



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**PURIFICAÇÃO, MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA ADSORÇÃO DE
BIOPRODUTOS POR TROCA IÔNICA EM COLUNA DE LEITO EXPANDIDO**

Eng^a. CAROLINE COSTA MORAES

Prof^a Dr^a Susana Juliano Kalil
Orientadora

RIO GRANDE, RS

CAROLINE COSTA MORAES

**PURIFICAÇÃO, MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA ADSORÇÃO DE
BIOPRODUTOS POR TROCA IÔNICA EM COLUNA DE LEITO EXPANDIDO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, na área de Bioprocessos em Alimentos, pela Universidade Federal do Rio Grande.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil

RIO GRANDE, RS

2009

*“A gente pode morar numa casa mais ou menos
numa rua mais ou menos
numa cidade mais ou menos
e até ter um governo mais ou menos.
A gente pode dormir numa cama mais ou menos
comer um feijão mais ou menos.
ter um transporte mais ou menos
e até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro.
A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos...
TUDO BEM!
O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum...
é amar mais ou menos
sonhar mais ou menos
ser amigo mais ou menos
namorar mais ou menos
ter fé mais ou menos
e acreditar mais ou menos.
Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos.”*

Chico Xavier

Aos meus pais, Maritza e Paulo Neri
Ao meu irmão Vinícius

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar e dar força em todos os dias da minha vida.

À professora Susana Kalil, pela orientação, pela amizade, pelo imenso carinho e confiança que me dedica nesses anos de convívio.

Aos meu pais, Paulo Neri e Maritza, e meu irmão Vinícius, pelo apoio incondicional, pelos conselhos, pelas palavras de conforto, pelo amor e por entenderem as minhas ausências.

Ao professor Francisco Maugeri pela receptividade, pela oportunidade e pelos sábios conselhos que tanto me ajudaram para o desenvolvimento desta tese.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microbiologia (FURG), em especial Ailton e Joana, por tudo! Pelas risadas, pelo ombro amigo nos momentos difíceis, e principalmente pela amizade incondicional que me dedicaram.

A todos os meus colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (UNICAMP), especialmente a Ana Paula, pelo apoio e amizade, e ao Márcio, que além da amizade, contribuiu significativamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos bolsistas Luisa e Guido, em especial pela imensa amizade e carinho que me dedicaram e pela contribuição fundamental ao desenvolvimento da tese.

Às técnicas Ana Virgínia, Elisane e Fátima, pelo apoio e pela amizade neste tempo em que estive no laboratório.

Aos amigos antigos e aos que esta tese me proporcionou fazer, especialmente Itiara, Francine, Carol, Ludmila, Cristiane, Iara, Raquel, Susan, Anayla, Maria Cristiane, Juliana, Igor e Iara, por todo carinho, amizade e apoio durante o tempo em que estive em Campinas.

A todos os meus familiares e amigos, pelos incentivos e por entenderem minhas ausências.

Aos membros da banca Prof^a. Dr^a. Gláucia Aragão, Prof. Dr. Fabrício Butierres Santana, Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa, Prof. Dr. Carlos André Burkert e Prof^a. Dr^a. Janaína Burkert pelas contribuições com o trabalho.

A CAPES e ao CNPq, órgãos financiadores da bolsa de estudos.

A ELETROBRAS/CGTEE pela bolsa de estudos e apoio financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE QUADROS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
CAPÍTULO II	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 C-ficocianina	20
3.2 Inulinase	20
3.3 <i>Downstream</i>	21
3.4 Purificação de proteínas	22
3.4.1 Métodos cromatográficos	23
3.4.2 Cromatografia por troca iônica	25
3.4.2.1 Cromatografia de troca iônica em leite expandido	25
3.4.3 Purificação de C-ficocianina e Inulinase	34
3.5 Adsorção em matrizes sólidas	34
3.5.1 Isotermas de adsorção	35
3.6 Curva de ruptura	37
4. MODELAGEM MATEMÁTICA	39
5. CONSIDERAÇÕES E TENDÊNCIAS	41
CAPÍTULO III	42
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	42
Modelagem e simulação do processo de adsorção de inulinase por cromatografia de troca iônica em leite expandido	44
RESUMO	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Microrganismo e condições de cultivo	46
2.2 Adsorvente e coluna	46
2.3 Comparação das curvas de ruptura em diferentes graus de expansão	46
2.4 Modelo matemático	47
2.5 Planejamento experimental para otimização da eficiência	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1 Estimativa dos parâmetros e simulação do processo	49
3.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	53
4. CONCLUSÃO	56
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
Adsorção de C-ficocianina de <i>Spirulina platensis</i> em Resina de Troca Iônica	60
RESUMO	60
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1 Cultivo da <i>Spirulina platensis</i> , extração e quantificação da C-ficocianina	62
2.2 Adsorventes	62

2.3 Efeito do pH no coeficiente de partição	63
2.4 Efeito da temperatura no coeficiente de partição	63
2.5 Isoterma de adsorção	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
3.1 Efeito do pH no coeficiente de partição	64
3.2 Efeito da temperatura no coeficiente de partição	66
3.3 Isoterma de adsorção	67
4. CONCLUSÕES	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

Modelagem do processo de adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica em coluna de leito expandido	72
RESUMO	72
1. INTRODUÇÃO	73
2. MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1 Biomassa e C-ficocianina	74
2.2 Adsorvente e coluna	74
2.3 Medida do grau de expansão	75
2.4 Obtenção da curva de ruptura em coluna de leito expandido	75
3. MODELO MATEMÁTICO	76
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.1 Expansão do leito	77
4.2 Comparação das curvas de ruptura com célula e sem célula	79
4.2 Estimativa de parâmetros e simulação do modelo	79
5. CONCLUSÃO.....	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

Purificação de extrato de C-ficocianina na presença de células por cromatografia de troca iônica em leito expandido	87
RESUMO	87
1. INTRODUÇÃO	88
2. MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1 Biomassa.....	89
2.2 Extração de C-ficocianina	89
2.3 Adsorvente	89
2.4 Purificação de C-ficocianina	90
2.5 Eletroforese (SDS-PAGE).....	90
2.6 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	91
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	91
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

CAPÍTULO IV	99
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	100
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	102

CAPÍTULO V	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
APÊNDICE A	113

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modo de operação para adsorção	24
Figura 2: Formas de operação do leito	27
Figura 3: Etapas da ALE	32
Figura 4: Curva de ruptura para adsorção em coluna de leito fixo	38
ARTIGO 1	
Figura 1.1: Curvas de ruptura para adsorção de inulinase em leito expandido	51
Figura 1.2: Gráfico de paretos para DCCR	54
Figura 1.3: Curvas de contorno para o DCCR	55
ARTIGO 2	
Figura 2.1: Efeito do pH na adsorção de C-ficocianina resina de troca iônica Streamline DEAE e QXL	65
Figura 2.2: Efeito do pH no coeficiente de partição na adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline DEAE e Streamline Q XL	66
Figura 2.3: Ajuste do modelo de Langmuir para a isoterma de adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline Q XL	67
ARTIGO 3	
Figura 3.1: Altura de expansão do leito em função da velocidade superficial	78
Figura 3.2: Ln da velocidade versus Ln da porosidade para tampão 0,025M pH 7,5 e extrato de C-ficocianina não clarificado	78
Figura 3.3: Adsorção de C-ficocianina em leito expandido em resina Streamline QXL: curvas de clarificado e não clarificado. ruptura construídas com extrato	79
Figura 3.4: Curvas de ruptura para adsorção de C-ficocianina em leito expandido e curvas simuladas pelo modelo	81
ARTIGO 4	
Figura 4.1: Superfície de resposta e curvas de contorno para Rendimento, Recuperação e Concentração	93
Figura 4.2: Cromatograma do processo de purificação de C-ficocianina, com eluição feita em gradiente linear salino 0-1M em 150 mL, pH 6,5	94
Figure 4.3: Cromatograma da purificação de C-ficocianina em leito expandido com resina Streamline Q XL usando eluição tipo step, com 0,1M de NaCl, combinado com gradiente linear salino (0 -1 M) em 150 mL	95
Figura 4.4: SDS-PAGE para caracterização de diferentes soluções de proteínas	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Princípio de ação em cromatografia para proteínas24

Tabela 2 : Grupos funcionais usados em trocadores iônicos28

ARTIGO 1

Tabela 1.2: Parâmetros estimados pelo algoritmo PSO para os três graus de expansão50

Tabela 1.2: Eficiências experimentais e preditas para adsorção de inulinase em coluna de leite expandido51

Tabela 1.3: Sensibilidade paramétrica dos parâmetros do modelo para o GE 3,0.....52

Tabela 1.4: Matriz do DCCR (valores reais e codificados) e respostas para a eficiencia de coluna e de proceso para GE 2,0, 2,5 e 3,053

ARTIGO 3

Tabela 3.1: Parâmetros estimados pelo algoritmo PSO para os três graus de expansão80

Tabela 3.2: Capacidades de adsorção (q) e eficiências experimentais e preditas para adsorção de C-ficocianina em coluna de leite expandido82

Tabela 3.3: Capacidades de adsorção (q) e eficiências nas simulações feitas para GE 2,0 e diferentes alturas inicial de leite.....83

ARTIGO 4

Tabela 4.1: Valores reais e codificados para o DCCR e resultados para concentração, rendimento e recuperação de C-ficocianina91

Tabela 4.2: Análise de Variância para as variáveis Rendimento, Recuperação e Concentração.....92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais características da STREAMLINE Q XL.....29

Quadro 2: Principais características da STREAMLINE DEAE30

Quadro 3: Principais características da STREAMLINE SP31

NOMENCLATURA

A_{280} : absorvância a 280 nm;
 A_{620} : absorvância a 620 nm;
 A_{652} : absorvância a 652 nm;
C: concentração de proteína alvo (mg/mL ou U/mL);
C*: concentração da proteína no equilíbrio na fase líquida (mg/mL ou U/mL);
 C_0 : concentração inicial da proteína alvo (mg/mL ou U/mL);
 D_L : coeficiente de dispersão axial para a fase líquida (m^2/s);
f: coeficiente de partição;
H: altura do leito expandido (m);
 H_0 : altura inicial do leito expandido (m);
 k_1 : constante de adsorção (mL/U.s ou mL/mg.s);
 k_2 : constante de dessorção (1/s);
 K_d : constante de equilíbrio;
 k_f : coeficiente de transferência de massa para o filme líquido (m/s);
 m_{ads} : massa de adsorvente (g);
n: índice de expansão;
q: capacidade de adsorção (U/mL de adsorvente ou mg/mL de adsorvente);
 q^* : quantidade de soluto adsorvido por massa de adsorvente (mg/g de adsorvente);
 q_m : capacidade máxima de adsorção (U/mL de adsorvente ou mg/mL de adsorvente);
 R_p : raio externo da partícula (m);
t: tempo (min);
U: velocidade superficial do líquido (cm/h);
 U_T : velocidade terminal da partícula (cm/h);
 V_f : volume de solução injetado na coluna (mL);
 V_m : volume morto do sistema (mL);
 v_z : velocidade superficial do líquido (m/s);
y: vetor experimental das curvas de ruptura;
 y^{calc} : vetor calculado das curvas de ruptura;
z: posição axial na coluna (m).

Termos gregos:

ϵ : porosidade do leito expandido;

ϵ_0 : porosidade do leito fixo;

$\Phi_{10\%}$: eficiência de processo (%);

$\Phi_{90\%}$: eficiência de coluna (%);

RESUMO

A produção de proteínas através de microrganismos tornou-se uma técnica muito importante na obtenção de compostos de interesse da indústria farmacêutica e alimentícia. Extratos brutos nos quais as proteínas são obtidas são geralmente complexos, contendo sólidos e células em suspensão. Usualmente, para uso industrial destes compostos, é necessário obtê-los puros, para garantir a sua atuação sem interferência. Um método que vem recebendo destaque especialmente nos últimos 10 anos é o uso da cromatografia de troca iônica em leito expandido, que combina em uma única etapa os passos de clarificação, concentração e purificação da molécula alvo, reduzindo assim o tempo de operação e também os custos com equipamentos para realização de cada etapa em separado. Combinado a este fato, a última década também é marcada por trabalhos que tratam da modelagem matemática do processo de adsorção de proteínas em resinas. Esta técnica, além de fornecer informações importantes sobre o processo de adsorção, também é de grande valia na otimização da etapa de adsorção, uma vez que permite que simulações sejam feitas, sem a necessidade de gasto de tempo e material com experimentos em bancada, especialmente se é desejado uma ampliação de escala. Dessa forma, o objetivo desta tese foi realizar a modelagem e simulação do processo de adsorção de bioprodutos em um caldo bruto na presença de células, usando inulinase e C-ficocianina como objeto de estudo e purificar C-ficocianina utilizando resina de troca iônica em leito expandido. A presente tese foi então dividida em quatro artigos. O primeiro artigo teve como objeto de estudo a enzima inulinase, e a otimização da etapa de adsorção desta enzima em resina de troca iônica Streamline SP, em leito expandido, foi feita através da modelagem matemática e simulação das curvas de ruptura em três diferentes graus de expansão (GE). As máximas eficiências foram observadas quando utilizadas maiores concentrações de inulinase (120 a 170 U/mL), e altura de leito entre 20 e 30 cm. O grau de expansão de 3,0 vezes foi considerado o melhor, uma vez que a produtividade foi consideravelmente superior. O segundo artigo apresenta o estudo das condições de adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica, onde foi verificado o efeito do pH e temperatura na adsorção e após construída a isoterma de adsorção. A isoterma de adsorção da C-ficocianina em resina Streamline Q XL feita em pH 7,5 e a 25°C (ambiente), apresentou um bom ajuste ao modelo de Langmuir ($R=0,98$) e os valores q_m (capacidade máxima de adsorção) e K_d (constante de equilíbrio) estimados pela equação linearizada da isoterma, foram de 26,7 mg/mL e 0,067mg/mL. O terceiro artigo aborda a modelagem do processo de adsorção de extrato não clarificado de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline Q XL em coluna de leito expandido. Três curvas de ruptura foram feitas em diferentes graus de expansão (2,0, 2,5 e 3,0). A condição de adsorção de extrato bruto não clarificado de C-ficocianina que se mostrou mais vantajosa, por apresentar maior capacidade de adsorção, é quando se alimenta o extrato até atingir 10% de saturação da resina, em grau de expansão 2,0, com uma altura inicial de leito de 30 cm. O último artigo originado nesta tese foi sobre a purificação de C-ficocianina através da cromatografia de troca iônica em leito expandido. Uma vez que a adsorção já havia sido estudada no artigo 2, o artigo 4 enfoca na otimização das condições de eluição, visando obter um produto com máxima pureza e recuperação. A pureza é dada pela razão entre a absorvância a 620 nm pela absorvância a 280 nm, e diz-se que quando C-ficocianina apresenta pureza superior a 0,7 ela pode ser usada em como corante em alimentos. A avaliação das curvas de contorno indicou que a faixa de trabalho deve ser em pH ao redor de 6,5 e volumes de eluição próximos a 150 mL. Tais condições combinadas a uma etapa de pré-eluição com 0,1M de NaCl, permitiu obter C-ficocianina com pureza de 2,9, concentração 3 mg/mL, e recuperação ao redor de 70%.

Palavras-chave: modelagem, simulação, leito expandido, cromatográfica de troca iônica, purificação

ABSTRACT

The production of proteins using microorganisms has become a very important technique to obtain compounds of interest to the pharmaceutical and food industries. Crude extracts in which proteins are obtained are often complex, containing solids and cells in suspension. Usually, for the industrial use of these compounds it is necessary to obtain them clean, to guarantee their actuation without interference. The use of ion exchange chromatography in expanded bed is a method that has received attention especially in the last 10 years, this method is able to combine in a single step, the clarification, concentration and purification of the target molecule, thus reducing operating time and also equipment costs to perform each step separately. Combined with this fact, the last decade has also been marked by works that deal with the mathematical modeling of the process of adsorption of proteins on resins. This technique in addition to providing important information on the adsorption process, is also of great value in optimizing the adsorption step, since it allows simulations to be made, without spending time and material experiments in a bench, especially if a scale up is desired. In this context, the main objective of this thesis was to perform the modeling and simulation of adsorption of bioproducts in a crude extract in the presence of cells, using inulinase and C-phycoerythrin as object of study and purify C-phycoerythrin using ion-exchange resin in expanded bed. The first article has as object of study the inulinase enzyme, and the optimization of the adsorption step of this enzyme into ion-exchange resin Streamline SP, in expanded bed made by mathematical modeling and simulation of the breakthrough curves. The highest efficiencies were observed when higher inulinase concentrations (120 to 170 U/mL) were used, and height of bed between 20 and 30 cm. The expansion degree (ED) of 3.0 was considered the best, since the yield was considerably the highest. The second article presents a study of the adsorption conditions of C-phycoerythrin into ion-exchange resin, where the effect of pH and temperature on the adsorption were verified. The adsorption isotherm of C-phycoerythrin on Streamline Q XL resin made at pH 7.5 and 25°C, showed a good fit to the Langmuir model ($R=0.98$) and values q_m (maximum adsorption capacity) and K_d (equilibrium constant) estimated by the linear isotherm equation, were 26.7 mg/mL and 0.067 mg/mL, respectively. The third article discusses the modeling of the adsorption process of unclarified extract of C-phycoerythrin into ion-exchange resin Streamline Q XL column in expanded bed. Three breakthrough curves was carried out in different expansion degrees (2.0, 2.5 and 3.0). The adsorption condition of non clarified crude extract of C-phycoerythrin which showed more advantageous, presenting an adsorption capacity highest, is when we load the extract to reach 10% of the resin saturation in expansion degree of 2.0, with an initial height of bed of 30 cm. The last article is focused on the purification of C-phycoerythrin by ion exchange chromatography in expanded bed. Since the adsorption had already been studied in Article 2, Article 4 focuses on the optimization of elution conditions in order to obtain a product with maximum purity and recovery. The evaluation of the contour plots indicated that the working range should be at pH around 6.5 and elution volumes close to 150 mL. These conditions combined with a pre-elution with 0.1 M NaCl step, allowed to obtain C-phycoerythrin with a purity of 2.9, concentration 3 mg/mL, and recovery around 70%.

