

Avaliação da influência de algumas variáveis de processo no número de pratos teóricos de resina de troca aniônica usada na adsorção em leito expandido (ale)

Franklin Mastroiano Silva Pereira¹, Alex Sandro Santos Costa¹, Gorete Ribeiro de Macedo², Everaldo Silvino dos Santos².

¹Bolsista CNPq/PIBIC, ²Professor Orientador, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Resumo

No presente trabalho utiliza-se a técnica de planejamento fatorial a fim de se avaliar a influência da altura do leito fixo (ALF), altura do pistão (AP), velocidade do fluido (VF) e pH do sistema tamponante (PH) no número de pratos teóricos (N) de uma resina de troca aniônica (Streamline® DEAE) usada para adsorção em leito expandido. Os resultados mostraram que a combinação entre os fatores ALF e VF, bem como sua combinação ALFxVF são os que mais influenciam na obtenção de um maior número de pratos.

Palavras-chave: Planejamento fatorial, adsorção em leito expandido, troca aniônica

Abstract

In this work a factorial design was used in order to investigate the influence of settled bed height, piston height, fluid velocity as well as buffer pH on the number of theoretical plates of an anionic adsorbent used to expanded bed adsorption. The results have showed that the number of theoretical plates is influenced by settled bed height and fluid velocity as well as the combination of these two factors.

Keywords: Factorial design, expanded bed adsorption, ion exchange

Introdução

Muitos dos produtos de uso clínico humano ou veterinário são proteínas ou polipeptídeos. Estes bioprodutos podem ser obtidos extrativamente, como por exemplo, a partir do plasma humano ou a partir de sua produção por microrganismos geneticamente modificados que são rotulados de proteínas recombinantes. Tanto no caso de extrativos como no caso dos produtos recombinantes existe a necessidade de purificação da proteína de interesse.

O uso de técnicas convencionais para purificação da biomolécula a partir da cromatografia envolve pelo menos uma etapa inicial prévia, que consiste na clarificação da amostra para as etapas posteriores da cromatografia. Na maioria das vezes, utiliza-se de filtração ou centrifugação para coleta do material particulado. A necessidade de se usar uma solução clarificada é para que não ocorra o bloqueio da coluna cromatográfica pelo material particulado, aumentando, assim, a queda de pressão na coluna e acarretando perda do escoamento do fluido, além do risco de danos para o sistema bomba-célula do ultravioleta (UV) do sistema cromatográfico convencional.

O desenvolvimento de técnicas que reduzem o número de etapas do “downstream processing” é de grande interesse para indústria de bioprocessos, uma vez que as etapas de recuperação e purificação podem comprometer em até 80% do custo total do processo de obtenção de um bioproduto.

A técnica de Adsorção de Leito Expandido (ALE) está sendo usada para recuperar e purificar biomoléculas, podendo ser a mesma aplicada em processos com alimentação contendo células (material particulado) estando ou não rompidas. Uma vez que o leito opera na forma expandida não existe o bloqueio da coluna pelo material particulado em suspensão que passará preferencialmente pelos espaços vazios do leito (Thömmes *et al.*, 1995, Pereira *et al.*, 1998, Levison *et al.*, 2000, Santos, 2001, Santos *et al.*, 2002).

No presente trabalho avalia-se por meio de um planejamento fatorial completo 2^4 com repetição em triplicata no ponto central, a influência dos parâmetros: altura do leito fixo (ALF), altura do pistão (AP), velocidade do fluido (VF) e pH do tampão de equilíbrio (pH) no número de pratos teóricos (N) de um adsorvente de troca aniônica (Streamline® DEAE) usada para a ALE.

Material e Métodos

Sistema Cromatográfico

O aparato experimental consiste em uma coluna medindo 2,6 cm de diâmetro e 30,0 cm de altura com base de teflon confeccionada em vidro de borosilicato, que foi utilizada nos experimentos com leito expandido. Na parte inferior da coluna existe um distribuidor tipo prato perfurado com uma fração de área livre de 0,8%. A coluna possui também um pistão, que permite a mudança de posicionamento durante o processo. Fazem parte também do arranjo experimental os acessórios comuns aos processos cromatográficos, como uma bomba peristáltica (Perimax) e um espectrofotômetro UV – visível modelo Genesys 10 UV (Thermo Spectronic) que opera na região de 190 a 1100 nm. O sistema tamponante utilizado foi o Tris-HCl (50,0 mM, pH 7,0). A resina de troca aniônica utilizada foi a Streamline® DEAE (Amersham Bioscience). Na superfície externa da coluna existe uma escala graduada (régua) que permite a leitura da altura do leito.

