corresponde a um leito fixo menos compacto.

TT (hr)			ġţġġţġ ġţġ		ġġġġġ ġ	
	LMS4-e (ε=0,418)		TMMS40-10e (ε=0,85)		TMMS40-10e (ε=0,65)	
	REND	FP	REND	FP	REND	FP
0,0041	33,333	0,999	33,333	0,999	33,333	0,999
0,0083	33,333	0,999	33,333	0,999	33,333	0,999
0,0125	33,333	1,000	33,333	0,999	33,333	0,999
0,0166	33,351	1,000	33,333	0,999	33,332	1,000
0,0208	33,362	0,999	33,333	0,999	33,333	1,000
0,0250	33,094	0,982	33,332	1,000	33,348	1,000
0,0291	32,657	0, 964	33,332	1,000	33,377	1,000
0,0333	32,504	0,972	33,340	1,000	33,385	0,998
0,0416	34,165	1,121	33,404	1,000	33,083	0,978
0,05	37,082	1,328	33,449	0,993	32,465	0,966
0,0666	40,359	1,378	32,725	0,975	33,864	1,133
0,0833	39,823	1,067	32,238	1,055	36,628	1,326
0,10	30,920	0,630	32,795	1,170	38,682	1,343
0,1166	17,918	0,296	33,741	1,220	39,832	1,221
0,1333	10,323	0,149	35,221	1,212	39,216	1,008
0,15	9,805	0,146	37,008	1,149	35,735	0,768
0,175	10,434	0,199	39,264	1,000	25,776	0,443
0,20	10,387	0,278	39,991	0,835	16,302	0,241
0,225	10,535	0,423	38,598	0,680	14,469	0,209
0,25	11,252	0,714	35,592	0,549	15,814	0,257
0,275	12,758	1,323	34,149	0,490	17,061	0,333
0,30	15,335	2,646	36,583	0,536	18,240	0,440
0,325	19,194	5,565	40,164	0,648	19,619	0,603
0,35	24,286	11,891	43,453	0,800	21,321	0,857
0,40	36,395	51,552	48,102	1,226	25,975	1,892
0,45	47,834	201,082	44,625	1,679	32,548	4,507
0,50	57,256	739,270	37,870	2,218	40,757	10,964
0,65	75,464	35609,793	26,749	6,910	56,201	116,973
0,80	85,151	1989807,867	22,362	27,380	53,204	953,598
0,90	89,155	3,1962x10 ⁷	20,228	71,877	49,765	4057,829
1,00	83,820	5,0008x10 ⁸	18,243	194,278	45,936	18149,055
1,10	76,470	8,1231x10 ⁹	16,373	542,435	42,087	85283,757
1,20	69,772	1,3969x10 ¹¹	14,643	1567,735	38,409	419611,627
1,30	63,731	2,5248x10 ¹²	13,068	4689,607	34,994	2152785,543
1,40	58,312	4,7667x10 ¹³	11,655	14496,032	31,875	1,1470x10 ⁷
1,50	53,463	9,3534x10 ¹⁴	10,397	46200,562	29,051	6,3241x10 ⁷
2,00	35,837	$4,2691 \times 10^{21}$	5,991	2,2227x10 ⁷	18,702	4,8624x10 ¹¹
2,50	25,329	3,3141x10 ²⁸	3,605	1,7159x10 ¹⁰	12,611	6,1608x10 ¹⁵
3,00	18,664	3,6493x10 ³⁵	2,254	1,8302x10 ¹³	8,852	1,0926x10 ²⁰

Tabela IV-5. Desempenho no estado estacionário dos sistemas de purificação em função do tempo de troca (TT) utilizado.

Pode-se verificar que o desempenho do leito móvel simulado foi superior ao desempenho do sistema de tanque de mistura móvel simulado. Como as equações matemáticas do modelo do sistema de leito móvel simulado de quatro colunas e três zonas discretizadas em dez partes são idênticas ao sistema de tanque de mistura móvel simulado de quarenta tanques e três zonas esta diferença deve-se basicamente à diferença de porosidade nos dois sistemas. Tanto o rendimento máximo quanto o fator de purificação do leito móvel simulado foram superiores ao tanque de mistura móvel simulado. Se a

porosidade do sistema de tanque de mistura móvel simulado for reduzida e portanto se aproximar da porosidade do leito móvel simulado os perfis do rendimento e do fator de purificação do sistema de tanque de mistura móvel simulado tenderão aos perfis do leito móvel simulado. Se o leito móvel simulado tiver uma porosidade maior, como a de um leito expandido por exemplo, os perfis do rendimento e fator de purificação serão cada vez mais próximos dos perfis obtidos nos tanques de mistura à medida que a porosidade do leito se aproximar da porosidade do tanque de mistura.