Key words: modeling, simulation, expanded bed. Ion exchange chromatography, purification

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

A recuperação e purificação de bioprodutos têm recebido a atenção da indústria de alimentos por muitos anos almejando à diversificação dos produtos oferecidos aos consumidores. Nas últimas décadas, muitos países em desenvolvimento buscam a melhor utilização das fontes de matérias-primas locais, visando produtos de alto valor agregado ou adicionar valor aos produtos, e para tal vêm utilizando as tecnologias de recuperação e purificação (Chen, 2006). No Brasil, muitos estudos têm sido realizados visando otimizar a obtenção de produtos biotecnológicos, porém poucos grupos de pesquisa, especialmente no Rio Grande do Sul, abordam as etapas após a produção, ou seja o processo de *downstream*. Atualmente, a maioria dos estudos nesta área está centrado na purificação em escala de bancada, de modo a purificar o bioproduto com fins de caracterizá-lo, porém não com o intuito de estabelecer técnicas de purificação que possam ser levadas a uma ampliação de escala. Neste sentido, a purificação visa estabelecer as condições para um processo que maximize eficiência e rendimento, minimizando custos. Sabe-se que estes custos podem representar de 50 a 80% do custo total de produção. Portanto, estudos devem ser realizados nos processos de recuperação e purificação de modo a obter um produto comercialmente viável.

A recuperação de bioprodutos em um processo fermentativo envolve primeiramente a separação dos sólidos como células, fragmentos celulares ou sólidos em suspensão. Tradicionalmente, esses métodos incluem centrifugação, filtração por membranas e sistema aquoso bifásico (Ghose e Chase, 2000a). Cada um desses métodos possui suas vantagens, mas em todos eles a separação sólido-líquido é a primeira consideração e só depois disso será considerada a purificação do composto de interesse.

A cromatografia de troca iônica é a tecnologia mais largamente utilizada no preparo de proteínas seja em escala de laboratório ou de produção. A recuperação da atividade biológica é usualmente excelente. As razões para o sucesso da troca iônica são a sua ampla aplicabilidade, seu alto poder de resolução, sua alta capacidade e a simplicidade e controlabilidade deste método. A troca iônica pode ser utilizada em um leito fixo (geralmente para pequena escala) e em leito expandido. A adsorção em leito expandido envolve etapas de clarificação, concentração e purificação em uma única operação. Industrialmente, a eliminação de etapas no processo de purificação pode vir a viabilizá-lo não só tecnicamente, mas economicamente (Pessoa e Kilikian, 2005).

Em processos de purificação como cromatografia de troca iônica, que envolvem a separação por adsorção, é necessário que se conheça o comportamento cinético dos processos de adsorção.

A adsorção no leito expandido ocorre quando um soluto dissolvido é ligado a um adsorvente sólido. Este fenômeno (proveniente do contato entre o adsorbato e o adsorvente) envolve um número de passos distintos. Alguns pesquisadores (Horstmann e Chase, 1989, Bruce e Chase, 2002, Fenneteau et al., 2002 e Chen et al., 2003) sugerem um modelo para adsorção em leito expandido que considera transferência de massa da solução de adsorbato para a superfície externa da partícula de adsorvente (resistência à difusão na película líquida), difusão dentro dos poros da partícula (difusão nos poros ou resistência à difusão na partícula), a porosidade do leito, dispersão axial do líquido e a reação química na superfície da partícula (resistência à reação na superfície). Esses modelos, em geral, servem para descrever a adsorção de sistemas modelos, com proteína previamente purificada dissolvida em tampão, acrescida ou não de células. No entanto, devido ao crescente interesse por produtos biotecnológicos, é interessante que se estude a adsorção em sistemas reais de purificação, contendo caldo ou extrato bruto proveniente da fermentação ou extração direta do bioproduto, que possam realmente ser levados à ampliação de escala. Para tal, a principal ferramenta é a modelagem e simulação desses processos, uma vez que é fundamental para aumento de escala o conhecimento do modelo matemático do processo.

Nos últimos anos, a modelagem e simulação de processos de adsorção de proteínas em resinas, utilizando colunas de leito fixo ou expandido, vêm sendo empregada por alguns autores (Chen et al., 2003, Li et al., 2005 e Yun et al., 2005). Entretanto, boa parte deles desenvolve estes estudos utilizando sistemas-modelo de proteínas, que consistem em observar a adsorção de uma proteína comercial pura sobre a resina. Industrialmente, a simulação de um processo só é vantajosa se ela representar a condição real do processo, que dificilmente empregará a adsorção de uma proteína purificada num leito de resina. Atualmente, ainda há carência de estudos que considerem um sistema real – que em geral consiste em adsorver algum composto de interesse de um caldo proveniente de fermentação, ou alguma proteína extraída do interior de células microbianas, vegetais ou animais, juntamente com outros compostos interferentes – uma vez que o comportamento da adsorção pode ser mais complexo, já que existem outras proteínas competindo pelos mesmos sítios de ligação da resina.

Considerando as carências relacionadas ao estudo da modelagem e simulação da adsorção de um sistema real de proteínas em resinas trocadores de íons e a experiência do grupo em *downstream*, a presente tese foi então dividida em 4 artigos. A equipe de trabalho envolvida na elaboração da tese apresenta um histórico na produção e purificação de bioprodutos de interesse na indústria de alimentos, entre eles C-ficocianina, um biocorante natural azul, e inulinase, enzima utilizada para obtenção de frutooligossacarídeos. Nesse contexto, o processo de purificação de inulinase e conhecimento de alguns parâmetros

cinéticos anteriormente obtidos em trabalhos feitos pelo grupo foram utilizados para obter o modelo matemático que descreveu a adsorção desta enzima em resina de troca iônica, em uma coluna de leito expandido, dando origem ao primeiro artigo desta tese. Neste artigo, a modelagem matemática é utilizada juntamente com a técnica de planejamento experimental como ferramenta para otimização da adsorção de inulinase em resina de força iônica em leito expandido. Para a otimização, a eficiência da coluna e do processo foram avaliadas, quando alterada a altura do leito de resinas e a concentração de enzima, em diferentes graus de expansão.

Em um segundo momento, a modelagem da adsorção da C-ficocianina, também em resina de troca iônica em coluna de leito expandido foi feita, mas para tal, foi necessário primeiramente que se conhecessem alguns parâmetros da adsorção, tais como pH, temperatura e comportamento cinético, que deu origem ao artigo 2. Neste, estudou-se o efeito do pH sobre a adsorção de C-ficocianina em duas resinas trocadoras de íons e a seguir, o efeito da temperatura sobre a adsorção de C-ficocianina na resina escolhida dentre as duas testadas, observado o comportamento cinético. Foi também obtida a isoterma de adsorção, que apresentou bom ajuste ao modelo de Langmuir, permitindo a obtenção dos parâmetros q_m e K_d .

Conhecendo-se então os principais parâmetros da adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica, o artigo 3 contempla a modelagem e simulação da adsorção do extrato não clarificado de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline Q XL, utilizando o modelo matemático para sistemas reais proposto no artigo 1, e foram avaliados o valor da capacidade de adsorção e eficiência em 10% e 80% da curva de ruptura, nos graus de expansão 2,0, 2,5 e 3,0.

Como etapa final, a purificação de C-ficocianina em coluna de leito expandido foi estudada, gerando o artigo 4. Este aborda o estudo da eluição, como forma de otimizar a purificação de C-ficocianina, onde foi avaliados o efeito do pH e do volume de eluição sobre a concentração, pureza, rendimento e recuperação do biocomposto purificado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo desta tese foi realizar a modelagem e simulação do processo de adsorção de bioprodutos em um caldo bruto na presença de células, usando inulinase e C-ficocianina como objeto de estudo e purificar C-ficocianina utilizando resina de troca iônica em leito expandido.

2.2 Objetivos específicos

- Modelar e simular o processo de adsorção de caldo bruto de inulinase contendo células em resina de troca iônica em coluna de leito expandido;
- Estudar o efeito do pH e da temperatura na adsorção de C-ficocianina clarificada, em resina de troca iônica e construir a isoterma de adsorção nas melhores condições de adsorção;
- Modelar e simular o processo de adsorção de caldo bruto de C-ficocianina contendo células em resina de troca iônica em coluna de leito expandido;
- Otimizar a etapa de eluição do processo de purificação de C-ficocianina em coluna de leito expandido, utilizando extrato bruto não clarificado, visando maximizar a pureza.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 C-ficocianina

Principal componente da família das ficobiliproteínas (Patil e Raghavarao, 2007), C-ficocianina é um pigmento acessório fotossintético azul que pode ser utilizado como corante em alimentos e em cosméticos, mas também apresenta muitas propriedades que tornam seu uso adequado na indústria médica e farmacêutica (Soni et al., 2006). C-ficocianina (C-FC) é encontrada geralmente no interior das células de cianobactérias como as do gênero *Spirulina* (*Arthrospira*). Sua concentração nas células pode variar dependendo das condições ambientais (Chojnacka e Noworyta, 2004).

O crescimento da consciência da importância de corantes naturais, especialmente em alimentos e cosméticos, tem ocupado uma grande demanda de fontes naturais e biológicas deste biopruduto (Dofossé et al., 2005). Em vista disso, ficocianina foi introduzida no Japão como corante natural para alimentos e cosméticos sendo produzido em uma taxa de 600 kg/mês (Dofussé, 2006).

A pureza da C-FC é geralmente avaliada usando a razão de absorbância em 620nm, onde é a absorção máxima da C-ficocianina, pela absorbância a 280nm, que corresponde as proteínas totais (Liu et al., 2005). C-ficocianina de pureza 0,7 é considerada como grau alimentar e superior a 4,0 como grau analítico (Patil et al., 2007).

Quando purificada, C-ficocianina apresenta ação antioxidante frente aos radicais hidroxílicos (Estrada et al., 2001) e radicais peróxidos (Romay et al., 2001). Tem sido também avaliada sua capacidade como agente antitumoral e antiinflamatório (Reddy et al., 2003). Também pode ser utilizada como traçador bioquímico em imunoenaios, microscopia e citometria em função de suas propriedades fluorescentes (Vonshak, 1997). Estudos têm mostrado que a C-ficocianina age como um estimulante do sistema imunológico, aumentando a contagem de leucócitos, cuja função principal é manter a saúde dos órgãos do corpo, proteger contra o câncer e úlceras (Eriksen, 2008).

A concentração de C-ficocianina é medida de acordo com os valores de absorbância referentes a absorção de C-ficocianina e de aloficocianina (outra ficobiliproteína de cor azul), através de uma relação estudada por Bennet e Bogorad (1973), como segue:

$$C - FC = \frac{(A_{620} - 0,474 A_{652})}{5,34}$$

3.2 Inulinase

Inulinases são enzimas potencialmente úteis na produção de xaropes com alto teor de frutose, utilizando a inulina como matéria-prima. As inulinases são β -frutosidases, que

atuam reduzindo a sacarose pela quebra da ligação β -2-1, onde se produzem unidades de frutose e glicose. Essas enzimas são designadas como 2,1- β -D-frutana-frutanolidase, diferenciando das invertases, que hidrolisam a sacarose em glicose e frutose, sendo classificadas como β -D-fruto-frutoseidase (Silva, 2000). Além disso, também têm sido utilizadas na produção de oligossacarídeos (Mendes, 2006).

Diversos microrganismos podem ser utilizados para produzir inulinase, e a seleção destes dependerá de suas características fisiológicas. Além disso, para o uso de algum microrganismo deve-se considerar o fato desses pertencerem ao grupo GRAS (Generally Recognized as Safe) e serem aceitos pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos para produtos alimentícios. Neste contexto encontra-se o gênero *Kluyveromyces*, o que o torna muito interessante comercialmente (Mendes, 2006).

A vantagem de utilizar microrganismos do gênero *Kluyveromyces* sp. consiste na alta produtividade da enzima inulinase, tanto em meio sintético (Kalil, 2000) quanto em meio industrial (Treichel, 2001).

3.3 Downstream

Nos últimos anos vê-se uma crescente pressão econômica na produção de produtos biotecnológicos. Desta forma, bioprocessos em geral, especialmente os processos de separação e recuperação, também denominados de *downstream processing*, enfrentam uma forte demanda na intensificação e integração dos passos processuais para aumentar o rendimento, reduzir o tempo de processo e cortar os custos e gastos excessivos de capital.

A recuperação e purificação de um reagente biológico de fermentação submersa ou de cultura de células sobrenadante é uma parte crítica do processo de manufatura. Recuperação representa uma grande parte dos custos de produção (Wheelwright, 1987).

Processos de *downstream* geralmente referem-se a métodos para isolamento, recuperação, concentração e purificação de produtos. A fonte do produto pode ser uma planta ou tecido animal, fluidos corporais, etc. Esses processos contribuem substancialmente para os custos de produção, portanto, operações de recuperação e purificação são continuamente escrutinadas. Há muitas possibilidades de operações de recuperação e um grande número de possíveis combinações entre elas (Goldberg, 1998). Dessa forma, as etapas de purificação são tão ou mais desafiadoras que o estudo e o desenvolvimento da etapa de cultivo, pois não há processos de purificação de aplicação geral (Pessoa e Killikian, 2005).

Embora haja uma grande diversidade de produtos e separações na biotecnologia, algumas similaridades entre os processos são utilizadas. Quatro etapas são similares a quase todos os processos de purificação, os quais ocorrem nessa seqüência (Belter et al., 1988):

1. Remoção de insolúveis - onde geralmente são empregadas técnicas como filtração ou centrifugação;
2. Isolamento do produto – remove os matérias que são bastante diferentes do produto que se deseja, como adsorção e extração com solventes;
3. Purificação – deve-se utilizar técnicas altamente seletivas, que separem os produtos com base em suas características físicas ou químicas, como métodos cromatográficos ou precipitação;
4. Polimento – é o final da seqüência para dar um bom acabamento ao produto, como liofilização ou secagem.

No caso de produtos intracelulares, é necessário uma etapa de rompimento celular, geralmente realizada nas células obtidas após a clarificação. Produtos intracelulares geralmente tornam o processo de purificação mais difícil em comparação a produtos extracelulares (Medeiros et al., 2008). Este rompimento pode ser realizado por uma diversidade de métodos, que podem ou não ser escalonáveis.

A técnica aplicada depende da resistência da célula, ou seja, se há presença de parede celular ou não, e da atividade biológica do produto que se deseja extrair, uma vez que esta não deve ser perdida durante o procedimento de extração. Entre as principais técnicas de rompimento das células estão os métodos mecânicos (prensa francesa, moinho de bolas), físicos (congelamento e descongelamento, choque osmótico, secagem), químicos (álcalis, ácidos, solventes e detergentes) e os enzimáticos (lise enzimática ou inibição da síntese da parede celular), e ainda é possível uma combinação entre eles (Minkova et al., 2003, Moraes et al., 2010).

Uma vez que a molécula alvo tenha sido extraída, a meta é o *design* do processo de purificação que requer o máximo rendimento com o mínimo de custo. Em outras palavras, o processo ótimo de *downstream* é a estratégia de purificação que satisfaz a qualidade requerida (Wheelwright, 1987). A redução do custo e de perdas da molécula-alvo no processo de purificação é de fundamental importância na viabilidade do processo. O aumento do número de etapas do processo de purificação, assim como o rendimento global de cada etapa influencia o rendimento e, conseqüentemente, o custo do produto final (Wheelwright, 1989).

3.4 Purificação de proteínas

No início da purificação, a proteína alvo pode ser o menor componente entre milhões de outras proteínas e outros contaminantes. Algumas regras devem ser observadas para que a purificação seja bem sucedida:

1. Processos simples- minimizar o número de etapas e evitar dificuldade de manipulações que poderão não ser bem reproduzidas;

2. Evitar processos dispendiosos;
3. Otimizar cada etapa envolvida no processo;
4. Maximizar a velocidade de cada etapa, evitando equipamentos lentos;
5. Usar técnicas e materiais viáveis;
6. Escrever os métodos antes de começar;
7. Manter anotações sobre os rendimentos de cada etapa;
8. Ter sempre em mente o objetivo final- seja ele alto rendimento, alta pureza, reprodutibilidade, etc.
9. É também de grande importância o conhecimento da estrutura, função e propriedades da proteína alvo para montar uma estratégia de purificação (Roe, 2006).

A purificação de qualquer produto biotecnológico tradicionalmente envolve as etapas de precipitação, centrifugação, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico, ou a combinação destes (Ling et al., 2004), seguidos de uma ou mais etapas cromatográficas, como principalmente cromatográfica de troca iônica, de afinidade, de interação hidrofóbica ou de adsorção. A finalização geralmente é feita com etapa de filtração em gel, secagem, cristalização ou liofilização do produto de interesse (Pessoa e Killikian, 2005).

3.4.1 Métodos cromatográficos

Proteínas adsorvem-se a uma grande variedade de fases sólidas, usualmente de forma seletiva. Consequentemente, técnicas de adsorção, especialmente quando realizadas em colunas cromatográficas, têm se tornado amplamente utilizadas. Elas frequentemente resultam em passos de purificação que conduzem a um grande aumento na pureza da proteína, e, no caso de purificação de enzimas, levam a um grande aumento na atividade específica. Embora cromatografia em coluna seja a forma ideal de obter-se uma resolução ótima, o método de adsorção em reator de mistura também deve ser salientado, uma vez que ele pode ser feito de uma forma rápida, o que é importante quando o critério de velocidade é prioridade (Scopes, 1993).

A cromatografia foi introduzida por um pesquisador russo, Michael Tswett, em 1906, quando ele separou a clorofila de uma mistura de pigmentos de planta. Cromatografia é uma poderosa e muito usada técnica de separação dos componentes de uma amostra. Os componentes da amostra são distribuídos entre duas fases, uma das quais permanece estacionária, enquanto a outra elui entre os interstícios ou sobre a superfície da fase estacionária (FE). O movimento da fase móvel (FM) resulta na migração diferencial dos componentes da amostra (Cecchi, 1999). Entre os métodos de análise, a cromatografia

ocupa um lugar de destaque devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas.

A cromatografia líquida é o mais importante método de purificação de substâncias biológicas quando são requeridas altas resoluções. Sua versatilidade e flexibilidade são insuperáveis. A característica molecular mais comumente explorada em separações são o tamanho, as propriedades iônicas e hidrofóbicas bem como certas interações bioespecíficas (Freitag e Horváth, 1995). Os métodos mais usados na adsorção são mostrados na Figura 1.