Determinação do Tempo de Residência (DTR)

Dentre as técnicas de estímulo e resposta destacam-se as técnicas conhecidas como pulso e frontal, sendo esta última a mais utilizada na indústria, e que também são aplicadas para avaliar o comportamento do leito expandido, ou seja, os desvios de um reator tubular ideal. A distribuição do tempo de residência (DTR) é obtida usando-se um traçador e caracteriza o tipo de escoamento existente dentro da coluna (Santos *et al.*, 2002).

No método de determinação da DTR, a solução contendo o traçador é bombeada para o leito até que a leitura no detector (espectrofotômetro) seja máxima (100%) – essa etapa refere-se ao sinal positivo. Uma vez chegando à concentração máxima do traçador, marca-se no papel um tempo de referência (tempo zero). Após essa etapa, substitui-se o trocador pela solução tamponante (Tris-HCl) e se espera que a resposta chegue à linha de base (etapa refere-se ao sinal negativo). Define-se então o tempo (t) como sendo a distância no papel, no tempo zero até a leitura (absorbância) de 50%. O desvio padrão (σ) é definido como a metade da distância entre os pontos de leitura 15,85% e 84,15% da absorbância máxima. O número de pratos teóricos (N) é determinado pela técnica do sinal negativo:

$$N = \frac{t^2}{\sigma^2} \quad (1)$$

Para a análise da Distribuição de tempo de Residência (DTR) o traçador utilizado foi acetona (P.A.- VETEC) com concentração de 0,5% (v/v).

Planejamento fatorial

Para se obter o número de pratos teóricos (variável resposta), foi utilizado um planejamento fatorial, no qual quatro variáveis (ALF, AP, VF, pH) foram analisadas em dois níveis cada (Barros Neto *et al.*, 2001). Dessa forma tem-se um planejamento fatorial completo 2^4 , cujo número de experimentos mínimos, que possibilita todas as combinações para os cálculos dos efeitos principais e de interação, é de 16 ensaios. Entretanto, ao se utilizar a técnica de planejamento fatorial e a análise por superfícies de resposta, é necessário realizar alguns experimentos além do número mínimo, para que se conheça o erro experimental associado às medidas. Assim foram realizados mais três experimentos, totalizando 19 ensaios, no ponto central. Nesse caso, o valor que a variável assume no ponto central (0) é a média entre o maior valor (+1) e menor valor (-1). A Tabela 1 ilustra a matriz do planejamento utilizado nesse trabalho, conforme Barros Neto *et al.*, 2001.

Para a realização dos ensaios inicialmente equilibrou-se a fase estacionária (resina/ adsorvente) da coluna, com o tampão de equilíbrio Tris-HCl (50,0 mM, pH 7,0), em fluxo ascendente e com o leito na forma expandida. Nessa etapa de equilíbrio, o volume do fluido aplicado ao leito é geralmente cinco vezes o volume do leito empacotado do adsorvente. Após a etapa de equilíbrio seguiu-se a aplicação do traçador. Essa etapa também foi realizada com fluxo ascendente e com o leito na forma expandida, ou seja, com maior porosidade do leito. Após a aplicação do traçador (acetona), realizou-se a lavagem do leito com o tampão, também em fluxo ascendente, para manter o equilíbrio.

Com os valores da variável resposta utilizou-se o software Statistica® 5.0, para avaliar quais os efeitos das variáveis independentes na resposta, ou seja, quais fatores ou quais interações de fatores influenciam sobre a resposta. O teste estatístico usado foi análise de variância (ANOVA) e o valor de $p \leq 0,05$.

Resultados e discussão

Análise dos efeitos dos fatores no número de pratos (N)

A Tabela 1 mostra os valores obtidos para a variável resposta (N). Observa-se que, dependendo das condições utilizadas, pode-se obter um valor para a variável resposta (N) relativamente alto, ou seja, aproximadamente dez pratos, bem como também podem ser obtidos números de pratos inferiores a unidade. Obviamente deve-se preferir operar o leito nas condições que favoreçam a existência de um maior número de pratos teóricos (N), uma vez que, o mesmo fornece uma medida direta da eficiência do sistema cromatográfico.