Figura IV-49. Rendimento do sistema LMS e TMMS no estado estacionário em função do tempo de troca.



Figura IV-50. Fator de purificação do sistema LMS e TMMS no estado estacionário em função do tempo de troca.

V – CONCLUSÕES

O desempenho dos sistemas derivados do sistema CARE foram avaliados utilizando as cinéticas de adsorção das enzimas lisozima e lipase. Foram avaliados aspectos como o número de estágios, tipo de reator utilizado, tipo de membrana utilizada no primeiro estágio, modificação no reciclo. O efeito do aumento do número de estágios e do tipo de reator com membrana utilizado foi avaliado utilizando as duas cinéticas. O efeito do aumento do número de estágios e mudança no tipo de reator com membranas promoveram variações mais significativas no desempenho utilizando a cinética de adsorção da lisozima. O desempenho dos sistemas utilizando a cinética de adsorção da lisozima. O desempenho utilizando a cinética da lipase, no entanto este melhor desempenho e variações mais significativas devem-se provavelmente à maior idealidade do modelo cinético da lisozima. Assim, apesar de variações mais brandas de desempenho e do desempenho inferior dos sistemas utilizando a cinética de adsorção da lipase, estes resultados estão mais próximos daqueles que ocorrem na realidade, pois este modelo leva em conta as misturas entre os tampões de adsorção e eluição que ocorrem no sistema.

Verificou-se que para os sistemas derivados do sistema CARE, a inclusão de um estágio intermediário de lavagem levou a uma redução no rendimento e a um aumento no fator de purificação. Esta tendência foi observada tanto para os sistemas empregando reatores tanque de mistura com membrana quanto para os sistemas empregando reatores de fluxo pistonado com membrana, independentemente da cinética de adsorção utilizada. Verificou-se que, para os sistemas derivados do sistema CARE, o rendimento e o fator de purificação em geral apresentam tendências opostas, pois uma modificação que aumenta o rendimento reduz o fator de purificação e vice versa.

Nos sistemas derivados do sistema CARE com dois estágios, o rendimento e o fator de purificação foram aproximadamente os mesmos tanto para o sistema empregando tanques de mistura com membrana quanto para o sistema empregando reatores de fluxo pistonado com membrana. Para os sistemas com três estágios, o rendimento foi aproximadamente o mesmo independentemente do tipo de reator utilizado, enquanto que o fator de purificação obtido no sistema empregando reatores de fluxo pistonado foi superior ao sistema empregando reatores de mistura. Assim, para sistemas com três estágios, a

utilização de reatores de fluxo pistonado melhorou de forma mais expressiva a purificação da enzima.

As modificações no tipo de membrana utilizada no primeiro estágio e a modificação no reciclo do sistema foram avaliados apenas considerando a cinética de adsorção da lisozima. A substituição da membrana do primeiro estágio por outra com menor diâmetro de corte levou a um aumento no rendimento e uma redução no fator de purificação tanto para os sistemas formados por tanques de mistura com membrana quanto para o sistema formado por reator de fluxo pistonado com membrana. A modificação no reciclo não produziu nenhuma melhora no desempenho do sistema CARE. De uma forma geral, os sistemas derivados do sistema CARE tiveram um desempenho fraco pois como pode ser observado utilizando os parâmetros cinéticos mais realísticos da enzima lipase a capacidade de purificação destes sistemas foi baixa.

As diferentes configurações dos sistemas de leito móvel simulado tiveram seu desempenho avaliado utilizando-se a cinética de adsorção da lipase. O desempenho dos sistemas de leito móvel simulado de três zonas e quatro ou oito colunas tiveram desempenho muito superior ao sistema de leito móvel simulado de quatro zonas e oito colunas. Os sistemas de LMS de três zonas além do alto rendimento tiveram altos fatores de purificação enquanto que o LMS de quatro zonas teve um alto rendimento mas um fator de purificação não muito elevado. A literatura indica o uso do leito móvel simulado de três zonas para purificar enzimas em que há mudança de tampão na eluição. Como os parâmetros cinéticos de adsorção utilizados nesta tese foram obtidos usando tampões diferentes para a adsorção e eluição, o melhor desempenho dos sistemas de LMS em função do tempo de troca mostrou que os sistemas de LMS de três zonas termum tempo de troca ótimo para o qual obtem-se um rendimento máximo. Os rendimentos máximos obtidos foram superiores a 85% com elevados fatores de purificação.

