

## **Avaliação da capacidade dinâmica de soro albumina bovina para resina de troca iônica Streamline® DEAE**

Alex Sandro Santos Costa<sup>1</sup>, Franklin Mastroiano Silva Pereira<sup>1</sup>, Gorete Ribeiro de Macedo<sup>2</sup>, Everaldo Silvino Dos Santos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Alunos bolsista PIBIC DEQ/LEB/UFRN, <sup>2</sup> Professores PPGEQ/DEQ/UFRN

---

### **Resumo**

No presente trabalho utiliza-se a técnica de planejamento fatorial a fim de se avaliar a influência do pH ( $X_1$ ), força iônica ( $X_2$ ) e concentração de albumina de soro bovina ( $X_3$ ) na capacidade de adsorção da resina Streamline® DEAE. Os resultados mostraram que a concentração de albumina e a força iônica, bem como a combinação entre esses fatores, são os que mais influenciam a capacidade de adsorção, quando a concentração da proteína na saída da coluna corresponde a 10% da concentração na alimentação.

*Palavras-chave:* Soro Albumina Bovina, Adsorção em Leito Expandido, Troca Iônica

---

### **Abstract**

In this work a factorial design was used in order to investigate the influence of pH, ionic strength as well as albumin concentration on the binding capacity of the Streamline® DEAE adsorbent. The results showed that the binding capacity is influenced by albumin concentration and ionic strength as well as the combination of these two factors.

*Keywords:* Bovine Serum Albumin, Expanded Bed Adsorption, Ion Exchange

## Introdução

Dentre as proteínas existentes no soro destaca-se a albumina. A albumina de soro bovina é uma proteína solúvel em água e em soluções salinas diluídas, que corresponde a aproximadamente 12% de todas as proteínas existentes no soro. A albumina bovina possui ponto isoelétrico na faixa de 5,13 e massa molecular de 69000 Da (Gerberding e Byers, 1998). Vem sendo utilizada principalmente como marcador em gel de eletroforese, bem como, na indústria de alimentos (Zydney, 1998).

Por outro lado, 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. O desenvolvimento de técnicas que reduzem o número de etapas do “downstream processing” é de grande interesse para a indústria de bioprocessos, visto 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) rompidas ou não. 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 (Santos, 2001; Santos *et al.*, 2002).

No presente trabalho avalia-se – por meio de um planejamento fatorial completo  $2^3$  com repetição em triplicata no ponto central – a influência do pH e, força iônica e concentração da albumina bovina na capacidade de adsorção da resina Streamline® DEAE, dada pela avaliação da quantidade de proteína perdida no efluente, a partir da curva de ruptura (*Breakthrough*).

## Material e Métodos

### *Sistema Cromatográfico*

Uma coluna, confeccionada em vidro de borossilicato, foi utilizada nos experimentos com leito expandido. A coluna possui 2,6 cm de diâmetro e 30,0 cm de altura com base de teflon. 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. O sistema tamponante utilizado foi o Tris-HCl (50,0 mM). 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.

*Modo de Operação do Sistema até Ruptura ( $C/C_o=0,1$ )*

Para a realização dos ensaios, inicialmente equilibrou-se a fase estacionária (resina/adsorvente) com o tampão de equilíbrio (Tris-HCl, conforme a matriz do planejamento experimental (Tabela 1) em fluxo ascendente e com o leito em forma expandida a uma velocidade de 100,0 cm/h, nessa etapa de equilíbrio o volume aplicado ao leito foi de cinco vezes o volume do leito empacotado do adsorvente.