O gráfico de Pareto, conforme Figura 2, ilustra a influência dos efeitos fatores ALF, AP, VF e pH e suas combinações na variável resposta. Nesse gráfico pode-se avaliar os efeitos que são estatisticamente significativos, com 95% de confiança, e que são os que ultrapassam o limite da linha tracejada. Observa-se que os efeitos dos fatores principais ALF e VF, assim como a interação entre esses fatores (ALF x VF), são estatisticamente significativos, com 95% de confiança. Nesse caso o sinal positivo dos valores dos efeitos desses fatores indicam que, ao se mudar do nível inferior (-1) para o nível superior (+1), há um favorecimento para um aumento da variável resposta (N). É importante notar que o fator que mais influencia a resposta é o efeito combinado entre a altura do leito fixo (ALF) e a velocidade do fluido (VF). Os fatores principais AP e pH não influenciaram de forma significativa o número de pratos teóricos, entretanto, o sinal negativo nos efeitos desses fatores, indicam que ao se mudar do nível inferior (-1) para o nível superior (+1), há uma redução no valor da variável resposta.

Tabela 1 – Matriz do planejamento fatorial 2^4 com repetição em triplicata no ponto central com valor da resposta (N) obtido.

FATORES		NÍVEIS			
		(-1)	(0)	(+1)	
Altura do Leito Fixo [cm]		7,8	10,4	13	
(ALF)					
Altura do Pistão [cm] (AP)		0,5	1,0	1,5	
Velocidade do Fluido [cm/h]		60,0	80,0	100,0	
(VF)					
	pH	7,0	8,0	9,0	
Ensaio	ALF	AP	VF	pH	N
1	-1	-1	-1	-1	1,90
2	+1	-1	-1	-1	0,58
3	-1	+1	-1	-1	2,53
4	+1	+1	-1	-1	1,69
5	-1	-1	+1	-1	0,74
6	+1	-1	+1	-1	9,73
7	-1	+1	+1	-1	1,02
8	+1	+1	+1	-1	5,32
9	-1	-1	-1	+1	1,00
10	+1	-1	-1	+1	3,10
11	-1	+1	-1	+1	1,77
12	+1	+1	-1	+1	1,27
13	-1	-1	+1	+1	2,02
14	+1	-1	+1	+1	6,52
15	-1	+1	+1	+1	0,29
16	+1	+1	+1	+1	4,42
17	0	0	0	0	1,92
18	0	0	0	0	1,07
19	0	0	0	0	0,93