O desempenho dos sistemas de configurações derivadas do LMS tiveram um desempenho muito superior aos sistemas de configurações derivadas do CARE. Este melhor desempenho foi devido à obtenção de um maior rendimento e de um maior fator de purificação. Com este resultado pode-se concluir que, para sistemas onde a solução a ser

188

purificada seja isenta de partículas sólidas que possam provocar entupimento das colunas, a utilização do LMS produzirá uma purificação muito melhor e com um alto rendimento. Assim a utilização dos sistemas derivados do sistema CARE só é viável nos casos em que o LMS não possa ser utilizado devido a entupimentos da coluna, oque pode ser resolvido pela utilização de reatores com membrana.

O alto desempenho do sistema de LMS comparado ao sistema CARE inspirou a proposta do sistema TMMS. O sistema de purificação TMMS consiste da substituição das colunas do LMS por reatores tanque de mistura com membranas. Assim pretendeu-se unir o alto desempenho do sistema LMS com a possibilidade de processar soluções sem prétratamento do sistema CARE. O sistema de purificação de TMMS tem como vantagem sobre o sistema CARE, não precisar transportar a resina de adsorção entre os tanques, como ocorre no CARE. No TMMS, assim como no LMS, o transporte de sólido é simulado pelo movimento das válvulas e somente líquido é transportado entre os tanques de mistura. O desempenho das configurações derivadas do TMMS de três zonas foi avaliado em função do tempo de troca. Pode-se verificar que, de uma forma geral, com o aumento do tempo de troca há uma redução no rendimento e um aumento no fator de purificação. Para o maior tempo de troca usado neste trabalho, três horas, as configurações derivadas do sistema TMMS apresentaram rendimentos mais baixos e fatores de purificação maiores que o sistema CARE. O desempenho do LMS foi superior ao do TMMS pois apresentou maior rendimento e maior fator de purificação. Como o desempenho do TMMS foi superior ao do sistema CARE devido ao maior fator de purificação, pode-se considerar que o TMMS teve um desempenho intermediário entre os dois sistemas. Esta diferença de desempenho entre o TMMS e o LMS deve-se não apenas a diferença de características próprias dos reatores tanque de mistura com membrana e dos reatores de coluna mas também, deve-se à diferença de porosidade dos dois sistemas. Esta conclusão provém da simulação computacional do sistema de LMS de quatro colunas e da simulação do sistema de TMMS de quarenta tanques. Isto porque as equações matemáticas obtidas para estes dois sistemas são as mesmas e portanto a diferença de desempenho foi exclusivamente devido às diferentes porosidades. O volume total entre estes sistemas foi o mesmo e o sistema de LMS, por ser constituído por leitos fixos possui uma porosidade menor e portanto mais resina de adsorção por volume de reator. O TMMS por ser constituído por tanques de

mistura, necessita de uma porosidade maior para que haja fluidez no interior dos tanques e assim a quantidade de resina de adsorção por volume de reator é menor. Logo o desempenho do sistema de TMMS pode ser aumentado com a redução da porosidade até o limite físico exigido pela fluidez do meio. Com um aumento da porosidade do sistema de LMS tal como ocorre nos leitos fluidizados e leitos expandidos permite que soluções com partículas sólidas sejam processadas à custa de uma redução no desempenho deste sistema.

Os resultados de purificação do sistema CARE utilizando as cinéticas de adsorção das enzimas lisozima e lipase mostrou que o desempenho destes sistemas são fortemente dependentes dos parâmetros cinéticos utilizados. Assim um sistema pode ter um bom desempenho de purificação para uma enzima e não ter para outra devido às diferenças nos parâmetros cinéticos de adsorção. A princípio todas as configurações dos sistemas estudados neste trabalho para purificação podem ser estendidos aos sistemas de reação com separação.

O LMS e o TMMS tem a vantagem de ser possível alterar seu rendimento e fator de purificação manipulando apenas o tempo de troca no sistema. Com isto pode-se atingir um certo grau de purificação com uma única passagem pelo sistema reduzindo as perdas de produto por deterioração devido ao menor tempo de processamento.

VI – SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Em trabalhos futuros pode-se estudar o desempenho destes sistemas de purificação utilizando uma modelagem que leve em conta a porosidade da partícula além da porosidade do meio reacional feito neste trabalho.

Pode-se estudar o desempenho destes sistemas de purificação utilizando parâmetros cinéticos de outras enzimas ou proteínas já que o desempenho destes sistemas dependem sensivelmente da cinética de adsorção utilizada.