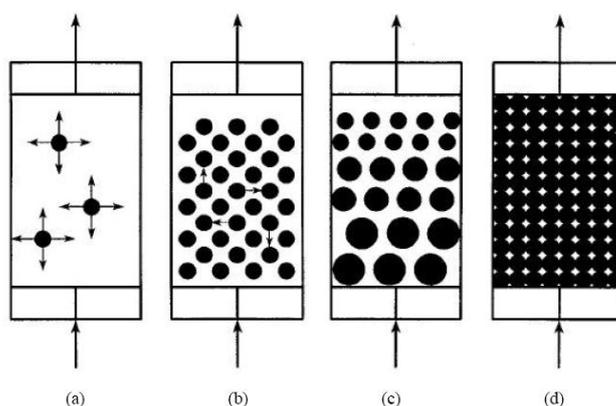


Figura 1: Modo de operação para adsorção (a) tanque agitado (b) leito fluidizado (c) leito expandido (d) leito fixo empacotado.

Jungbauer (2005) reporta que atualmente há sete princípios cromatográficos empregados em biomoléculas. Os princípios de ação são a cromatografia de adsorção, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão molecular, também chamada permeação em gel, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de fase normal e cromatografia de fase reversa, conforme apresenta a Tabela 1.

Tabela 1: Princípio de ação em cromatografia para proteínas

Nome	Princípio de ação	Separação por
Cromatografia de adsorção	Ligação na superfície	Estrutura molecular
Cromatografia de troca iônica	Ligação iônica	Carga na superfície
Cromatografia de permeação em gel	Exclusão por tamanho	Tamanho e forma da molécula
Cromatografia de afinidade	Adsorção/dessorção bioespecífica	Estrutura da molécula
Cromatografia de interação hidrofóbica	Formação de complexo hidrofóbico	Hidrofobicidade e caminhos hidrofóbicos
Cromatografia de fase normal	Formação de complexo hidrofóbico	Hidrofobicidade
Cromatografia de fase reversa	Formação de complexo hidrofóbico	Hidrofobicidade

Fonte: Jungbauer, 2005.

Dentre essas, recebe destaque a cromatografia de troca iônica, devido à sua ampla aplicabilidade, seu alto poder de resolução, sua alta capacidade e a simplicidade e controlabilidade deste método (Amersham Pharmacia Biotech, a).

3.4.2 Cromatografia por troca iônica

Cromatografia de troca iônica é a técnica mais amplamente utilizada para separação de proteína com base na lei de Coulomb. Isto se deve em parte ao fato de muitas proteínas fisiologicamente importantes possuírem uma grande quantidade de cargas de resíduos de aminoácidos em sua superfície. Além disso, a variação na carga superficial das proteínas com a mudança do pH proporciona um meio simples de regulação das propriedades adsorptivas do soluto. A dessorção das proteínas é principalmente aumentada pela força iônica do eluente (Roe, 2006).

A separação depende da adsorção reversível das moléculas do soluto carregadas para imobilizar os grupos trocadores de carga. A maioria dos experimentos de troca iônica é feito em 5 etapas principais: a primeira fase é o equilíbrio no qual o trocador iônico é conduzido a um estado inicial, em termos de pH e força iônica, o qual permite a ligação das moléculas desejadas de soluto. O segundo estágio é a aplicação da amostra e adsorção, no qual as moléculas de soluto conduzem a carga apropriada a substituir os íons contidos e conduzem reversivelmente para o gel. No terceiro estágio, substâncias são removidas da coluna por troca através de condições de eluição desfavoráveis para condução iônica das moléculas do soluto. Isto normalmente envolve um aumento na força iônica do tampão de eluição ou troca de pH. O quarto e quinto estágios são a remoção, da coluna, de substâncias não eluídas sob condições experimentais prévias e o re-equilíbrio para as condições iniciais para uma próxima purificação (Amersham Pharmacia Biotech, a).

A matriz de um trocador é constituída de um material poroso, natural ou sintético, inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos, apresentando ligações covalentes a grupos trocadores iônicos. As matrizes, quanto ao material que as formam são classificadas em inorgânicas e orgânicas, sendo naturais ou sintéticas (Collins et al., 1990). Existem dois tipos de trocadores iônicos. Um deles é o trocador catiônico, onde o adsorvente é negativamente carregado. Este é usado para separar proteínas positivamente carregadas, predominantemente a pH abaixo do seu ponto isoelétrico. O outro modo é o trocador aniônico, onde o adsorvente é positivamente carregado. Se a carga do trocador iônico varia com o pH durante a operação, o trocador é dito fraco (Roe, 2006).

3.4.2.1 Cromatografia de troca iônica em leite expandido

Industrialmente, a eliminação de etapas no processo de purificação pode vir a viabilizá-lo não só tecnicamente, mas economicamente. Um processo que vem recebendo

atenção é a adsorção de proteínas na presença de biomassa através do uso de leito fluidizado, particularmente o uso de leito expandido (Kaczmarek e Bellot, 2005).

A adsorção em leito expandido envolve etapas de clarificação, concentração e purificação em uma única operação. Essa tecnologia permite redução de custos e de energia em relação aos processos tradicionalmente empregados em uma separação sólido-líquido e uma etapa primária de purificação (Ghose and Chase, 2000a).

A comercialização de tecnologia de adsorção em leito expandido inicialmente começou com colunas de 5 cm de diâmetro. Dado o potencial para aplicações industriais, as colunas foram escalonadas para diâmetros de 20 e 60 cm, e até 1,2 m. Colunas com diâmetro superior a 5 cm são consideradas colunas de grande escala, para uso industrial (Ghose e Chase, 2000a, Ghose e Chase, 2000b).

O uso de adsorventes com densidade controlada permite obter um leito estável, com cada partícula mantendo uma posição discreta no leito com um pequeno movimento circular. Deste modo, este processo, comparado ao leito fluidizado, apresenta uma maior capacidade de adsorção, com o leito expandido se comportando como um reator tubular durante a aplicação da alimentação (Snow, 1994). A vazão através de um leito sem restrição de partículas de adsorvente é controlado para expandir o leito, e, conseqüentemente, o processo pode tolerar material particulado no fluxo de alimentação, eliminando a necessidade de separação de clarificação e concentração (Bruce e Chase., 2002).

O equipamento utilizado na adsorção em leito expandido consiste basicamente de uma coluna com um distribuidor e um pistão, que permite a mudança de posicionamento durante o processo e acessórios comuns aos processos cromatográficos como bombas, registradores, etc.

Comparado com a cromatografia clássica em leito empacotado, o processo em leito expandido usa um adsorvente apropriado para expandir na coluna com a fase móvel fluindo no sentido ascendente, formando assim o leito expandido. O aumento na porosidade do leito permite que pequenas partículas na fase móvel passem através do leito expandido sem necessitar sua prévia remoção (Xia et al., 2007). A adsorção em leito expandido conceitualmente apresenta uma série de vantagens sobre operações em leito empacotado pela operação em larga escala, particularmente por isolar e purificar bioprodutos de grandes volumes de extratos brutos contendo material particulado (Pai et al., 1999).

Chase e Draeger (1992) documentaram que a porosidade do leito expandido é maior que em leitos fixos empacotados. Algumas vezes leito expandido é considerado como parte integral da tecnologia de leito fluidizado, sendo que alguns autores nem diferencia as duas expressões. No entanto, no leito expandido não há turbulência ao passo que no fluidizado há (Amersham Pharmacia Biotech, b). As diferenças entre as formas de operação no leito estão apresentadas na Figura 2.

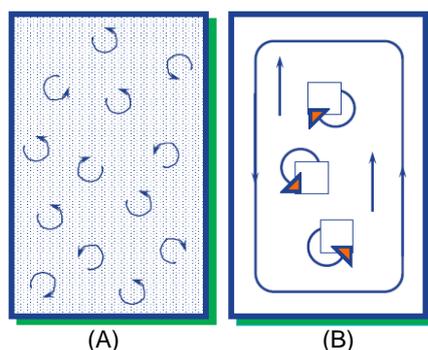


Figura 2: Formas de operação do leito (A) expandido (B) fluidizado.

Fonte: Amersham Pharmacia Biotech, b

Quando um líquido é bombeado a baixa velocidade até o topo de um leito sedimentado tendo um distribuidor, contendo espaço livre entre o leito adsorvente e o adaptador superior, o líquido fluirá pelos espaços intersticiais do leito sedimentado sem que o adsorvente se mova. Com o aumento da velocidade, a pressão através do líquido aumenta. A um determinado momento a pressão torna-se igual à força da gravidade e então as partículas começam a se mover. Primeiramente o leito expande ligeiramente. Como a porosidade irá aumentar, a pressão também irá aumentando gradativamente, até que em determinado momento as partículas deixaram de ter uma movimento discreto e entrarão na zona de fluidização, onde terão movimentos alternados por todo espaço na coluna (Nayak, 2001).

A ALE (adsorção em leito expandido) é uma evolução em relação ao leito fluidizado, sobretudo por explorar o fenômeno da segregação do leito fluidizado. A segregação consiste basicamente na tendência das partículas menos densas permanecerem na parte superior da coluna, enquanto as mais densas permanecem na região inferior, próximas do distribuidor. Assim, embora as partículas adsorventes apresentem-se em suspensão, o agrupamento destas, em camadas bem definidas, torna a fluidização estável e controlada, reduzindo a mistura de partículas no sentido axial, verificada no leito fluidizado. O resultado é a combinação das propriedades do leito fluidizado com as propriedades do leito empacotado (Pessoa e Kilikian, 2005).

A literatura apresenta aplicações bem sucedidas do leito expandido para a purificação de moléculas heterólogas obtidas em *E. coli*, leveduras e células de animais, quais sejam anexina, anticorpos monoclonais, lisozima, albumina humana heteróloga entre outros. A grande maioria envolve purificação de proteínas (Kalil et al., 2005, Charoenrat et al, 2006, Bermejo et al., 2006). No entanto esta é uma técnica versátil e também pode ser utilizada na purificação de filamentos de bacteriófagos (Ling et al., 2004) ou de plasmídeos (Ferreira et al., 2000).

- **Matrizes adsorventes e ligantes**

Jungbauer (2005) comenta que a natureza da fase estacionária determina também a natureza da fase móvel, e que a otimização destas é desejada para que se obtenha uma melhor performance de purificação.

Ao contrario do leito empacotado, para o leito expandido é necessário uma alta densidade e distribuição de partículas adequada para o adsorvente. Para um melhor conhecimento, o adsorvente de ALE tende a ter alta densidade, ser pequeno e com grandes poros e com distribuição de partícula de acordo com o requerimento de purificação. Uma alta densidade da partícula proporcionaria uma operação com velocidades maiores (300 cm/h em média), reduzindo assim o tempo de operação. Além disso, partículas pequenas e com poros grandes reduzem a resistência ao transporte, aumentando a capacidade de adsorção dinâmica para altas velocidades; uma boa distribuição de tamanho é a peça chave para um leito estável e uma adsorção eficiente (Xia et al., 2007).

Os adsorventes de troca iônica estão sendo usados nos processos de purificação de proteínas, seja em escala laboratorial ou na produção em planta industrial. A principal característica que um adsorvente pode apresentar para que possa ser usado em leito expandido é que o mesmo deve apresentar uma maior massa específica que o meio de fluidização e uma distribuição de tamanho que favoreça a segregação do leito. Para o aumento da massa específica pode-se utilizar quartzo como os produzidos pela GE Healthcare, ou qualquer outro tipo de material denso, como por exemplo, aço inoxidável como os adsorventes fabricados pela companhia Up Front (Santos, 2001).

Dentre as matrizes empregadas na cromatografia, as mais comuns para purificação de proteínas são as de celulose, agarose, dextrana e poliacrilamida. Os ligantes clássicos (SP- sulfapropil, DEAE, dietil aminoetil e IDA-ácido iminodiacético) são acoplados ao suporte das partículas adsorventes (agarose-quartzo ou agarose-metal) elevando sua densidade e viabilizando a expansão do leito. Estes adsorventes são identificados comercialmente como Streamline® e são comercializados pela GE Healthcare (Pessoa e Kilikian, 2005). A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de grupos funcionais usados na troca iônica.

Tabela 2: Grupos funcionais usados em trocadores iônicos

Trocador aniônico	Grupo funcional
Dietilaminoetil (DEAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+(CH_2CH_3)_2$
Aminoetil quaternário (QAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+(CH_2CH_3)_2-CH_2-CHOC-CH_3$
Amônio quaternário (Q)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N^+(CH_3)_3$
Trocador catiônico	Grupo funcional
Carboximetil (CM)	$-O-CH_2-COO^-$
Sulfopropil (SP)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2SO_3^-$
Metil sulfonato (S)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2SO_3^-$

Fonte: adaptado de Amersham Pharmacia Biotech, b

Alguns desses grupos mantêm-se com o mesmo tipo de carga quando há variação de pH. Esses são ditos trocadores fortes, são estáveis numa ampla faixa de pH (2-12) e são representados pelos grupos Q, S e SP. Já outros trocadores mudam a carga conforme o pH muda, e são ditos trocadores fracos. Este tipo de trocador é ideal quando se deseja uma separação seletiva, e os representantes são os grupos CM e o DEAE.

As características das resinas Streamline Q XL, Streamline DEAE e Streamline SP são apresentadas nos quadros 1, 2 e 3, respectivamente.

Quadro 1: Principais características da STREAMLINE Q XL

Tipo de trocador iônico	Fortemente aniônico
Capacidade iônica	0,23-0,33 mmol Cl ⁻ / mL de adsorvente
Forma da partícula	Esférica, 100 a 300 µm
Tamanho médio da partícula	200 µm
Densidade média da partícula	1,2 g/mL
Grau de expansão a 400 cm/h	2-3
Estabilidade química	- estabilidade em todos os tampões aquosos usados comumente - 1M NaOH - 6M Guaidina HCl Evitar: - longa exposição a pH<4 - agentes oxidantes
Estabilidade física	Geração negligenciável de finos durante a operação no modo expandido. Evitar operações cisalhantes de drenagem e escoamento.
pH de trabalho	2-12
pH de limpeza	2-14
Vazão	300-500 cm/h
Capacidade ligante	>100 mg albumina de soro bovino/mL de adsorvente
Estabilidade térmica	4 a 40°C
Estocagem	20% de etanol

Fonte: adaptado de Amersham Pharmacia Biotech, b

Quadro 2: Principais características da STREAMLINE DEAE

Tipo de trocador iônico	Fracamente aniônico
Grupo funcional	-O-CH ₂ CH ₂ -N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ H
Capacidade iônica	0,13-0,21 mmol Cl ⁻ / mL de adsorvente
Porosidade	4.10 ⁶ daltons
Forma da partícula	Esférica, 100 a 300 µm
Tamanho médio da partícula	200 µm
Densidade média da partícula	1,2 g/mL
Grau de expansão a 400 cm/h	2-3
Estabilidade química	- estabilidade em todos os tampões aquosos usados comumente -1M NaOH - 70% de etanol - solventes orgânicos Evitar: - agentes oxidantes
Estabilidade física	Geração negligenciável de finos durante a operação no modo expandido. Evitar operações cisalhantes de drenagem, escoamento.
pH de trabalho	2-13
pH de limpeza	2-14
Vazão	300-500 cm/h
Capacidade ligante	Pelo menos 40mg albumina de soro bovino/mL de adsorvente
Estocagem	20% de etanol

Fonte: adaptado de Amersham Pharmacia Biotech, b

Quadro 3: Principais características da STREAMLINE SP.

Tipo de trocador iônico	Fortemente aniônico
Capacidade iônica	0,17-0,24 mmol H ⁺ / mL de adsorvente
Forma da partícula	Esférica, 100 a 300 µm
Tamanho médio da partícula	200 µm
Densidade média da partícula	1,2 g/mL
Grau de expansão a 300 cm/h	2-3
Estabilidade química	- estabilidade em todos os tampões aquosos usados comumente - 1M NaOH - 70% etanol - solventes orgânicos Evitar: - longa exposição a pH<4 - agentes oxidantes
Estabilidade física	Geração negligenciável de finos durante a operação no modo expandido. Evitar operações cisalhantes de drenagem e escoamento.
pH de trabalho	3-13
pH de limpeza	3-14
Capacidade ligante	60 mg de lisozima/mL de adsorvente
Estocagem	0,2M de acetato em 20% de etanol

Fonte: adaptado de Amersham Pharmacia Biotech, b

• Operação

A Figura 3 apresenta um esquema da seqüência de operações do processo de cromatografia em leito expandido, que inclui o equilíbrio das cargas da resina, alimentação da amostra, a lavagem das proteínas não adsorvidas, a eluição do composto, a limpeza da resina e a regeneração.

Durante o equilíbrio um tampão de baixa molaridade é alimentado, em fluxo ascendente, promovendo a expansão do leito em 2 ou 3 vezes, dependendo da velocidade. A alimentação é usualmente feita com caldo bruto contendo células ou restos de células e partículas em suspensão. Nesta etapa deve-se controlar a velocidade para manter o mesmo grau de expansão do leito estabelecido. A etapa de lavagem é necessária para remoção de partículas e proteínas fracamente adsorvidas. Depois da lavagem, se a eluição for feita em fluxo descendente, pára-se a alimentação e o adaptador é então movido até o contato com a

resina, só então recomeça a alimentação, desta vez com tampão contendo sal, em fluxo descendente. Em geral, é necessário um pequeno volume para eluir o bioproduto e o uso de gradientes salinos pode ser mais efetivo para separação. Alguns componentes podem permanecer ligados à resina e portando uma limpeza é feita na própria coluna, seguindo orientação do fabricante para cada tipo de resina e então é feita uma regeneração para que a resina esteja pronta para ser novamente utilizada (Nayak, 2001, Amersham Pharmacia Biotech, a).