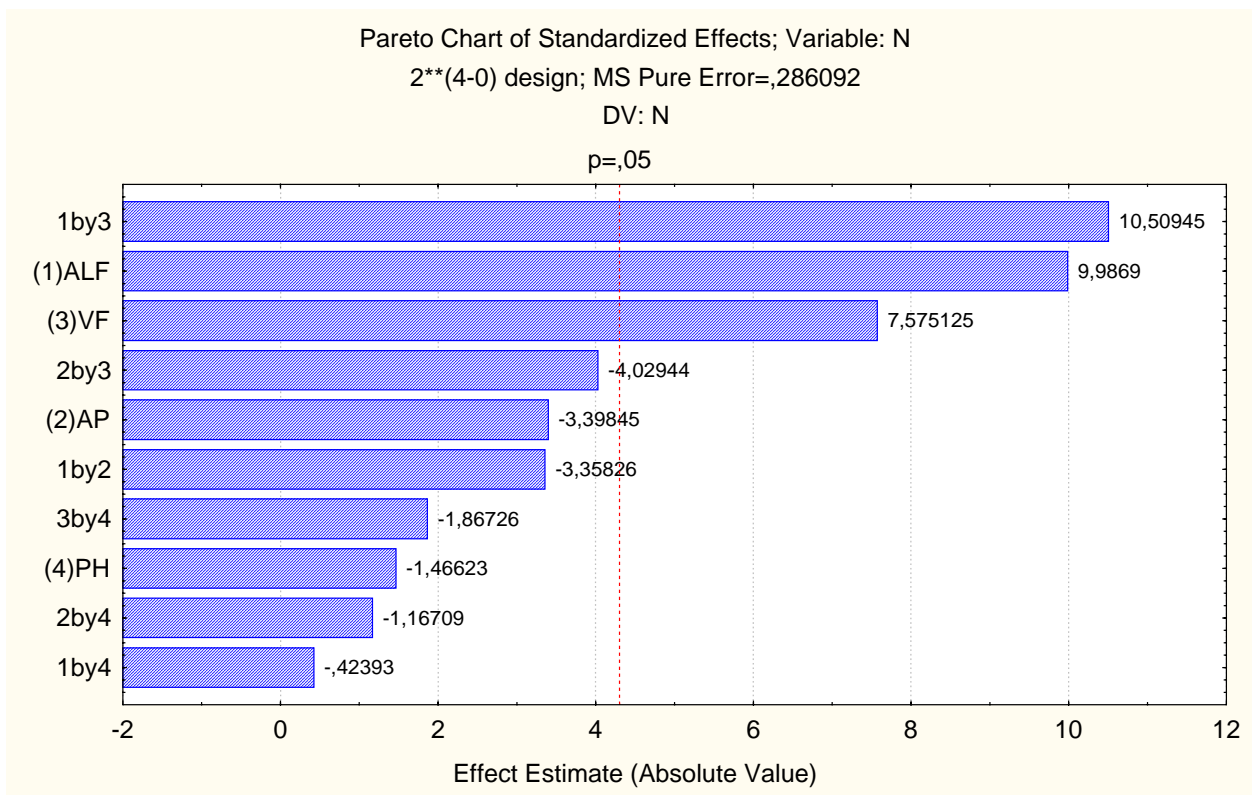


Figura 2 – Gráfico de Pareto.

Proposta de um modelo linear para estimativa de N

Após a análise do planejamento foi possível propor um modelo linear considerando apenas os efeitos significativos, conforme Equação (2).

$$N = 2,519 + 1,335ALF + 1,013VF + 1,405ALF * VF \quad (2)$$

A Análise de Variância (ANOVA) mostrou que o modelo linear proposto possui significância estatística, no nível de 95% de confiança, e também é preditivo. Entretanto, o mesmo apresentou um razoável coeficiente de determinação ($R^2 = 0,73$), ou seja, apenas 73% de toda a variação em torno da média pode ser explicada pelo modelo. Nesse caso, obtiveram-se valores

relativamente altos de resíduos. Observou-se que a maior parte dos dados obtidos para a variável resposta situa-se em valores relativamente baixos, entre um e três pratos teóricos, enquanto que para apenas a condição na qual $ALF = +1$, $AP = -1$, $VF = +1$, $pH = -1$, foi possível obter um número de pratos teóricos acima de nove. Dessa forma, embora o modelo linear tenha apresentado bons resultados, espera-se que um modelo quadrático possa se ajustar melhor ao sistema estudado, principalmente, por se observar que as superfícies de respostas obtidas não são perfeitamente planas, ou seja, nota-se a existência de curvatura.

Conclusão

Os resultados obtidos mostraram que os fatores principais, altura do leito fixo (ALF) e Velocidade do fluido (VF), bem como a combinação desses fatores, foram as variáveis mais significativas ao nível de 95% de confiança, que influenciaram no número de pratos teóricos.

O modelo linear mostrou-se ser significativo e preditivo, ou seja, apresentou significância estatística e pode ser útil para fazer previsões, muito embora o mesmo tenha fornecido um coeficiente de determinação (R^2) de apenas 73%.

Referências

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

LEVISON, P. R.; HOPKINS, A. K.; HATHI, P.; BADGER, S. E.; MANN, F.; DICKSON, N. e PURDOM, G. Suspended bed chromatography, a new approach in downstream processing. **Journal of Chromatography A**, v. 890, p. 45-51, 2000.

PEREIRA, J. M.; VIEIRA E ROSA, P. T.; PASTORE, G. M. e SANTANA, C. C., Expanded-Bed Adsorption Utilizing Ion-Exchange Resin to Purify Extracellular β - Galactosidase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 779-787, 1998.

SANTOS, E. S. Recuperação e Purificação de Enzimas usando Adsorção em Leito Expandido. 152f. **Tese** (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

SANTOS, E. S.; GUIRARDELLO, R. e FRANCO, T. T. Preparative Chromatography of Xylanase Using EBA. **Journal of Chromatography A**, v. 944, n. 1-2, p. 217-224, 2002.

THÖMMES, J.; WEIHER, M.; KARAU, A. e KULA, M-R. Hydrodynamics and Performance in Fluidized Bed Adsorption, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, p. 367-374, 1995.

Franklin Mastroiano Silva Pereira

Endereço Eletrônico: franklinmastroiano@eq.ufrn.br

Base de pesquisa: Engenharia de Bioprocessos

Endereço Postal: Campus Universitário – Lagoa Nova – Natal/RN-Brasil,

CEP: 59072-970