**Tabela 1** – Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  com repetição em triplicata no ponto central.

Fatores	Níveis			Resposta
	(-1)	(0)	(+1)	
pH ( $X_1$ )	7,0	7,5	8,0	Quantidade de Albumina não adsorvida ( $S_2$ ) (mg)
Força Iônica (mM) ( $X_2$ )	20,0	60,0	100,0	
Conc. Albumina (mg/ml) ( $X_3$ )	0,5	1,0	1,5	
Experimentos	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1(2)*	-1	-1	-1	46,46
2(9)*	+1	-1	-1	40,49
3(5)*	-1	+1	-1	36,59
4(3)*	+1	+1	-1	31,57
5(4)	-1	-1	+1	160,18
6(10)*	+1	-1	+1	155,73
7(7)*	-1	+1	+1	106,84
8(6)*	+1	+1	+1	106,63
9(1)*	0	0	0	76,89
10(8)*	0	0	0	75,22
11(11)*	0	0	0	85,51

(\*) O número entre parênteses depois do número dos experimentos indica a ordem de realização dos experimentos.

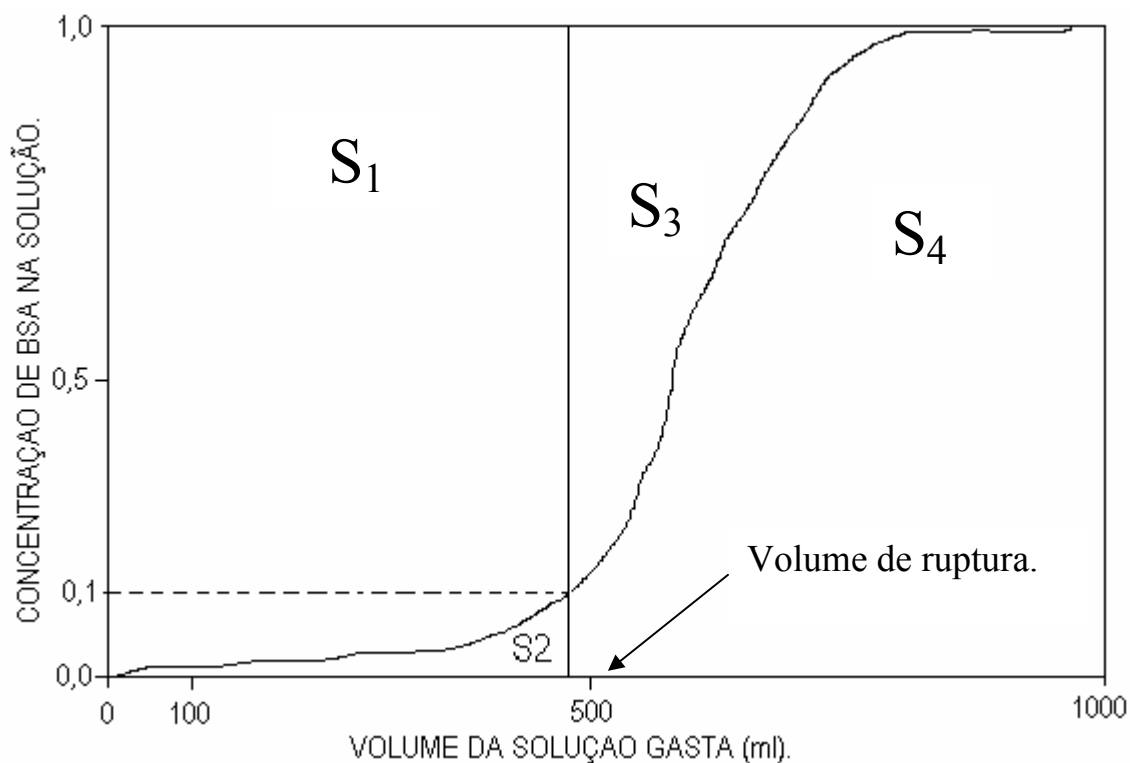
Após a etapa de equilíbrio, uma solução contendo a proteína modelo (Soro Albumina Bovina), é aplicada também em fluxo ascendente a uma velocidade de 100,0 cm/h, desta forma, a proteína de interesse é adsorvida na resina por troca iônica. A tela existente na parte inferior da coluna e no pistão móvel, localizado na parte superior da coluna, é aberta o suficiente para permitir apenas a entrada e saída do fluido, impedindo assim a perda de partículas de adsorvente. A concentração de entrada e saída da coluna é monitorada, nesse caso, a concentração da saída com relação à concentração na entrada ( $C/C_0$ ), que define o próprio volume de ruptura, foi estimada inicial em 10%. Após a aplicação da amostra efetua-se a etapa de lavagem (Tris/HCl) e eluição, com a solução de NaCl 1,0 M em tampão Tris/HCl, para remoção de proteínas que se adsorveram na resina, essa etapa também é efetuada em fluxo ascendente e com o leito na forma expandida usando-se uma velocidade de 60 cm/h. Em seguida a coluna é regenerada para um novo experimento.