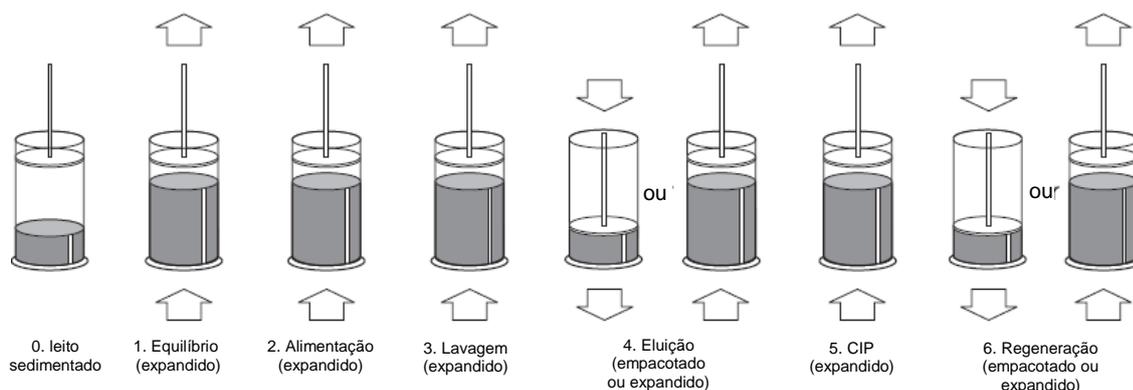


Figura 3: Etapas da ALE: 0) leito sedimentado; 1) estabelecimento do equilíbrio; 2) aplicação da amostra; 3) lavagem do leito; 4) eluição; 5) limpeza do leito; 6) regeneração.

Fonte: adaptado de Amersham Pharmacia Biotech, a.

Dentre as particularidades da operação em leito expandido, está a possibilidade da eluição em modo expandido. A vantagem é não ter que mover o adaptador para a posição de leito fixo, o que reduz o risco de problemas em função da resistência do material ali presente. No entanto, Hjorth (1999) comenta que esta eluição pode promover um aumento de 40 a 80% no volume do pico de eluição, o que pode ser indesejável já que acarreta na diluição do composto de interesse. Além do volume, Anspach et al. (1999) comenta que o tempo gasto para eluição em modo expandido também é aumentado.

- **Caracterização do leito expandido**

O conhecimento do comportamento do leito em função das propriedades físicas das partículas e do fluido é de fundamental importância para as operações usando ALE. Essa caracterização baseia-se em especial na medida da expansão do leito em função da velocidade linear do fluido e, ainda, em função dos fatores de distribuição de tamanho de partículas, viscosidade do fluido e presença de célula. A viscosidade do caldo proveniente da fermentação é maior que a da água e varia fortemente com a composição e concentração de biomassa. Estes dados não podem ser preditos e devem ser medidos (Nayak, 2001).

Quando se tem uma partícula adsorvente em uma coluna cromatográfica, para haver uma fluidização estável, as forças de interação partícula-fluido devem balancear o peso da partícula. Essa condição é encontrada se a velocidade do líquido excede um valor mínimo, chamado velocidade mínima de fluidização. Nesse caso, o estado estacionário é atingido quando a velocidade do líquido não aumenta acima da velocidade terminal da partícula fluidizada, ponto onde as forças excedem o peso da partícula e esta é levada da coluna. A faixa de vazão que pode ser usada é dependente das propriedades da partícula fluidizada e do líquido fluidizante (Kalil, 2000). Como a adsorção em leito expandido baseia-se na fluidização, correlaciona-se a expansão do leito devido à vazão usando uma equação proposta por Richardson e Zaki (1954), que relaciona a velocidade superficial do fluido e a velocidade terminal da partícula com a porosidade do leito, conforme a Equação 1, que é válida para fluidos com perfil Newtoniano:

$$\frac{U}{U_t} = \varepsilon^n \quad (1)$$

Onde n é o índice de expansão ou índice de Richardson-Zaki e ε é a porosidade do leito.

A velocidade terminal da partícula e o coeficiente de Richardson-Zaki podem ser determinados experimentalmente, uma vez que se conheça a porosidade em cada velocidade de fluido. Neste caso, parte-se de um leito sedimentado e com porosidade igual a 0,4 (Chang e Chase, 1996). Linearizando-se a Equação 1, obtém-se uma relação entre a velocidade superficial do fluido e a porosidade do leito, apresentada na Equação 2:

$$\ln U = \ln U_t + n \ln \varepsilon \quad (2)$$

A porosidade é estimada pela Equação 3:

$$\varepsilon = 1 - \left[(1 - \varepsilon_0) \cdot \frac{H_0}{H} \right] \quad (3)$$

Outra importante caracterização do leito expandido é a determinação do grau de expansão (GE), número adimensional que consiste na medida relativa da altura do leito expandido, para uma determinada vazão, com a altura do leito sedimentado do adsorvente (Anspach, 1999), conforme a Equação 4:

$$GE = \frac{H}{H_0} \quad (4)$$

Em geral, os sistemas de purificação operam com graus de expansão de 2 a 3, uma vez que assim a porosidade do leito permite a passagem de células e fragmentos (Pessoa e Kilikian, 2005).

3.4.3 Purificação de C-ficocianina e Inulinase

A literatura apresenta algumas técnicas para purificação de C-ficocianina. Alguns métodos foram propostos para purificação desta proteína, e eles geralmente envolvem precipitação, métodos cromatográficos e, mais recentemente, o uso de sistema aquoso bifásico (SAB) (Minkova et al, 2007, Soni et al., 2006, Rito-Palomares, 2004, Reis et al., 1998). Moraes e Kalil (2009) estabeleceram o *design* do processo de obtenção de ficocianina com grau reativo de pureza, que envolveu as etapas de extração, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em leito fixo.

Antelo (2007) usou a técnica de SAB para obter C-ficocianina com grau alimentar de pureza, proveniente de caldo contendo células. Patil e Raghavarao (2007) também obtiveram C-ficocianina com grau alimentar e com grau analítico empregando esta técnica.

Há atualmente poucos estudos que relatam a purificação de C-ficocianina usando cromatografia de leito expandido. Bermejo et al. (2006) e Niu et al. (2007) purificaram C-ficocianina através de cromatografia em leito expandido, utilizando cromatografia de troca iônica e cromatografia de interação hidrofóbica, respectivamente. Embora os autores tenham utilizado leito expandido, em ambos os trabalhos, a alimentação da coluna foi feita com caldo clarificado.

Com relação à inulinase, na literatura existem alguns trabalhos relatando a purificação desta enzima utilizando diferentes métodos. Kalil et al. (2006) purificaram inulinase de *Kluyveromyces marxianus* utilizando cromatografia de troca iônica em leito expandido, a partir de caldo não clarificado de enzima.

Sharma e Gill (2007) utilizaram uma seqüência de técnicas que envolveu precipitação com sulfato de amônio, coluna contendo DEAE-Sephacel, seguido de coluna contendo ConA-CL Agarose. Em outro estudo, Chen et al. (1997) purificaram inulinase através de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e cromatográfica de permeação em gel.

3.5 Adsorção em matrizes sólidas

A adsorção ocorre quando um soluto dissolvido é ligado a um adsorvente sólido. Tanto a adsorção quanto a extração são processos usados para isolar solutos de soluções diluídas. A adsorção tende a ter uma menor capacidade, mas apresenta uma maior seletividade de extração. Esse fenômeno, proveniente do contato entre o adsorbato e o adsorvente, envolve um número de passos distintos. Esses passos contribuem para a resistência à transferência de massa e incluem: transferência de massa da solução de adsorbato para a superfície externa da partícula (difusão nos poros ou resistência a difusão na partícula), difusão dentro dos poros da partícula e reação química na superfície da partícula (Araújo, 1996).

Os estudos dos fundamentos da adsorção dividem-se em duas categorias: o estudo do equilíbrio, que revela o rendimento ou a capacidade máxima de adsorção de moléculas ou biomoléculas sobre a superfície de um sólido, e o estudo da cinética ou da dinâmica do processo de adsorção que informa o tempo que se leva a adsorver uma determinada quantidade de moléculas em matrizes sólidas. Através destes estudos básicos de adsorção e das coletas de dados experimentais, com o objetivo de determinar parâmetros inerentes ao processo, podem ser desenvolvidos e testados modelos matemáticos que descrevem a adsorção de moléculas de proteínas (Oliveira, 2003)

Um processo típico de adsorção envolve quatro etapas. Primeiramente a solução é adicionada ao adsorvente. Segundo, a adsorção ocorre um processo que pode ser seletivo e lento. A terceira etapa é a lavagem da solução remanescente e por último, o soluto adsorvido é eluído, frequentemente usando diferentes solventes (Belter et al., 1988).

Como na extração, a análise da adsorção é baseada no equilíbrio e no balanço de massa. O equilíbrio é apresentado não como coeficiente de partição, mas como isotermas de adsorção.

3.5.1 Isotermas de adsorção

Todas as aplicações práticas em cromatografia envolvem separações de misturas complexas. Processos que envolvem adsorção competitiva não têm sido muito estudados, entretanto, o conhecimento é fundamental para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de adsorventes e métodos. Há muitos fatores que influenciam a adsorção de proteínas, os principais são a afinidade da proteína com o adsorvente, a distribuição desigual do ligante na superfície da proteína, a competição com outras espécies e as interações entre os solutos, adsorvidos ou em solução (Cano et al., 2005).

Isotermas de adsorção são curvas que descrevem o comportamento da adsorção de solutos por sólidos, a temperatura constante. Uma isoterma de adsorção mostra a quantidade de um determinado soluto adsorvida por uma superfície adsorvente, em função da concentração de equilíbrio do soluto. A técnica usada para gerar os dados de adsorção é, a princípio, bastante simples, pois uma quantidade conhecida do soluto é adicionada ao sistema contendo uma quantidade conhecida de adsorvente. Admite-se que a diferença entre a quantidade adicionada e a remanescente na solução encontra-se adsorvida na superfície adsorvente (Alleoni et al., 1998).

Os modelos mais comumente encontrados para descrever as isotermas de adsorção de bioprodutos são as de Freundlich, a de Langmuir e a linear. Para cada isoterma, a abscissa mostra a concentração de soluto na solução, geralmente em massa de soluto por volume de solução, enquanto a ordenada dá a concentração de soluto na superfície do adsorvente, mais comumente em unidades de massa de soluto por massa de adsorvente.

O modelo de adsorção linear é dado pela Equação 5:

$$q^* = K \cdot C^* \quad (5)$$

Onde q^* é a concentração da espécie de interesse adsorvida na fase sólida, C^* é a concentração do composto de interesse na solução e K é a constante de equilíbrio. No entanto, é pouco usual e ele pode ser aproximado de outros modelos isotérmicos.

O modelo de Freundlich é bastante semelhante ao linear, e descreve a adsorção de uma variedade de antibióticos, esteróides e hormônios, e é dado por:

$$q^* = K \cdot C^n \quad (6)$$

As constantes K e n não devem ser determinadas experimentalmente. Elas geralmente são melhor determinadas pela curva no formato log-log, plotando-se q^* por C . Se a adsorção é favorável, $n < 1$ e se é desfavorável, $n > 1$.

A isoterma de Langmuir é usada para a maioria das proteínas. Este modelo foi originalmente desenvolvido para representar a adsorção em monocamada sobre uma superfície ideal, onde o calor de adsorção deve ser independente da cobertura da fase sólida. O modelo de Langmuir pode ser entendido para a adsorção em sistemas binários ou multicomponentes. O modelo é dado pela Equação 7:

$$q^* = \frac{q_m C^*}{K_d + C^*} \quad (7)$$

Neste caso, q_m e K_d são determinados experimentalmente e a forma mais simples é plotando-se $1/q^*$ por $1/C^*$.

Devido aos estudos da adsorção serem um tanto complexos, pouco se encontra na literatura no que diz respeito à adsorção de proteínas em matrizes sólidas. Boa parte dos artigos de purificação de proteínas reporta somente a etapa de purificação em si, sem avaliação do comportamento cinético, das constantes cinéticas ou da influência de variáveis como temperatura e força iônica sobre a adsorção destes compostos.

Existem poucos trabalhos reportando o estudo da adsorção de ficobiliproteínas em resinas de troca iônica. Silveira et al. (2008) estudaram o efeito do pH e da temperatura sobre o coeficiente de partição e fizeram uma isoterma de adsorção nas melhores condições avaliadas para adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Q-Sepharose FF (leito fixo). A adsorção em resinas de leito expandido foi estudada por Bermejo et al. (2006), onde a isoterma de adsorção foi feita para extrato bruto de C-ficocianina e para C-ficocianina purificada. Nesse estudo não foi avaliado o comportamento cinético, nem o pH e temperatura de melhor adsorção. Tanto no estudo de Silveira et al. (2008) como no de Bermejo et al. (2006), o modelo isotérmico pôde ser descrito pelo modelo de Langmuir.

Para adsorção de inulinase, Kalil et al. (2006) e Santos e Santana (2000) estudaram a isoterma de adsorção de caldo bruto de inulinase e inulinase comercial, respectivamente, e nos dois casos, os dados obtidos podem ser representados pelo modelo de Langmuir.

3.6 Curva de ruptura

Em um estudo cinético dos processos adsortivos em cromatografia determina-se com frequência a chamada curva de ruptura, que, ao contrário da determinação dos modelos em reator de mistura, avalia o processo adsortivo em uma condição dinâmica semelhante à condição real de operação do processo (Pessoa e Kilikian, 2005).

A quantidade de produtos obtidos por volume de alimentação injetado, na coluna, fornece a capacidade dinâmica oriunda da adsorção de proteína. A determinação da concentração na saída do efluente, monitorado na saída da coluna de leito fixo ou fluidizado, em função do volume injetado fornece as curvas de ruptura. A capacidade dinâmica é uma função da velocidade linear que atravessa o leito e da cinética de adsorção das proteínas definidas sob condições de processo (pH, força iônica e temperatura) e das propriedades físicas do fluido.

Nesta técnica, é realizada a medição da concentração do adsorbato na saída do leito em função do volume de solução injetada, obtendo-se a curva denominada de ruptura do sistema. A capacidade de adsorção do leito pode ser então obtida por integração da área da curva de ruptura. Segundo Belter et al. (1988), em uma coluna de adsorção o fluido contendo o soluto de interesse é passado através da mesma. Inicialmente, a maior parte do soluto é adsorvida, tal que a concentração na saída é baixa. Conforme a adsorção continua, a concentração na saída aumenta, vagarosamente no início, e então abruptamente, conforme se observa na Figura 4. Quando esta ruptura ocorre, interrompe-se o fluxo. O material adsorvido é então eluído por lavagem do leito.

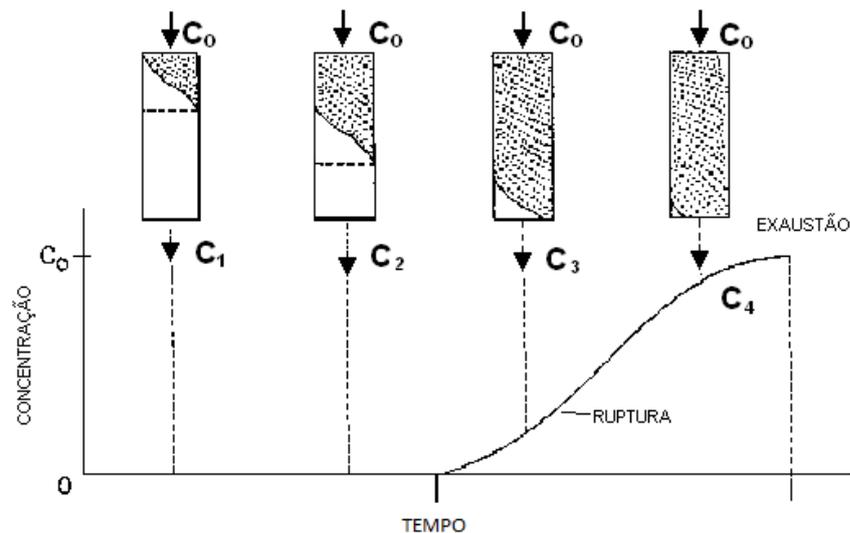


Figura 4: Curva de ruptura para adsorção em coluna de leito fixo (Adaptado de Henning, 1990)

Chase (1984) afirma que é prática normal interromper a alimentação na coluna quando o nível de adsorbato na saída sobe acima de certo nível. Se a alimentação continua, uma quantidade considerável do composto de interesse pode passar sem ser adsorvido. A quantidade de adsorbato que pode ser alimentada, antes que este nível exceda irá depender da forma da curva de ruptura.

A curva de ruptura fornece os valores da concentração de ruptura e da concentração de exaustão, que são sugeridos como sendo 10 e 90% da concentração de entrada, respectivamente. A determinação do ponto de ruptura e do formato da curva afeta a eficiência de adsorção (Jungbauer, 2005).

A taxa atual e o mecanismo do processo de adsorção, a natureza do equilíbrio de adsorção, a velocidade do fluido, a concentração do soluto na alimentação, e a altura do leito de adsorvente contribuem para uma forma de curva de ruptura (*breakthrough*). Via de regra, o tempo de ruptura (*breakthrough*) diminui com o decréscimo da altura do leito, com o aumento do tamanho da partícula do adsorvente, com o aumento da velocidade do fluido através do leito e com o aumento da concentração inicial do soluto na alimentação.

4. MODELAGEM MATEMÁTICA

Alguns pesquisadores (Horstmann e Chase, 1989, Bruce e Chase, 2002, Fenneteau et al., 2002 e Chen et al., 2003) sugerem um modelo para adsorção em leito expandido que considera a transferência de massa da solução de adsorbato para a superfície externa da partícula de adsorvente (resistência à difusão na película líquida), difusão dentro dos poros da partícula (difusão nos poros ou resistência à difusão na partícula), a porosidade do leito, dispersão axial do líquido e a reação química na superfície da partícula (resistência à reação na superfície). Esses modelos em geral servem para descrever a adsorção de sistemas modelos, com proteína previamente purificada dissolvida em tampão, acrescida ou não de células. No entanto, devido ao crescente interesse por produtos biotecnológicos, é interessante que se estude a adsorção em sistemas reais de purificação, contendo caldo ou extrato bruto proveniente da fermentação ou extração direta do bioproduto, que possam realmente ser levados à ampliação de escala. Para tal, a principal ferramenta é a modelagem e simulação desses processos, uma vez que é fundamental para aumento de escala o conhecimento do modelo matemático do processo.

A descrição da adsorção considerada neste trabalho é de um processo isotérmico de adsorção de proteína (inulinase e C-ficocianina) em uma coluna tubular contendo resina de troca iônica. O processo foi descrito matematicamente em termos de equações diferenciais obtidas do balanço de massa e da cinética do processo, e foi baseado nas seguintes hipóteses:

- A concentração de proteína alvo (inulinase ou C-ficocianina) no poro do adsorvente está em equilíbrio com a concentração adsorvida na superfície. Esta adsorção é representada pelo modelo de Langmuir, conforme observado pela isoterma de adsorção;
- O perfil hidrodinâmico da fase líquida pode ser descrito pelo modelo da dispersão axial;
- A distribuição do tamanho de partícula foi considerada a mesma ao longo da altura do leito.