Implementação experimental dos sistemas de purificação de configurações derivadas do sistema de TMMS propostos neste trabalho para verificar a capacidade de purificação real destes sistemas e comparar com o LMS. Como os resultados dos sistemas derivados do sistema CARE tiveram um desempenho muito baixo, a utilização destes sistemas de purificação em trabalhos futuros se torna menos interessante do que os outros sistemas estudados nesta tese.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, J. G. L. F. & Meirelles, A. J. A. Estudo da partição de insulina suína em sistemas aquosos bifásicos do tipo PEG/Sal. XII Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM) – Universidade Federal de Uberlândia, agosto de 1998.
- Anspach, F. B.; Curbelo, D.; Hartmann, R.; Garke, G.; Deckwer W.-D. Expanded-bed chromatography in primary protein purification. Journal of Chromatography A, 865 (1999) 129-144.
- Balcão, V. M.; Vieira M. C.; Malcata, F. X. Adsorption of protein from several commercial lipase preparations onto a hollow-fiber membrane module. Biotechnol. Prog. 1996, 12, 164-167.

Broughton, D. B. U. S. Patent 2,985,589 (1961)

- Broughton, D. B.; Neuzil, R. W.; Pharis, J. M.; Bearly, C. S.; Chem. Eng. Prog., 66(9), 70 (1970).
- Burns, M. A.; Graves, D. J. Continuous Affinity Chromatography Using a Magnetically Stabilized Fluidized Bed. Biotechnology Progress Vol. 1, No. 2, (95-103) June, 1985.
- Chang, Y. K., McGreath, G. E., Draeger, N. M.; Chase, H. A. Novel Technologies for Direct Extraction of Proteins. Trans IchemE, Vol. 71, part B, May 1993.

- Chase, H. A. Affinity Separations Utilising Immobilised Monoclonal Antibodies A New Tool for the Bichemical Engineer. Chem. Eng. Sci., Vol. 39, Nos. 7/8, pp. 1069-1125 (1984a)
- Chase, H. A. Prediction of the Performance of Preparative Affinity Chromatography. J. Chromatography. 297, 179-202 (1984b)
- Clonis, D. Large Scale Affinity. Bio/Technology Vol.5 December (1987), p. 1290-1293.
- Cowan, G. H.; Goisling, I. S.; Laws, J. F.; Sweetenham, W. P. Physical and Mathematical Modelling to Aid Scale-up of Liquid Chromatography. J. Chromatography. 363, 37-56 (1986)
- Dam, M. H. Van, Design of a fluid bed trickle flow reactor. (IN Dutch) MSc Thesis Delft University of Technology, (1991)
- Deutscher. P. M. Guide to protein purification Imprenta: San Diego : Academic, 1990.

Gattuso, M. J. CHIMICA OGGI/chemistry today – September (1995).

- Ghosh, R.; Sanyal, K.; Mukherjea, R. N.; Bhattacharya, P. Modelling and Simulation of the Washing Phase of an Affinity Ultrafiltration System. Separation Science and Technology, 31(1), pp. 125-131, 1996.
- Gordon, N. F.; Moore, C. M. V.; Cooney, C. L. An overview of continuous protein purification processes. Biotech. Adv. Vol. 8, pp. 741-762, 1990a.

- Gordon, N. F.; Tsujimura, H.; Cooney, C. L. Optimization and simulation of continuous affinity recycle extraction (CARE). Bioseparations, v.1, p. 9-21, 1990b.
- Gu, T.; Tsai, G.-J.; Tsao, G. T. Modeling of Nonlinear Multicomponent Chromatography. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, Vol 49, (1993).
- Hashimoto, K.; Adachi, S.; Noujima, H.; Maruyama, H. Models for the separation of glucose/frutose mixture using a simulated moving-bed adsorber. Journal of Chemical Engineering of Japan. Vo. 16, no. 5 (1983).
- Hashimoto, K.; Adachi, S.; Shirai, Y. Operation and design of simulated moving-bed adsrovers. C. 13. In Preparative Production Scale Chromatography. Gametros & Barker 1993.
- Hsieh, H. P. Inorganic Membrane Reactors. Catal. Rev.-Sci. Eng., 33(1&2), 1-70 (1991).
- Hughes, P.; Charm, S. E. Method for continuous purification of biological material using immunoadsorbent. Biotechnol. Bioeng., 21, 1439-1455 (1979).
- Hustedt, H.; Kroner, K. H.; Schutte, H.; Kula, M.-R. Continuous enzyme purification by crosscurrent extraction, in 3rd European Congress on Biotechnology, Verlag Chemie, 597-605 (1983).
- Janson, J.-C.; Rýden, L. Protein purification :principles, high-resolution methods, and applications. Imprenta: New York :J.Wiley, 1989.
- Johnson, J.A.; Kabza, R.G. SORBEX: Industrial-Scale Adsorptive Separation. I. CHEM. E. SYMPOSIUM SERIES NO. 118.