#### *Planejamento fatorial*

Um planejamento fatorial completo  $2^3$  com repetição em triplicata no ponto central, foi utilizado para avaliar a influência do pH, da força iônica e da concentração de soro albumina bovina na quantidade de proteína não adsorvida (variável resposta) até a ruptura ( $C/C_0=0,1$ ). No presente planejamento foram realizados 11 ensaios, conforme Barros Neto *et al.*, 2001. A matriz do planejamento é apresentada na Tabela 1.

#### *Determinação da Eficiência de Recuperação do Soluto ( $\eta_{RS}$ ) e Eficiência de Utilização do Leito ( $\eta_{UL}$ )*

A Figura 1 ilustra uma típica curva de ruptura. Muitas das informações necessárias para avaliação do processo de adsorção são obtidas a partir dessa curva, tais como: a quantidade máxima de proteínas adsorvidas até o volume de ruptura ( $C/C_0=0,1$ ), a capacidade da coluna não utilizada para adsorção de proteínas, a quantidade de proteínas não adsorvidas na ruptura e na exaustão, ou seja, as massas que não foram adsorvidas pelo sistema. A relação dessas informações fornece uma medida direta da eficiência de recuperação do soluto ( $\eta_{RS}$ ), que no caso é o Soro Albumina Bovina, e a eficiência de utilização do leito ( $\eta_{UL}$ ), até a ruptura ( $C/C_0=0,1$ ), e permite o cálculo da capacidade dinâmica da resina, ou seja, quanto de adsorbato (proteína) pode ser adsorvido por volume de adsorvente mantendo-se certo fluxo de solução para a coluna.



**Figura 1** – Curva de ruptura (*Breakthrough*) (adaptado de Sridhar *et al.*, 1994)

Neste trabalho, a concentração de proteínas da saída em relação à concentração na entrada ( $C/C_0$ ), que define o próprio volume de ruptura, foi estimado em 10%, que corresponde ao valor médio usado na indústria de bioprocessos. De acordo com Sridhar *et al.* (1994) uma vez conhecida a curva de ruptura pode-se determinar a eficiência de recuperação do soluto ( $\eta_{RS}$ ) e a eficiência de utilização do leito ( $\eta_{UL}$ ) até a ruptura e que são dadas pelas Equações (1) e (2), respectivamente, conforme Figura 1:

$$\eta_{RS} = S_1 / (S_1 + S_2) \quad (1)$$

$$\eta_{UL} = S_1 / (S_1 + S_3) \quad (2)$$

Sendo:

$S_1$  - Área que representa a massa de proteína adsorvida até a ruptura ( $C/C_0=0,1$ );  $S_2$  - Área que representa a massa de proteína perdida até a ruptura ( $C/C_0=0,1$ );

$S_3$  - Área que representa a massa de proteína adsorvida entre a ruptura ( $C/C_0=0,1$ ) até a exaustão ( $C/C_0=1,0$ );

$S_4$  - Área que representa a massa de proteína perdida entre a ruptura ( $C/C_0=0,1$ ) e a exaustão ( $C/C_0=1,0$ );