O balanço de massa no volume pode ser expresso por:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - v_z \frac{\partial C}{\partial z} - \frac{1-\epsilon}{\epsilon} \frac{3k_f}{R_p} (C - C_{r=R_p}) \quad (8)$$

As condições iniciais são:

$$t = 0 \rightarrow C(z, 0) = 0 \quad (9)$$

$$z = 0 \rightarrow C = C_0 \quad (10)$$

$$z = H \rightarrow \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad (11)$$

Para o balanço diferencial na fase sólida:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = [k_1 \cdot C \cdot (q_m - q) - k_2 \cdot q] \quad (12)$$

A condição inicial é:

$$t = 0 \rightarrow q(z, 0) = 0 \quad (13)$$

A equação diferencial parcial apresentada na Equação 8 foi numericamente resolvida utilizando o método de discretização de Crank-Nicholson, o qual conduz a um sistema de equações lineares, que foi numericamente solucionado pelas rotinas do DLSLRG FORTRAN IMSL. O balanço de massa da fase sólida (Equação 12) foi integrado no tempo usando o algoritmo LIMEX para cada posição ao longo da coluna (Deuflhard et al., 1987). Os parâmetros do modelo, chamados q_m , k_1 , k_2 , D_l , k_f , e ε foram estimados utilizando o método heurístico PSO (Particle Swarm Optimization).

A versão do PSO usada neste estudo foi baseada no trabalho de Schwaab et al. (2008), que apresenta uma descrição detalhada do algoritmo. O intervalos de busca dos parâmetros foram escolhidos de acordo com os valores experimentais obtidos neste trabalho, para cada uma das proteínas estudadas.

A estimativa dos parâmetros consiste em minimizar a soma dos mínimos quadrados (SMQ), como descrito pela Equação 14, onde y é o vetor das curvas de ruptura experimentais e y^{calc} é o vetor calculado pelo modelo.

$$SMQ = \sum_{i=1}^{n=3} (y_i - y_i^{calc})^2 \quad (14)$$

5. CONSIDERAÇÕES E TENDÊNCIAS

A utilização de bioprocessos vem crescendo de maneira significativa nos últimos anos requerendo tecnologias cada vez mais sofisticadas e grande número de pesquisas. Dentro do exposto na revisão bibliográfica, observou-se que os processos envolvendo recuperação e purificação de proteínas vêm sendo amplamente estudados e há um interesse em que cada vez mais proteínas venham a ser purificadas e que o custo de obtenção destas seja reduzido.

Esta tese vem a contribuir no avanço do desenvolvimento de um processo de purificação de uma proteína de interesse comercial, C-ficocianina, uma vez que inova quando apresenta dados sobre a purificação deste composto a partir de um extrato não clarificado, o que pode vir a viabilizar este processo industrialmente.

Além disso, o desenvolvimento de um modelo matemático que permite prever as curvas de ruptura da adsorção de proteínas provenientes de sistemas reais, em resinas de troca iônica em coluna de leito expandido é interessante, visto que a maior parte dos artigos sobre modelagem da adsorção em leito expandido abordam a adsorção de um componente isolado. Há poucos artigos sobre modelagem da adsorção de sistemas reais contendo proteínas, utilizando leito expandido. Alguns reportam modelagem da adsorção de mistura de duas ou três proteínas, mas ainda como sistema modelo, com proteínas purificadas, dissolvidas em tampão.

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Artigo 1

Modelagem e simulação do processo de adsorção de inulinase por cromatografia de troca iônica em leito expandido

(Mathematical modeling and simulation of inulinase adsorption in expanded bed column – Artigo publicado no Journal of Chromatography A, 1216, p. 4395-4401, 2009)

Modelagem e simulação do processo de adsorção de inulinase por cromatografia de troca iônica em leite expandido

Caroline Costa Moraes¹, Susana Juliano Kalil¹

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos – Engenharia de Alimentos - Caixa Postal 475 – 96201-900- Rio Grande – RS

RESUMO

Um modelo matemático foi desenvolvido para prever as curvas de ruptura da adsorção de extrato bruto não clarificado de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* em resina de troca iônica Streamline SP utilizando coluna de leite expandido. Os parâmetros cinéticos e de transferência de massa foram estimados através de um algoritmo heurístico, o PSO (Particle Swarm Optimization). Para a resolução do modelo foram adotadas as seguintes hipóteses: A concentração de enzima no poro do adsorvente está em equilíbrio com a concentração adsorvida na superfície. Esta adsorção é representada pelo modelo de Langmuir; o perfil hidrodinâmico da fase líquida pode ser descrito pelo modelo da dispersão axial; a distribuição do tamanho de partícula foi considerada a mesma ao longo da altura do leito; as propriedades reológicas do extrato bruto foram consideradas as mesmas em todos os experimentos, independente da concentração do extrato. A equação diferencial parcial foi resolvida numericamente utilizando o método de discretização de Crank-Nicholson, resultando em equações lineares, que foram resolvidas utilizando o algoritmo DLSLRG FORTRAN IMSL. A estimativa dos parâmetros q_m (capacidade máxima de adsorção), k_1 (constante de adsorção), k_2 (constante de dessorção), k_f (coeficiente de transferência de massa), D_1 (coeficiente de dispersão axial) e ε (porosidade) foi feita para cada grau de expansão, usando três curvas experimentais com os graus de expansão (GE) 2,0, 2,5 e 3,0, na concentração inicial de inulinase de 65,6 U/mL. Para validação do modelo, foi utilizada uma curva com grau de expansão 2,5 feita com concentração de inulinase de 114,4 U/mL. Verificado a aplicabilidade do modelo, foi então otimizado o processo utilizando um delineamento composto central rotacional, avaliando-se altura de leito e concentração de extrato enzimático, simulando as curvas nessas condições e avaliando a eficiência de processo (10%) e de coluna (90%). As máximas eficiências foram observadas quando utilizadas maiores concentrações de inulinase, e altura de leito entre 20 e 30 cm. O grau de expansão de 3 vezes foi considerado o melhor, uma vez que a produtividade foi consideravelmente superior.

Palavras-chave: Inulinase, leite expandido, modelagem matemática, estimativa de parâmetros, planejamento experimental

1. INTRODUÇÃO

O uso de processos fermentativos para obtenção de bioprodutos requer um estágio de *downstream*, o que aumenta o custo final do produto. De acordo com Wheelwright et al. (1987), o estágio de purificação corresponde a 70-90% dos custos de obtenção do produto. Assim, são necessárias investigações para reduzir os custos associados ao estágio de *downstream* para garantir a viabilidade econômica do processo.

A cromatografia de troca iônica é umas das técnicas cromatográficas mais poderosas para purificação de proteínas na indústria biotecnológica, e inclui aproximadamente 75% dos esquemas de purificação. Técnicas de purificação convencionais para recuperação de bioprodutos são tipicamente feitas usando colunas de leito fixo. Entretanto, em operações de *downstream*, muitos bioprodutos contêm sólidos em suspensão, o que dificulta o uso de colunas de leito fixo na purificação. Porém, extratos brutos contendo partículas podem ser processados diretamente usando procedimentos de adsorção através de leitos fluidizados ou leito expandido, que podem operar eficientemente na presença de particulados (Anspach et al., 1999).

Comparado com a cromatografia em leito fixo, a purificação em leito expandido utiliza adsorventes especialmente desenvolvidos de forma que a expansão da coluna feita pelo fluxo ascendente forma um leito fluidizado (chamado expandido). Dependendo da densidade do adsorvente escolhido, o mesmo grau de expansão pode ser alcançado com maior ou menor velocidade de alimentação (Li et al., 2005).

A maior parte dos artigos sobre modelagem da adsorção em leito expandido abordam a adsorção de um componente isolado. Há poucos artigos sobre modelagem da adsorção de sistemas reais contendo proteínas, utilizando leito expandido (Mendieta-Taboada et al., 2001, Moraes et al., 2009). Alguns reportam modelagem da adsorção de mistura de duas ou três proteínas (Li et al., 2005), mas ainda como sistema modelo.

Devido à influência da hidrodinâmica do fluido, da classificação da partícula e da transferência de massa da molécula alvo, a análise da cinética de adsorção em leito expandido é complexa. Uma modelagem detalhada da performance de adsorção é fundamental para um melhor entendimento do perfil de adsorção e para usar essa informação como uma ferramenta para o *design* e otimização de parâmetros operacionais (Yun et al., 2005). Os modelos avaliados para leito fixo são geralmente inadequados para descrever a hidrodinâmica e o perfil de leitos expandidos (Li et al., 2005).

A ferramenta da otimização que ainda é pouco explorada em modelagem matemática de processos de adsorção é a metodologia do planejamento experimental. Depois da validação do modelo, é possível avaliar o processo através de simulações para sistematicamente estudar o efeito de cada variável operacional sobre a purificação. Nesse contexto, o planejamento experimental é utilizado como uma ferramenta para identificar os

principais efeitos de interação entre as variáveis. A associação dessas duas metodologias (modelagem e simulação mais planejamento experimental) é uma ferramenta poderosa que pode ser usada para otimização do processo de adsorção. O uso do planejamento experimental com a modelagem matemática do processo em *downstream* não é uma prática comum, entretanto, esta prática é muito importante para redução do número de experimentos, permitindo uma análise robusta da cromatografia de troca iônica (Jakobsson et al., 2005). Alguns pesquisadores relatam o ganho de conhecimentos e a redução dos custos de processo quando este foi otimizado combinando a modelagem matemática com o planejamento experimental (Jakobsson et al., 2005, Degerman et al., 2007, Jakobsson et al., 2007, Kaltenbrunner et al., 2007).

Nesse contexto, o principal objetivo do presente trabalho foi desenvolver um modelo matemático e simular curvas de ruptura para adsorção de inulinase em resina de troca iônica Streamline SP, usando caldo bruto de fermentação contendo células. Com o modelo validado, o processo foi otimizado utilizando a metodologia do planejamento experimental.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e condições de cultivo

Kluyveromyces marxianus ATCC 16045 foi utilizada para produção de inulinase. O microrganismo foi cultivado em caldo MY (malte e levedura). As culturas foram inoculadas em meio contendo 2% de sacarose, em pH 6,5. A enzima foi produzida em erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura (14 g/L sacarose, 20 g/L peptona, 10 g/L extrato de levedura e 1 g/L K_2HPO_4) pH 3,5, usando 10% de inóculo. Os erlenmeyers foram incubados em agitador orbital a 30°C, 2,5 rps por 48h (Kalil et al., 2001).

2.2 Adsorvente e coluna

Para os experimentos de purificação foi utilizada uma coluna Streamline™ 25 (D.I 2,5 cm x 100 cm de altura) e adsorvente Streamline SP, ambos da GE (Uppsala, Suécia). Esta é uma resina catiônica da primeira geração de adsorventes, especialmente elaborada para adsorção em leito expandido, de baixa densidade e diâmetro de partícula entre 100 e 300 μm .

2.3 Comparação das curvas de ruptura em diferentes graus de expansão

As curvas de ruptura obtidas por Kalil (2000) em diferentes graus de expansão foram utilizadas para elaboração do modelo matemático. A coluna preenchida com 10 cm de resina foi primeiramente equilibrada com tampão acetato 0,02M pH 3,5. A seguir, a coluna foi então alimentada com o caldo enzimático contendo células. A alimentação foi feita de forma que se obtivesse graus de expansão 2, 2,5 e 3 (20 cm, 25 cm e 30 cm,

respectivamente) e o comportamento da adsorção comparado. Todos os experimentos foram feitos a 25°C e a atividade de inulinase determinada nas frações de saída da coluna.

2.4 Modelo matemático

O desenvolvimento de um modelo matemático para descrever o processo de adsorção de inulinase em leito foi baseado nas seguintes hipóteses:

- i. A concentração de enzima no poro do adsorvente esta em equilíbrio com a concentração adsorvida na superfície interna da parede do poro;
- ii. O comportamento hidrodinâmico da fase líquida pode ser descrito pelo modelo da dispersão axial;
- iii. A distribuição do tamanho de partícula foi considerada a mesma ao longo do leito, bem como a porosidade;
- iv. As propriedades reológicas do caldo fermentativo contendo inulinase foram consideradas as mesmas em todos os experimentos, independente da concentração do extrato;
- v. A adsorção de células na partícula de resina foi considerada negligenciável. O balanço de massa na coluna pode ser expresso pela Equação 1.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - v_z \frac{\partial C}{\partial z} - \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{3k_f}{R_p} (C - C_{r=R_p}) \quad (1)$$

As condições iniciais e de contorno são:

$$t = 0 \rightarrow C(z,0) = 0 \quad (2)$$

$$z = 0 \rightarrow C = C_0 \quad (3)$$

$$z = H \rightarrow \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad (4)$$

O balanço diferencial para a fase sólida é representado pelo modelo matemático cinético, conforme a Equação 5:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = [k_1 \cdot C \cdot (q_m - q) - k_2 \cdot q] \quad (5)$$

Onde k_1 e k_2 são constantes cinéticas, C é a quantidade de inulinase em solução, q é a enzima adsorvida na resina e q_m é a capacidade máxima de adsorção da resina. A condição inicial foi:

$$t = 0 \rightarrow q(z,0) = 0 \quad (6)$$

No equilíbrio, a isoterma de adsorção pode ser representada pelo modelo de Langmuir (Eq. 7), conforme anteriormente observado para o mesmo processo em adsorção em reator de mistura (Kalil et al., 2006).

$$q^* = \frac{q_m C^*}{K_D + C^*} \quad (7)$$

A equação diferencial parcial apresentada na Equação 1 foi numericamente resolvida utilizando-se o método de discretização de Crank-Nicholson, que gera um sistema de equações lineares, que foi numericamente resolvido pelas rotinas do DLSLRG FORTRAN IMSL. O balanço diferencial de massa para a fase sólida (Eq. 5) foi integrado ao longo do tempo utilizando-se as rotinas da LIMEX para cada posição na coluna (Deuffhard et al., 1987). Os parâmetros do modelo, q_m , k_1 , k_2 , D_i , k_f e ε foram estimados utilizando um método heurístico, o PSO (Particle Swarm Optimization).

A versão do PSO usada nesse estudo foi baseada no trabalho de Schwaab et al. (2008), que apresenta uma descrição detalhada do algoritmo. O intervalos de busca para os parâmetros do modelo foram definidos de acordo com trabalhos prévios de Kalil et al. (2006), como segue: $q_m \in [1000; 15000]$, $k_1, k_2 \in [1 \times 10^{-2}; 1 \times 10^{-8}]$, $D_i \in [1 \times 10^{-3}; 1 \times 10^{-8}]$, $k_f \in [1; 1 \times 10^{-5}]$, e $\varepsilon \in [0,55; 0,85]$.

A estimativa dos parâmetros consiste em minimizar a soma dos mínimos quadrados (SMQ), como descrito pela Equação 8, onde y é o vetor das curvas de ruptura experimentais e y^{calc} é o vetor calculado pelo modelo.

$$SMQ = \sum_{i=1}^{n=3} (y_i - y_i^{calc})^2 \quad (8)$$

Dois curvas de ruptura parciais e uma completa com a mesma concentração de enzima (65,6 U/mL) foram utilizadas para estimativa dos parâmetros, para três graus de expansão (GE): 2,0, 2,5 e 3,0. Na etapa de validação, uma curva de ruptura adicional com concentração de 114,4 U/mL e GE 2,5 foi utilizada.

2.5 Planejamento experimental para otimização da eficiência

A aplicabilidade do modelo previamente validado foi demonstrado na otimização do processo de adsorção em coluna Streamline 25, em termos de eficiência de coluna (Eq.9) e eficiência de processo (Eq. 10).

$$\phi_{90\%} = \frac{\left(0,9(t_{C/C_0=0,9}) - \int_0^{t_{C/C_0=0,9}} C/C_0 dt \right)}{0,9(t_{C/C_0=0,9})} \times 100 \quad (9)$$

$$\phi_{10\%} = \frac{\left(0,1(t_{C/C_0=0,1}) - \int_0^{t_{C/C_0=0,1}} C/C_0 dt \right)}{0,1(t_{C/C_0=0,1})} \times 100 \quad (10)$$

Em um processo de adsorção em leito expandido, as principais variáveis são o grau de expansão (a velocidade influencia diretamente no GE), a altura inicial de leito de resina (H_0) (que influencia na altura final do leito, já expandido) e a concentração inicial de enzima (C_0). Como os parâmetros foram estimados para cada GE, as variáveis consideradas no planejamento foram H_0 e C_0 . Para otimizar o processo, um delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes foi feito, para cada GE. Os valores reais e codificados para as variáveis do DCCR está apresentado na Tabela 1.4.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estimativa dos parâmetros e simulação do processo

Em geral, na modelagem e simulação do processo de adsorção de proteínas é comum que os parâmetros cinéticos (k_1 e k_2) e o parâmetro de equilíbrio (q_m) seja estimado através de uma regressão não linear, além das correlações empíricas para calcular parâmetros de transporte (D_i e k_f) e propriedades do leito, como porosidade, para simular o processo de adsorção em leito fixo ou expandido. Na maioria dos casos, o modelo apresenta boa performance, ajustando-se bem aos dados experimentais. Entretanto, para adsorção de caldo bruto contendo inulinase em leito expandido, simulações anteriormente realizadas apresentaram grandes desvios em relação aos dados experimentais.

Como ilustração, os parâmetros para adsorção de inulinase em resina de troca iônica Streamline SP, em tanque agitado, encontrados por Kalil et al. (2006) foram utilizados no presente trabalho para simular a adsorção de inulinase sobre as mesmas condições apresentadas na Figura 1.1c. As eficiências de coluna (Eq. 9) calculadas para a curva de ruptura experimental foi 57,3%, e se usados os dados do tanque agitado e simulando a curva de ruptura a eficiência muda para 74,0%, mostrando a pouca adequação dos dados obtidos no tanque agitado aos dados obtidos no leito expandido. Este resultado mostra que a melhor alternativa foi reestimar os parâmetros do modelo empregando os dados experimentais obtidos nos experimentos com leito expandido. Chang e Chase (1996) relatam que há correlações na literatura que não se ajustam bem com os dados experimentais em leito expandido quando utilizados adsorventes Streamline.