- Juza, M.; Mazzotti, M.; Morbidelli, M. Simulated moving-bed chromatography and its application to chirotechnology. Trends in Biotechnology. March 2000 (Vol.18) pp 108-118.
- Katchalski-Katzir, E. Kraemer, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 10 (2000) 157-176.
- Labrou, N. Clonis, Y. D. The affinity technology in downstream processing. Journal of Biotechnology 36 (1994) 95-119.

Larsson P.-O., Griffin T., Mosbach K., Coll. INSERM 86 91 (1979).

Lee, C. K; Yu, Q.; Kim, S. U.; Wang, N.-H.L. (1989) J. Chromatogr 484:25.

- Lucena, S. L. Modelagem e Simulação da Separação das Proteínas α-Lactalbumina e β-Lactoglobulina por Cromatografia Preparativa em Resinas Trocadoras de Ânions Utilizando Leito Móvel Simulado. Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Tese de Doutorado 1999.
- Luong, J. H. T.; Nguyen, A.-L.; Male, K. B. Affinity cross-flow filtration for purifying biomolecules. BIO/Technology, Vol. 5, June 1987a.
- Luong, J. H. T.; Nguyen, A. L.; Male, K. B. Recent developments in downstream processing based on affinity interactions. Trends in Biotechnology – (Vol. 5) 281-286 october 1987b.

- Luong, J. H. T.; Male, K. B.; Nguyen, A. L. A continuous affinity ultrafiltration process for trypsin purification. Biotechnology and bioengineering, Vol. 31, 516-520 (1988).
- Niven, G. W.; Scurlock, P. G.; A method for the continuous purification of proteins by affinity adsorption. Journal of Biotechnology, 31 (1993) 179-190.
- Owen, R. O.; McCreath, G. E.; Chase, H. A. A New Approach to Continuous Counter-Corrent Protein Chromatography: Direct Purification of Malate Dehydrogenase from a Saccharomyces cerevisiae Homogenate as a Model System. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 53, n° 4, February 20, (1997).
- Paiva, A. L.; Balcão, V. M.; Malcata, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. Enzyme and Microbial Technology 27 (2000) 187-204.
- Pimentel, M. C. B. Produção de Lipases por Fungos Filamentosos Estudos Cinéticos e Síntese de Esteres. Tese de Doutorado do Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas. Campinas 1996.
- Pungor, E. Jr.; Afeyan, N. B.; Gordon, N. F.; Cooney, C. L. Continuous Affinity-Recycle Extraction: A Novel Protein Separation Technique. Bio/Technology Vol. 5 June (1987).
- Ramadan, N. & Porath, J. Fe³⁺-hydroxamate as immobilized metal affinity adsorbent for protein chromatography. J. Chromatogr. 321, 93-104 (1985).

Ruthven, D. Principles of adsorption and adsorption processes. Wiley, New York (1984).

- Saracco, G.; Specchia, Vito. Catalytic Inorganic-Membrane Ractors: Present Experience and Future Opportunities. Catal. Rev.-Sci. Eng., 36(2), 305-384 (1994).
- Scopes, R. K. Protein purification :principles and practice. Imprenta: New York :Springer, 1987, 329p.
- Sii, D.; Sadana, A. Bioseparation using affinity techniques. Journal of Biotechnology, 19 (1991) 83-98.
- Taboada, O. W. M. Purificação de Lipase de Geotrichum sp. por Resina Cromatográfica de Interação Hidrofóbica - Modelagem, Simulação e Validação de Parâmetros.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.
 Campinas, Tese de Doutorado 1999.
- Wielen, L. A. M. van der. A Countercurrent Adsorptive Fluidized Bed Reactor for Heterogeneous Bioconversions. Tese de Doutorado. Department of Biochemical Engineering, Delft, University Technology. Netherlands, 1997.
- Wielen, L. A. M van der, Potters, J. J. M., Straathof, A. J. J. and Luyben, D. Ch. A. M. Integration of bioconversion and continous product separation by means of countercurrent adsorption, Chem. Engng. Sci. 1990, 45(8):2397-2404.