## Resultados e discussão

### *Análise do planejamento fatorial*

A Tabela 1 mostra os valores obtidos para a quantidade de proteína não adsorvida, variável resposta e dada pela área ( $S_2$ ), conforme ilustrada na Figura 1. Observa-se que, dependendo das condições utilizadas, pode-se obter um valor para a variável resposta ( $S_2$ ) relativamente alto, ou seja, 160,18mg de BSA, bem como também podem ser obtidas quantidades menores de proteínas no efluente, como 31,57 mg de albumina, indicando que houve uma maior adsorção da proteína pela resina nas condições consideradas. Obviamente deve-se preferir operar o leito nas condições que favoreçam uma menor perda de proteínas, ou seja, para menores  $S_2$  uma vez que o mesmo fornece uma medida direta da eficiência do sistema adsorvente.

Com os valores da variável resposta utilizou-se o software *Statistica*® 5.0, para avaliar os efeitos das variáveis independentes na resposta, ou seja, quais fatores ou interações entre esses fatores que influencia, como 95% de confiança, a resposta ( $S_2$ ).

Os resultados mostraram que os efeitos mais importantes foram a concentração de albumina na solução ( $X_3$ ) e a força iônica ( $X_2$ ), bem como a interação entre eles ( $X_2.X_3$ ). Destacando-se a influência da concentração da solução no processo de adsorção. Nesse caso, o aumento da concentração aumentou a massa de albumina no efluente, indicando uma redução na capacidade de adsorção da resina. Esse resultado pode ser explicado por ser o processo de adsorção limitado pela quantidade de sítios de troca no adsorvente. Dessa forma, uma vez que os sítios estejam preenchidos, ou seja, quando se atinge a saturação, não ocorre mais a adsorção. Uma vez que a variável resposta de interesse é a massa perdida até a ruptura, deseja-se que esse valor de massa seja pequeno, ou seja, o processo de adsorção é favorecido dessa forma por soluções mais diluídas.

### *Proposta de um modelo linear*

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

$$S_2 = 83,83 - 15,154X_2 + 46,784X_3 - 10,456X_2X_3 \quad (2)$$

A Análise de Variância (ANOVA) mostrou que o modelo linear proposto possui significância estatística, no nível de 95% de confiança, e também é preditivo. O mesmo apresentou um alto coeficiente de determinação ( $R^2=0,99$ ), ou seja, 99% de toda a variação em torno da média pode ser explicada pelo modelo.

### **Conclusão**

Os resultados obtidos mostraram que os fatores principais, concentração de albumina ( $X_3$ ) e força iônica ( $X_2$ ), bem como a combinação desses fatores, foram as variáveis mais significativas ao nível de 95% de confiança, que influenciaram na capacidade de adsorção quando a concentração de albumina na saída da coluna correspondia a 10% da concentração alimentada.

O modelo linear mostrou-se significativo e preditivo, ou seja, apresentou significância estatística e pode ser útil para fazer previsões, obtendo-se um valor bastante elevado para o coeficiente de determinação ( $R^2=0,99$ ), indicando que o modelo consegue representar 99% de toda a variação em torno da média.

### **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.
- GERBERDING, S. J. e BYERS, C. N. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of Chromatography A**, v. 808, p. 141-151, 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.

SRIDHAR, P., SASTRI, N.V.S., MODAK, J.M. e MUKHHERJEE, A. K. Mathematical Simulation of Bioseparation in Affinity Packed Column. **Chemical Engineer Technol.**, v. 17, p. 422-429, 1994.

ZYDNEY, A. L. Protein Separations Using Membrane Filtration: New Opportunities for Whey Fractionation. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 243-250, 1998.

Alex Sandro Santos Costa

**Endereço Eletrônico:** alex\_costa@eq.ufrn.br

**Base de pesquisa:** Engenharia de Bioprocessos

**Endereço Postal:** Campus Universitário – Lagoa Nova – Natal/RN-Brasil,  
CEP: 59072-970