A estimativa dos parâmetros foi realizada utilizando três curvas de ruptura para caldo fermentado contendo células, para adsorção de inulinase em resina Streamline SP em leito expandido. As curvas de ruptura parciais e completas foram obtidas do trabalho de Kalil (2000). A velocidade superficial (v_z) foi obtida através do comportamento hidrodinâmico estudado previamente (Kalil et al., 2005) e os valores foram de $4,31 \times 10^{-4}$ m/s, $6,82 \times 10^{-4}$ m/s e $9,03 \times 10^{-4}$ m/s para os GE2,0, 2,5 e 3,0, respectivamente.

Idealmente, um grupo de parâmetros ótimo deve existir, mas a redução de dados realista não pode produzir um único conjunto de parâmetros, mesmo usando um método de estimativa de parâmetros com características globais, como o PSO (Schwaab et al., 2008). Os parâmetros estimados estão apresentados na Tabela 1.1, para cada GE investigado. Em todos os casos, os parâmetros estimados foram na mesma ordem de magnitude, principalmente para q_m , k_1 , e k_2 .

Tabela 1.1: Parâmetros estimados pelo algoritmo PSO para os três graus de expansão.

Parâmetros	Grau de Expansão		
	2,0	2,5	3,0
q_m (U/mL)	8409,49	10518,65	10865,42
k_1 (mL/U.s)	$9,01 \times 10^{-6}$	$8,76 \times 10^{-6}$	$7,06 \times 10^{-6}$
k_2 (1/s)	$3,10 \times 10^{-4}$	$4,74 \times 10^{-4}$	$3,68 \times 10^{-4}$
D_1 (m ² /s)	$7,52 \times 10^{-6}$	$1,38 \times 10^{-5}$	$7,45 \times 10^{-6}$
k_f (m/s)	0,65	0,52	0,32
ε	0,617	0,693	0,687

Entre estes parâmetros, o que merece receber mais atenção é a porosidade do leito, uma vez que é o que produz mais impacto nas curvas de ruptura. As porosidades do leito calculadas por Kalil et al. (2005) foram 0,7, 0,76 e 0,8 para os graus de expansão 2,0, 2,5 e 3,0, respectivamente. A correlação usada foi a mesma apresentada por Yun et al. (2005), usando uma porosidade de 0,4 para o leito sedimentado. A variação na precisão é de aproximadamente 10%. Os resultados deste trabalho foram diferentes aos apresentados por Kalil et al., (2005), mas se a precisão nas correlações for considerada, os parâmetros estimados pelo algoritmo PSO estão de acordo com os dados publicados. Inicialmente, a correlação apresentada por Yun et al. (2005) foi testada, mas os resultados não foram satisfatórios.

A Figura 1.1 apresenta os resultados relativos ao processo de simulação da adsorção de inulinase, de acordo com o modelo proposto, com os parâmetros estimados apresentados na Tabela 1.1. As curvas de ruptura simuladas se ajustaram bem aos dados experimentais. A boa performance do modelo também pode ser confirmada observando-se a Tabela 1.2, que mostra a eficiências de coluna e de processo predita pelo modelo e as experimentais para todos os graus de expansão. Isto indica que as simulações mostraram-se próximas à realidade experimental, e então pode ser usada como uma ferramenta na otimização de processos. Para os graus de expansão 2,0 e 2,5 ($C_0 = 65,6$ U/mL) a eficiência de coluna não foi apresentada, uma vez que somente as curvas parciais foram utilizadas.

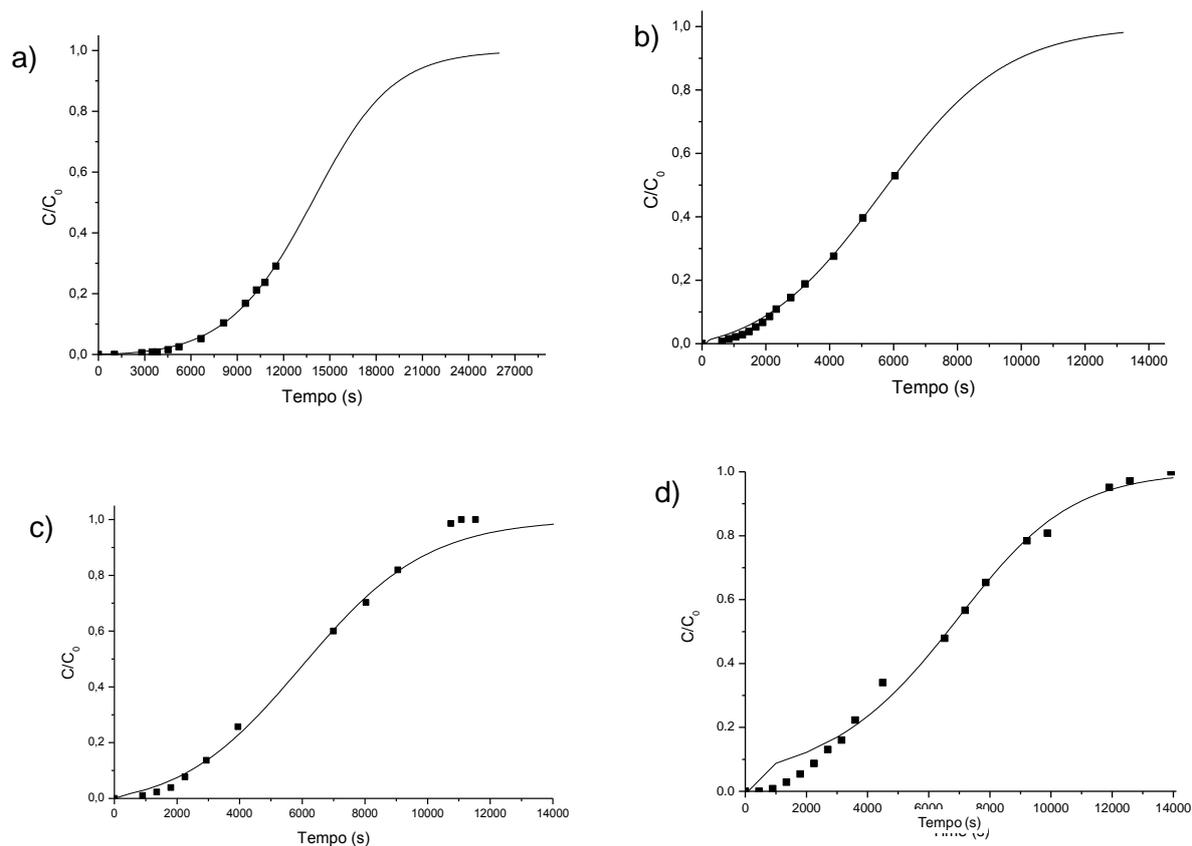


Figura 1.1: Curvas de ruptura para adsorção de inulinase em leito expandido. a) GE 2,0 e $C_0 = 65,6$ U/mL; b) GE 2,5 e $C_0 = 65,6$ U/mL; c) GE 3,0 e $C_0 = 65,6$ U/mL; d) GE 2,5 e $C_0 = 114,4$ U/mL (Validação).

Tabela 1.2: Eficiências experimentais e preditas para adsorção de inulinase em coluna de leito expandido.

Eficiência	Grau de expansão (GE)			
	2,0	2,5 ^a	2,5 ^b	3,0
$\Phi_{90\%}^{\text{exp}}$ (%)	n.d.	n.d.	53,09	57,3
$\Phi_{90\%}^{\text{calc}}$ (%)	66,21	53,65	52,00	54,39
$\Phi_{10\%}^{\text{exp}}$ (%)	75,19	68,62	69,42	69,76
$\Phi_{10\%}^{\text{calc}}$ (%)	71,84	55,22	49,82	57,23

^a $C_0 = 65,6$ U/mL

^b $C_0 = 114,4$ U/mL (Validação)

n.d.: não determinado

Para quantificar a sensibilidade das respostas das simulações com respeito aos erros dos parâmetros, foi escolhido um grau de expansão determinado (GE=3,0) e foram feitas varias simulações, variando-se os parâmetros, uma a uma, em +15% e -15%, de

acordo com os valores correspondentes ao GE 3,0 da Tabela 1.1. A eficiência do processo (Eq. 9) foi calculada para cada simulação feita e comparada ao valor nominal (54,39%). O resultado das eficiências calculadas nessas simulações estão apresentadas na Tabela 1.3.

Tabela 1.3: Sensibilidade paramétrica dos parâmetros do modelo para o GE 3,0.

Parâmetros	$\Phi_{90\%}^{calc}$ (%)	
	-15%	+15%
q_m (U/mL)	51,47	57,67
k_1 (mL/U.s)	50,74	57,77
k_2 (1/s)	55,15	53,74
D_l (m ² /s)	54,76	54,08
k_f (m/s)	54,39	54,39
ϵ	69,43	36,29

Conforme se observa pela Tabela 1.3, o parâmetro mais sensível do modelo é a porosidade e um incremento no valor conduz a um decréscimo na eficiência do processo. Esta redução é provavelmente em função da alta porosidade, o que ocasiona um aumento no espaço livre da coluna. Na prática, isto é conhecido como perda da capacidade dinâmica de ligação, já que há menos moléculas de inulinase em contato com a resina. Esta hipótese é confirmada quando são comparadas as eficiências de coluna experimentais, apresentadas na Tabela 1.2, para os graus de expansão 2,5 e 3,0, que foram 53,09% e 57,3%, respectivamente. As porosidades estimadas apresentadas na Tabela 1.1 para GE 2,5 e 3,0 foram 0,693 e 0,687, respectivamente, mostrando que aumentando a porosidade, a eficiência diminui.

Yun et al. (2005) mostraram que a porosidade do leito varia entre 0,6 e 0,9 para o mesmo GE. Isso sugere que a capacidade dinâmica de ligação foi mudando ao longo da coluna, conforme reportado anteriormente por Chang e Chase (1996). No presente trabalho a porosidade do leito foi estimada como um valor médio, contribuindo para o aumento na sua sensibilidade. Nessas situações, a precisão dos resultados preditos pelo modelo é garantida pelo uso de um método eficiente de estimativa de parâmetros, que é o caso do algoritmo PSO.

Nas análises para eficiência de processo e de coluna (Tabela 1.2) observa-se que as maiores eficiências foram obtidas em GE 2,0, quando comparadas às outras duas avaliadas, sob condições especificadas. No entanto, este não é um argumento suficiente para afirmar que este é o melhor grau de expansão para adsorção de inulinase em resina em leito expandido, uma vez que o tempo é uma variável de processo importante. O tempo utilizado para atingir 10% de saturação foi 7715 segundos (129 min), 2222 segundos (37 min) e 2570 segundos (43 min) para GE 2,0, 2,5 e 3,0, respectivamente. De acordo com

estes resultados, GE 3,0 foi o melhor para a adsorção de inulinase, uma vez que para atingir 10% de saturação foi necessário 1/3 do tempo necessário no GE 2,0.

No presente trabalho, os parâmetros do modelo foram estimados para cada grau de expansão usando somente a concentração de inulinase de 65,6 U/mL. A aplicabilidade do modelo foi demonstrada no passo de validação, quando uma concentração de inulinase diferente foi utilizada (114,4 U/mL), conforme mostra na Figura 1.1d. Assim o modelo foi usado para prever o desempenho do processo em diferentes condições experimentais. Este artigo propõe uma nova metodologia, uma vez que a maior parte dos artigos publicados desenvolvem modelos matemáticos para prever sistemas cromatográficos mono ou bi componentes (Bak et al., 2007), e pouco se reporta sobre sistemas reais provenientes de caldos brutos de fermentação (Mendieta-Taboada et al., 2005).

3.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O modelo validado foi utilizado para simular a adsorção de inulinase, mas utilizando diferentes alturas iniciais de leito e diferentes concentração de inulinase, através do uso do delineamento composto central rotacional. A Tabela 1.4 apresenta a matriz do DCCR e os resultados de eficiência de coluna e eficiência de processo para cada grau de expansão, com um total de 9 simulações para cada GE.

Tabela 1.4: Matriz do DCCR (valores reais e codificados) e respostas para a eficiência de coluna e de processo para GE 2,0, 2,5 e 3,0.

Ensaio	H ₀ (cm)	C ₀ (U/mL)	Φ _{90%} ^{calc} (%)			Φ _{10%} ^{calc} (%)		
			2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0
1	12,9 (-1)	65,6 (-1)	71,02	58,99	59,58	77,52	64,67	65,66
2	27,1 (1)	65,6 (-1)	75,09	63,04	62,77	80,37	67,14	68,01
3	12,9 (-1)	114,4 (1)	84,34	73,98	74,51	90,39	82,48	83,23
4	27,1 (1)	114,4 (1)	87,27	77,84	78,01	92,16	85,06	85,54
5	10,0 (-1,41)	90,0 (0)	78,47	67,14	67,87	85,79	76,11	77,02
6	30,0 (1,41)	90,0 (0)	83,58	73,07	73,20	89,08	79,70	80,65
7	20,0 (0)	55,6 (-1,41)	68,54	55,54	56,10	73,06	56,20	57,89
8	20,0 (0)	124,4 (1,41)	87,38	78,35	78,36	92,45	85,75	86,29
9	20,0 (0)	90,0 (0)	81,96	70,63	70,90	87,86	78,44	78,82

Observa-se na Tabela 1.4 que os ensaios 8 e 4 apresentam-se similares e com eficiências mais elevadas para todos os graus de expansão estudados, tanto para a de processo quanto de coluna. O grau de expansão 2,0 apresentou as maiores eficiências em todos os experimentos.

Os dados da Tabela 1.4 foram usados para computar os efeitos de cada termo para variável independente nas eficiências. Estes efeitos, representados pelo Gráfico do Paretos,

estão apresentados pela Figura 1.2. Os efeitos mais significativos ($p < 0,05$) na eficiência (de processo e de coluna) foram os termos linear e quadrático da concentração inicial, e o termo quadrático da altura inicial do leito de resina. Esta tendência foi verificada tanto para eficiência de coluna, como para de processo.

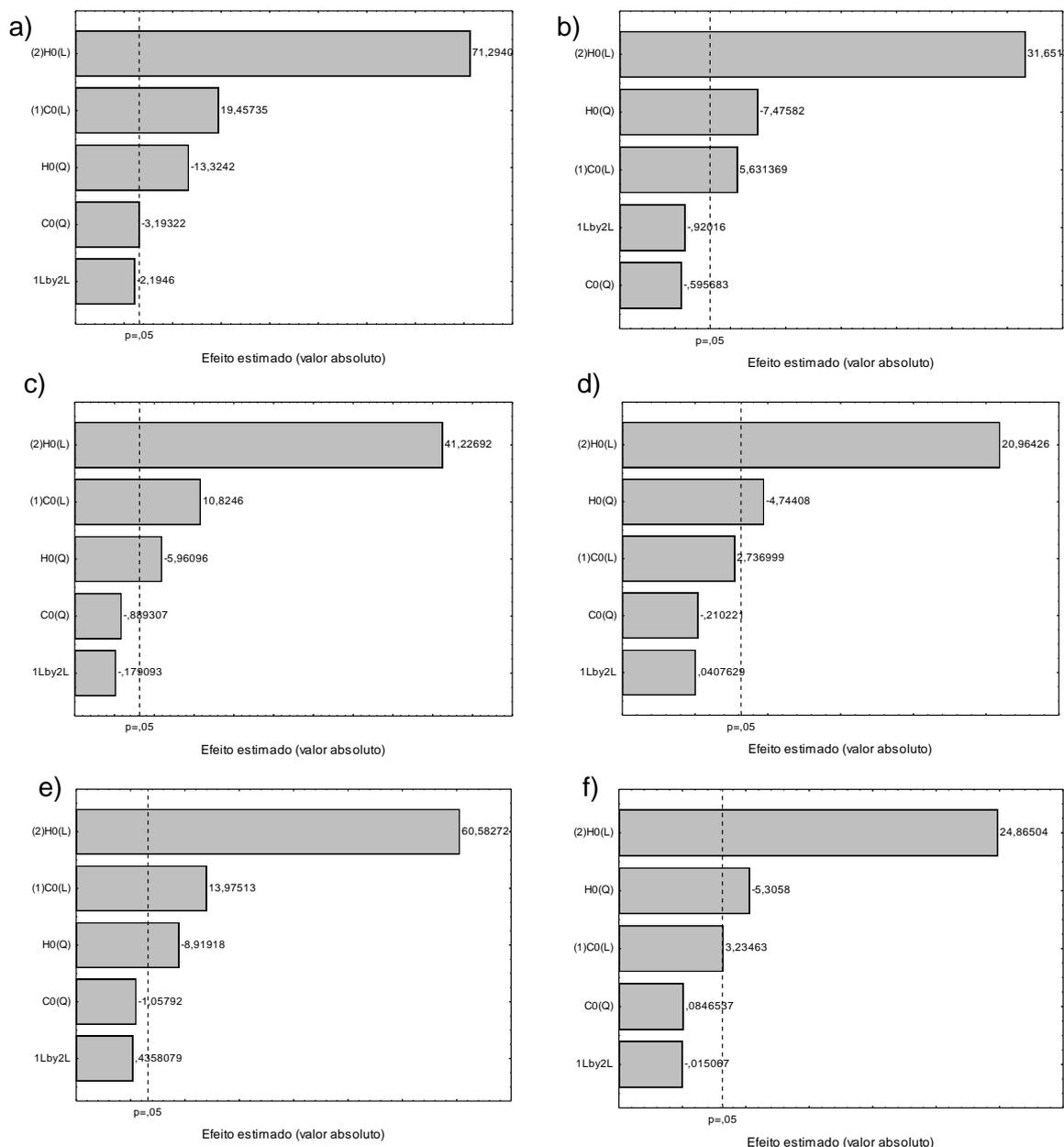


Figura 1.2: Gráfico de paretos para DCCR. a) e b) Eficiência de coluna e de processo para GE 2,0; c) e d) Eficiência de coluna e de processo para GE 2,5; e) e f) Eficiência de coluna e de processo para GE 3,0.

A Análise de Variância (ANOVA) foi feita para validar as curvas de contorno, que foram representações gráficas das eficiências calculadas. Como não há dados experimentais, todos os desvios foram atribuídos à falta de ajuste do modelo. O cálculo de

F-teste foi cerca de 100 vezes maior que o F tabelado, demonstrando um modelo preditivo e significativo e permitindo assim a construção das curvas de contorno (Figura 1.3).

Como pode ser observado na Figura 1.3, para eficiência de processo ou de coluna em todos os GE estudados, os maiores valores de eficiência foram obtidos nas maiores alturas iniciais de leito (nível +1,41) e maiores concentrações de inulinase. Com o objetivo de obter a máxima eficiência de processo e coluna, a região do gráfico que mostra isso é quando se trabalha com concentrações acima de 114,4 U/mL de inulinase, e altura de leito acima de 20cm, para qualquer GE.

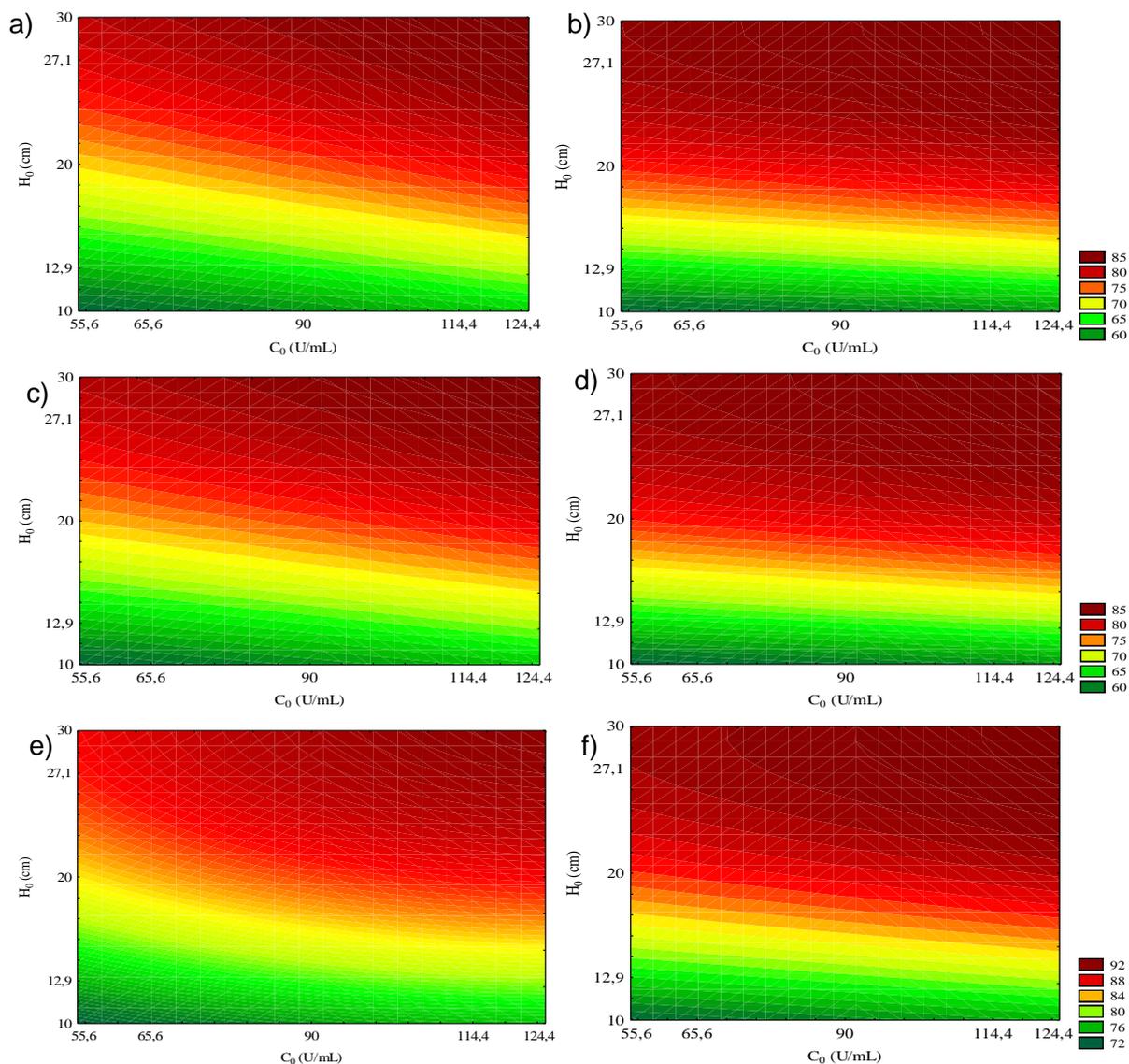


Figura 1.3: Curvas de contorno para o DCCR. a) e b) Eficiência de coluna e processo para GE 2,0; c) e d) Eficiência de coluna e processo para GE 2,5; e) e f) Eficiência de coluna e processo para GE 3,0.

Embora o GE 2,0 apresente mais eficiência na adsorção de inulinase em leito expandido, o tempo necessário é no mínimo 4 vezes maior que para os outros GE. Considerando-se que a eficiência é somente 8% maior em GE 2,0, esta condição não se

mostra interessante do ponto de vista industrial. Entre os GE 2,5 e 3,0, o último apresenta melhores resultados, especialmente para eficiência de processo.

Industrialmente, eficiência de processo é mais importante que eficiência de coluna, uma vez que para produtos de valor agregado elevado, como certas enzimas, não é interessante que se perca produto na alimentação, e admite-se uma perda de 10%, em geral (Chang e Chase, 1996). Dessa forma, o GE 3,0 é o mais interessante em termos de processo para adsorção de inulinase, e apresenta eficiência de processo maior que 85%. No caso de cromatografia, uma alta velocidade superficial leva a alimentação de produto a ser purificado mais rápido, conduzindo a um processo mais produtivo. Com respeito a altura de leito, considera-se que qualquer altura escolhida para maiores eficiências, de coluna e processo deve ser entre 20 e 30 cm.

Foi feita também outra observação, através das Figuras 1.2 e 1.3, com respeito ao aumento da eficiência de acordo com o aumento da concentração inicial de inulinase. Sendo inulinase uma enzima produzida por microrganismos, existe um limite máximo de concentração atingida, que foi encontrada como sendo 174 U/mL (Silva-Santisteban e Maugeri, 2005). Dessa forma, três novas simulações de adsorção foram feitas, considerando as concentrações de inulinase de 130, 150 e 170 U/mL, altura de leito de 27,1 cm e GE 3,0. Observou-se que as eficiências de coluna para cada simulação (130, 150 e 170 U/mL) foram praticamente iguais (78,85, 79,55 e 79,95% respectivamente) e também as eficiências de processo (86,21, 86,64 e 87,20%, respectivamente) o que leva a conclusão de que este é um processo bastante robusto. Em bioprocessos, um processo robusto é muito vantajoso, pois concentração de enzimas provenientes de fermentação são raramente iguais entre uma fermentação e outra.

4. CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou o uso e aplicabilidade da modelagem matemática para prever as curvas de ruptura da adsorção de inulinase em resina de troca iônica Streamline SP em coluna de leito expandido, usando extrato bruto proveniente da fermentação, usando células. O modelo se ajustou bem aos dados experimentais tanto para o procedimento de estimativa dos parâmetros e quanto para a validação.

Também se ressalta que o uso da modelagem matemática associada com a metodologia do planejamento experimental é uma ferramenta útil e promissora para otimização de processos cromatográficos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anspach, F.B.; Curbelo, D.; Hartmann, R.; Garke, G.; Deckwer, W-D. (1999), Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *Journal of Chromatography A*, v.865, p. 129-144.

Bak, H.; Thomas, O. R. T.; Abildskov, J. (2007), Lumped parameter model for prediction of initial breakthrough profiles for the chromatographic capture of antibodies from a complex feedstock. *Journal of Chromatography B*, v. 848, p. 131-141.

Chang, Y. K.; Chase, H. A. (1996), Development of operating conditions for the protein purification using expanded bed techniques: the effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 512-526.

Degerman, M.; Jakobsson, N.; Nilsson, B. (2007), Modeling and optimization of preparative reversed-phase liquid chromatography for insulin purification. *Journal of Chromatography A*, v. 1162, p. 41-49.

Deuflhard E; Hairer E; Zugck J. (1987), One step and extrapolation methods for differential-algebraic systems. *Numerische Mathematik*, v. 51, p. 501-516.

Jakobsson, N.; Degerman, M.; Stenborg, E.; Nilsson, B. (2007), Model based robustness analysis of an ion-exchange chromatography step. *Journal of Chromatography A*, v. 1138, p. 109-119.

Jakobsson, N.; Karlsson, D.; Axelsson, J. P.; Zacchi, G.; Nilsson, B. (2005), Using computer simulation to assist in the robustness analysis of an ion-exchange chromatography step. *Journal of Chromatography A*, v. 1063, p. 99-109.

Kalil, S. J. (2000), Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido – *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Kalil, S. J.; Barboza, M.; Maugeri, F.; Rodrigues, F. (2006), Studies on the adsorption of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 onto an ion exchange resin. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, p. 223-228.

Kalil, S. J.; Maugeri, F.; Rodrigues, M. I. (2005), Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of na extracelular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 581-586.

- Kalil, S. J.; Suzan, R.; Maugeri, F.; Rodrigues, M. I. (2001), Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. *Applied Biochemical and Biotechnology*, v. 94, p. 257-264.
- Kaltenbrunner, O.; Giaverini, O.; Woehle, D.; Asenjo, J.A. (2007), Application of chromatographic theory for process characterization towards validation of an ion-exchange operation. *Biotechnology and Bioengineering*, v.98, p.201-210.
- Li, P.; Xiu, G.; Rodrigues, A. E. (2005), Experimental and modeling study of protein adsorption in expanded bed. *AIChE Journal*, v. 51, p. 2965-2977.
- Mendieta-Taboada, O.; Kamimura, E. S.; Maugeri, F. (2001), Modelling and simulation of the adsorption of the lipase from *Geotrichum* sp. on hydrophobic interaction columns. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 781-786.
- Moraes, C.C.; Mazutti, M.A.; Rodrigues, M.I.; Maugeri, F.; Kalil, S.J. (2009), Mathematical modeling and simulation of inulinase adsorption in expanded bed column. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p.4395-4401.
- Schwaab, M.; Biscaia, E. C.; Monteiro, J. L.; Pinto, J. C. (2008), Nonlinear parameter estimation through particle swarm optimization. *Chemical Engineering Science*, v. 63, p. 1542-1552.
- Silva-Santisteban, B. O. Y.; Maugeri, F. (2005), Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 717-724.
- Wheelwright, S.M. (1987), Downstream processes for large-scale protein purification. *Biotechnology*, v.5, p. 789-193.
- Yun, J.; Lin, D. Q.; Yao, S. J. (2005), Predictive modeling of protein adsorption along the bed height by taking into account the axial nonuniform liquid dispersion and particle classification in expanded beds. *Journal of Chromatography A*, v. 1095, p.16-26.

Artigo 2

Adsorção de C-ficocianina de *Spirulina platensis* em Resina de Troca Iônica

Adsorção de C-ficocianina de *Spirulina platensis* em Resina de Troca Iônica**Caroline Costa Moraes¹, Susana Juliano Kalil¹**

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos – Engenharia de Alimentos - Caixa Postal 475 – 96201-900- Rio Grande – RS

RESUMO

C-ficocianina é um biocorante azul extraído da cianobactéria *Spirulina platensis*, que possui diversas aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica. Neste trabalho foi estudado o efeito do pH e da temperatura sobre a adsorção de C-ficocianina em dois diferentes suportes. O efeito do pH foi estudado em pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5 utilizando as resinas de troca iônica Streamline DEAE e Streamline Q XL, através do coeficiente de partição. O estudo foi feito em reator de mistura contendo C-ficocianina clarificada, diluída em tampão no pH de estudo e resina pré-equilibrada. Amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados para cálculo da concentração de C-ficocianina livre, até que o equilíbrio fosse atingido. C-ficocianina apresentou maiores valores de coeficiente de partição em pH 7,5 para a resina Q XL e pH 7,0 para a DEAE. O estudo da temperatura (5, 15 e 25°C) sobre o coeficiente de partição foi realizado da mesma forma que o estudo do pH, em reator encamisado com extrato ajustado para pH 7,5, na mesma concentração inicial de amostra e resina Q XL. A temperatura não exerceu influência nas faixas estudadas. A isoterma de adsorção da C-ficocianina em resina Streamline Q XL feita em pH 7,5 e a 25°C (ambiente) com amostras em diferentes concentrações iniciais, foi bem representada pelo modelo de Langmuir ($R=0,98$) e os valores Q_m e K_d estimados pela equação linearizada da isoterma, foram de 26,7 mg/mL e 0,067 mg/mL .

Palavras-chave: C-ficocianina; adsorção; cinética; isoterma; Streamline Q XL; Streamline DEAE.

1. INTRODUÇÃO

As ficobiliproteínas são pigmentos captadores de energia luminosa, presentes em cianobactérias, responsáveis por cerca de 50% da captação de luz desses microrganismos (Santiago-Santos et al., 2004). Uma das ficobiliproteínas de particular interesse para a indústria de alimentos e cosméticos é a C-ficocianina; sua aplicabilidade reside no fato de que esta pode ser utilizada como um corante natural azul nestes setores (Minkova et al., 2003).

Dentre as fontes existentes deste biocorante, a cianobactéria *Spirulina platensis* recebe destaque, uma vez que a C-ficocianina pode constituir até 20% em peso seco deste microrganismo (Vonshak, 1997). Somando-se a sua potencial utilização nas indústrias alimentícia e de cosméticos, estudos demonstram que a C-ficocianina possui propriedade antioxidante (Bhat & Madhyastha, 2001), anti-inflamatória e antitumoral (Reddy et al., 2003), além de agir como estimulante do sistema imunológico aumentando assim, a contagem de leucócitos totais, cuja principal função é manter a saúde dos órgãos do corpo, proteger contra o câncer e úlceras (Madhyastha et al., 2006).

Os fins fitoterápicos apresentados por este produto exigem uma elevada pureza, atingida através de diversas técnicas de purificação, as quais apresentam um alto custo. Um dos processos de purificação de proteínas baseia-se em técnicas cromatográficas, tal como a cromatografia de troca iônica. A cromatografia de troca iônica faz uso de trocadores iônicos – resinas – os quais adsorvem as proteínas como resultado de interações iônicas entre os grupos carregados na superfície da proteína e grupos carregados com carga oposta no trocador iônico (Skidmore e Chase, 1989). O pH altera a força iônica das proteínas e a temperatura afeta a estrutura espacial; e portanto estes são parâmetros importantes no estudo da cinética de adsorção do composto de interesse.

Em estudo de adsorção, é fundamental que se determine o modelo isotérmico ao qual a adsorção em questão se ajusta. Isotermas de adsorção são curvas que descrevem a adsorção de solutos por sólidos, a temperatura constante. Uma isoterma de adsorção mostra a quantidade de um determinado soluto adsorvida por uma superfície adsorvente, em função da concentração de equilíbrio do soluto. As isotermas mais comumente encontradas para adsorção de bioprodutos são as de Freundlich, a de Langmuir e a linear. A técnica usada para gerar os dados de adsorção é, a princípio, bastante simples, pois uma quantidade conhecida do soluto é adicionada ao sistema contendo uma quantidade conhecida de adsorvente. Admite-se que a diferença entre a quantidade adicionada e a remanescente na solução encontra-se adsorvida na superfície adsorvente (Alleoni et al., 1998).

A seleção das condições de adsorção de C-ficocianina é importante para uma futura purificação por cromatografia de troca iônica, uma vez que aumentada a adsorção do composto no trocador iônico, os custos do processo se reduzem pela diminuição da perda do produto de interesse e do volume de resina necessário.

Há uma carência de estudos relacionados ao comportamento da C-ficocianina durante a sua adsorção em resinas de troca iônica ou em qualquer outro tipo de adsorvente. Silveira et al. (2008) estudaram o efeito do pH e da temperatura sobre o coeficiente de partição e determinaram a isoterma de adsorção nas melhores condições avaliadas para adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Q-Sepharose FF (leito fixo). A adsorção em resinas de leito expandido foi estudada por Bermejo et al. (2006), onde a isoterma de adsorção foi feita para extrato bruto de C-ficocianina e para C-ficocianina purificada para obtenção dos parâmetros Q_m e K_d . Nesse estudo não foi avaliado o comportamento cinético, nem o pH e temperatura de melhor adsorção.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do pH e da temperatura no coeficiente de partição, bem como determinar as condições de adsorção no equilíbrio característicos da C-ficocianina em resina de troca iônica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo da *Spirulina platensis*, extração e quantificação da C-ficocianina

A cianobactéria foi cultivada autotroficamente em meio Zarrouk diluído a 20%, em fotobiorreatores abertos, sob condições ambientais não controladas (Costa et al. 2000) e cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG. Ao término do cultivo, a biomassa foi recuperada por filtração, seca, congelada e moída (Moraes et al., 2010, Kalil et al., 2008).

A extração da C-ficocianina a partir da biomassa seca foi realizada conforme Moraes et al. (2010), que utilizaram água como solvente extrator na proporção de 0,16g de biomassa pó mL de água, durante 1h, a temperatura ambiente. A concentração de C-ficocianina foi calculada utilizando a Equação 1, descrita por Bennett e Bogorad (1973):

$$C - FC = \frac{(A_{620} - 0,474 A_{652})}{5,34} \quad (1)$$

2.2 Adsorventes

Dois adsorventes próprios para purificação em leito expandido foram estudados quanto a adsorção de C-ficocianina. Estes adsorventes são constituídos de matriz macroporosa de agarose, com núcleo de quartzo. Um dos adsorventes, Streamline DEAE (GE Helathcare), é um trocador aniônico fraco que possui como grupo funcional –O–

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{H}$. O outro adsorvente, Streamline Q XL (GE Healthcare) é um trocador aniônico forte que possui como grupo funcional um amônio quaternário (Amersham Biosciences, 2002). Ambos trocadores têm sua faixa de pH de trabalho entre 2 e 13 e promovem graus de expansão do leito de 2 a 3 vezes.

2.3 Efeito do pH no coeficiente de partição

Os ensaios foram realizados em reatores de mistura, sob agitação, a 25°C por 200 min. Nesse sistema adicionou-se 5 mL de extrato de C-ficocianina e 0,5mL de resina de troca iônica (Streamline Q XL ou Streamline DEAE) pré-equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,025M, no pH de estudo. O pH do extrato de C-ficocianina foi ajustado aos valores de pH estudados (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5), de acordo com as faixas onde C-ficocianina foi considerada estável (Silva et al., 2009). Foi feito um branco de cada ensaio, no qual C-ficocianina no pH de estudo era adicionada ao sistema sem a resina de troca iônica. Amostras foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados (0, 2, 5, 7 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80, 100, 140, 180 e 200 min), calculando-se a concentração de C-ficocianina, conforme a Equação 1, com a subsequente construção da curva de cinética de adsorção, plotando-se C/C_0 versus tempo. A C-ficocianina utilizada em todos estes ensaios foi proveniente do mesmo lote de biomassa e os experimentos foram feitos em duplicata.

Através da concentração inicial e da concentração final de C-ficocianina livre na fase líquida (C^*), pode-se calcular a concentração no equilíbrio da C-ficocianina adsorvida na fase sólida (q^*), definindo assim o coeficiente de partição (f), o qual indica a fração de proteína adsorvida no equilíbrio. O coeficiente de partição foi calculado conforme Harsa e Furusaki (1994) (Equação 2):

$$f = \frac{q^*}{C^*} \quad (2)$$

2.4 Efeito da temperatura no coeficiente de partição

Os ensaios de cinética e cálculo do coeficiente de partição foram realizados em reator de mistura, conforme descrito no item 2.3, utilizando a resina Streamline Q XL. Nesses ensaios, fixou-se o pH em 7,5 variou-se a temperatura de estudo (5; 15 e 25° C). A concentração de C-ficocianina e o coeficiente de partição foram calculados conforme indica a Equação 1 e 2, respectivamente, para as amostras coletadas ao longo do tempo de experimento.

2.5 Isoterma de adsorção

Os experimentos para a determinação da isoterma de adsorção no equilíbrio foram realizados em reatores de mistura, contendo a resina pré-equilibrada e extrato de C-ficocianina em diferentes concentrações iniciais, a pH 7,5, a 25°C, sob agitação de 200 rpm

durante 200 min. Após esse período foram coletadas amostras para a determinação da concentração de C-ficocianina.

Com os valores da concentração no equilíbrio, tanto para a fase líquida como para a fase sólida, traçou-se um gráfico C^* versus q^* e verificou-se qual modelo melhor se ajustou aos dados obtidos. O modelo de Langmuir representou bem os dados experimentais, e é descrito pela Equação 3:

$$q^* = \frac{q_m \cdot C^*}{K_d + C^*} \quad (3)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Efeito do pH no coeficiente de partição

O coeficiente de partição correlaciona a quantidade de um composto de interesse que migra de uma fase para outra. Neste caso, o coeficiente de partição correlaciona a quantidade de C-ficocianina presente na fase sólida, ou seja, adsorvida na resina, com a quantidade da mesma proteína livre na solução, no equilíbrio.

A Figura 2.1 mostra o comportamento relativo à variação da concentração de C-ficocianina na fase líquida, ao longo do tempo para os diferentes valores de pH. Observa-se que em 60 minutos o equilíbrio já havia sido atingido em todos os valores de pH estudados para a resina Streamline Q XL (Figura 2.1b), enquanto para a resina Streamline DEAE (Figura 2.1a) o equilíbrio foi atingido somente após 140 minutos. Os ensaios feitos sem adição de resina mostraram que não houve desnaturação da C-ficocianina ao longo do tempo em nenhum pH de trabalho. Estes experimentos além de apresentarem o comportamento da adsorção ao longo do tempo, forneceram dados a respeito do tempo necessário para atingir o equilíbrio.

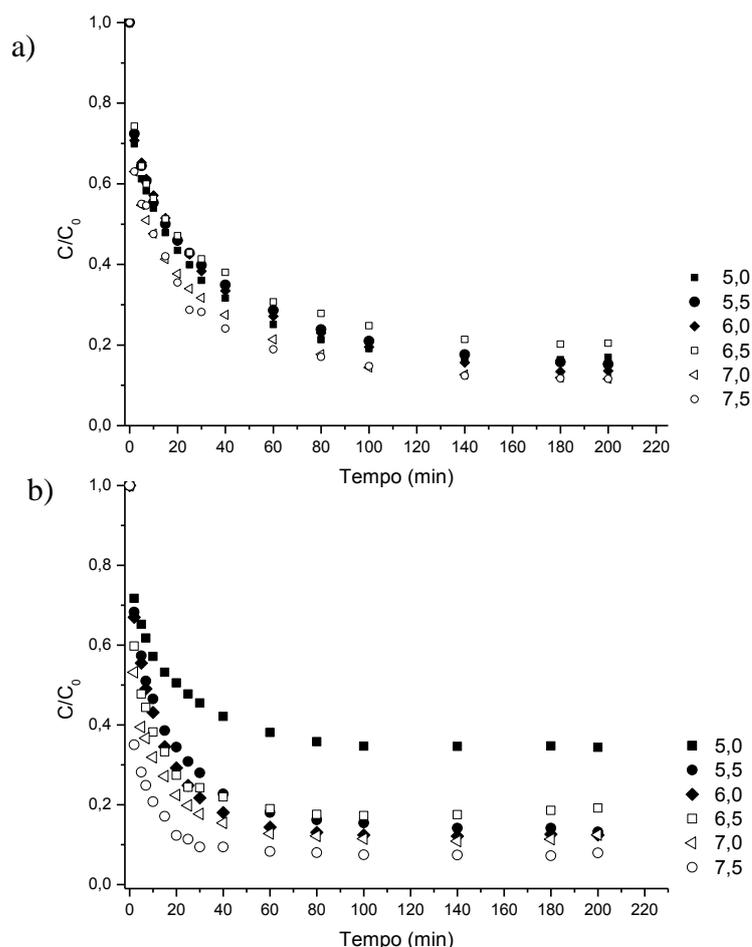


Figura 2.1 – (a) Efeito do pH na adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline DEAE. (b) Efeito do pH na adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline Q XL.

A Figura 2.2 apresenta o comportamento do coeficiente de partição com a variação de pH na adsorção de C-ficocianina em resina Streamline Q XL e Streamline DEAE. Os valores mínimos do coeficiente de partição foram obtidos nos valores de pH mais baixos, onde o pH 5 apresentou o menor coeficiente. É possível que neste pH (5,0) a C-ficocianina esteja com uma carga líquida negativa baixa, pois alguns estudos (Abalde et al., 1998, Santiago-Santos et al, 2004) revelam que C-ficocianina extraída de cianobactérias possuem ponto isoelétrico na faixa de pH de 4,0 a 5,2, de forma que esta se liga fracamente a resina de troca aniônica. O comportamento encontrado para adsorção em diferentes valores de pH de C-ficocianina em resina de leito expandido Streamline Q XL foi muito semelhante ao encontrado por Silveira et al. (2008) para adsorção de C-ficocianina em resina de leito fixo Q Sepharose Fast Flow, tanto para o tempo necessário para atingir o equilíbrio, quanto para os valores obtidos para o coeficiente de partição nos diferentes valores de pH.

A variação no coeficiente de partição para a resina Streamline DEAE foi pequena, comparada a Streamline Q XL, mostrando que o pH pouco influencia na adsorção nesta

resina. O maior valor obtido para o coeficiente de partição foi de 124,5 verificado em pH 7,5, quando a resina Streamline Q XL foi utilizada. No estudo de Silveira et al. (2008), a influência do pH sobre o coeficiente de partição foi avaliada também nos valores de pH 8,0 e 9,0 e, embora no pH 8,0 o coeficiente de partição fosse um pouco superior ao encontrado no pH 7,5, os autores comentam que no pH 8,0 a C-ficocianina foi pouco estável, e não é interessante realizar estudos de adsorção se há perda da atividade biológica da proteína. Além disso, Silva et al. (2009) reportam que a concentração de C-ficocianina reduz para 70% do valor inicial, em pH 8,0 e temperatura ambiente. Desta forma, o estudo da adsorção foi continuado tendo-se escolhido a resina Streamline Q XL e pH 7,5.

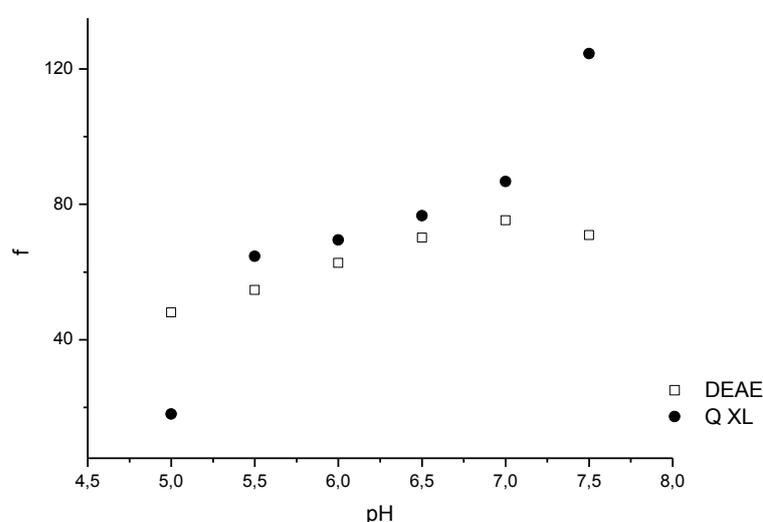


Figura 2.2: Efeito do pH no coeficiente de partição na adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline DEAE e Streamline Q XL.

3.2 Efeito da temperatura no coeficiente de partição

Para o ensaio realizado a 5°C obteve-se um coeficiente de partição de 47,7, para 15°C o coeficiente de partição foi de 43,5, já a 25°C o coeficiente de partição foi de 47,8. A diferença entre os valores obtidos no estudo do efeito do pH se deve ao fato de um novo lote de biomassa ter sido utilizado na extração para o estudo do efeito da temperatura. O estudo do efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição revelou que dentro da faixa estudada, o coeficiente de partição não sofre mudanças significativas. Assim, optou-se para trabalhar nos experimentos seguintes com a temperatura de 25°C, uma vez que, a escolha dessa temperatura reduz custos de refrigeração em processos de purificação utilizando coluna em maior escala. Além disso, segundo Sarada et al. (1999) e Silva et al. (2009), a C-ficocianina é estável a esta temperatura.

3.3 Isoterma de adsorção

A isoterma de adsorção de Langmuir é um modelo que descreve a concentração do adsorbato na superfície do adsorvente em função da concentração do adsorbato na fase líquida, no equilíbrio. Os dados obtidos experimentalmente com os pontos de equilíbrio em diferentes concentrações se comportam de acordo com o modelo de Langmuir ($R=0,98$). A Figura 2.3 (a) apresenta o ajuste do modelo de Langmuir para a isoterma de adsorção de C-ficocianina na resina Streamline Q XL.

A equação $1/q^* = 0,0375 + 0,0025 1/c^*$ foi obtida a partir da linearização da isoterma, da qual se obteve os valores de q_m e K_d , sendo estes 26,67 mg/mL e 0,067 mg/mL, respectivamente. A afinidade da adsorção é refletida na inclinação inicial da isoterma de adsorção, ou seja, o valor K_d , e quanto menor este valor, maior é a afinidade da adsorção. Silveira et al (2008) obtiveram valores de q_m e K_d para a adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Q Sepharose Fast Flow de 22,67 mg/mL e 0,031 mg/mL, respectivamente. Bermejo et. al. (2006) obtiveram valor de q_m igual a 0,8 mg/mL para a adsorção máxima da resina Streamline DEAE. Assim sendo, a resina Streamline Q XL apresentou uma adsorção máxima 33 vezes superior a mencionada, o que reflete a importância do estudo das condições de melhor adsorção, como pH e temperatura.

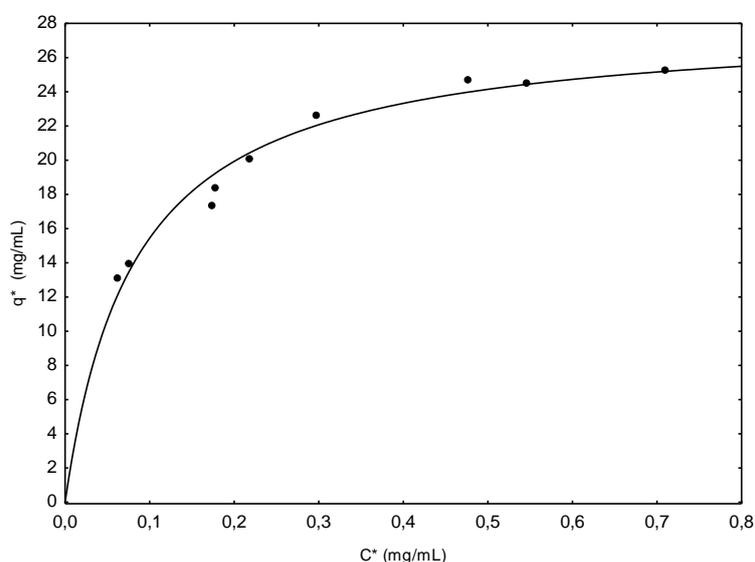


Figura 2.3: Ajuste do modelo de Langmuir para a isoterma de adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline Q XL.

O modelo de Langmuir considera a adsorção de apenas uma molécula por sítio de adsorção (monocamada) e admite também que não há interação entre as moléculas adsorvidas. Na troca iônica mais de uma proteína, em geral, é adsorvida no mesmo sítio, há competição entre as proteínas para a adsorção, a massa molar interfere na adsorção e, ainda, há interações entre proteínas (Pessoa e Kilikian, 2005). No entanto, o modelo de

Langmuir geralmente representa bem as isotermas de adsorção feitas em vários tipos de resinas de troca iônica, para diversas proteínas de interesse, como é o caso da adsorção de ácido clavulânico em Amberlite IRA (Barboza et al., 2002), ou amiloglicosidade em resina DEAE celulose (Manera et al., 2008).

4. CONCLUSÕES

O estudo das condições de adsorção revelou que a resina Streamline Q XL adsorve mais C-ficocianina que a resina Streamline DEAE na maioria dos valores de pH estudados. A adsorção mais pronunciada aconteceu em pH 7,5 (coeficiente de partição de 124,5), e a temperatura não influenciou na adsorção na faixa estudada quando a resina Streamline Q XL foi utilizada. A isoterma de adsorção da C-ficocianina em pH 7,5 e 25°C mostrou um comportamento de acordo com o modelo de Langmuir, e os valores q_m e K_d estimados a partir da equação linearizada da isoterma, foram de 26,67 mg/mL e 0,067 mg/mL, respectivamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde, J.; Betancourt, L.; Torres, E.; Cid, A.; Barwell, C. (1998), Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*, v. 136, p. 109 – 120.
- Alleoni, L.R.F.; Camargo, O.A.; Casagrande, J.C. (1998), Isotermas de Langmuir e de Freundlich na descrição da adsorção de boro em solos altamente intemperizados. *Scientia Agricola*, v.55, p. 379-389.
- Amersham Biosciences. *Instructions*.2002. Catálogo.
- Barboza, M.; Almeida, R. M. R. G.; Hokka, C. O. (2002), Intrinsic kinetic parameters of clavulanic acid adsorption by ion-exchange chromatography. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 41, p. 5789-5793.
- Bennett, A.; Bogorad, L. (1973), Complimentary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology*, v. 58, p. 419-435.
- Bermejo, R.; Felipe, M. A.; Talavera, E. M., Alvarez-Pez, J. M. (2006), Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. *Chromatographia*, v. 63, p. 59-66.
- Bhat, V. B.; Madyasatha, K. M. (2001), Scavenging of peroxyxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection Against Oxidative Damage to DNA. *Biological and Biophysical Research Communications*. v. 285, p. 262-266.

- Costa, J.A.V.; Linde, G.A.; Atala, D.I.P.; Mibileli, G.M.; Krüger, R.T. (2000) Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.16, p.15-18.
- Harsa, S.; Furusaki, S. (1994), Separation of amyloglucosidase using B-cyclodextrin/chitosan. *Separation Science and Technology*. v. 29, p. 639-650.
- Kalil, S. J., Burkert, C. A. V., Burkert, J. F. M., Silveira, S.T., Moraes, C. C., Costa, J. A. V. (2008). Patente: Privilégio de Inovação n.PI0801702-6, Obtenção do extrato de ficocianina a. 19 de Fevereiro de 2008 (Depósito).
- Madhyastha, H. K.; Radha, K. S.; Sugiki, M.; Omura, S.; Maruyama, M. (2006), Purification of C-phycoyanin from *Spirulina fusiformis* and its effect on the induction of urokinase-type plasminogen activator from calf pulmonary endothelial cells. *Phytomedicine*, v. 13, p. 564-569.
- Manera, A.P.; Kamimura, E.S.; Brites, L.M.; Kalil, S.J. (2008), Adsorption of amyloglucosidase from *Aspergillus niger* NRRL 3122 using ion exchange resin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.51, p. 1015-1024.
- Minkova, K. M.; Tchernov, A. A.; Tchorbadjieva, M. I.; Fournadjieva, S.T.; Antova, R. E.; Busheva, M. Ch. (2003), Purification of C-phycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, v. 102, p. 55-59.
- Moraes, C.C.; Burkert, J.F.M; Kalil, S.J. (2010), C-phycoyanin extraction process for large-scale use. *Journal of Food Biochemistry*, (in press)
- Pessoa, A. Jr.; Kilikian, B. V. (2005), *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. Ed. Manole, Barueri, SP, p.444.
- Reddy, C. M.; Subhashini, J.; Mahipal, S. V. K.; Bhat, V. B.; Reddy, P. S.; Kiranmai, G. Madyastha, K. M.; Reddanna, P. (2003), C-phycoyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 304, p. 385-392.
- Santiago-Santos, M. C.; Ponce-Noyola, T.; Olvera-Ramírez, R.; Ortega-López, J.; Cañizares-Villanueva, R. O. (2004), Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp.. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 2047-2052.
- Sarada, R.; Pillai, M. G.; Ravishankar, G. A. (1999), Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 795-801.

Silva, L.A.; Kuhn, K.R.; Moraes, C.C.; Burkert, C.A.V.; Kalil, S.J. (2009), Experimental Design as a Tool for Optimization of C-Phycocyanin Purification by Precipitation from *Spirulina platensis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.20, p.5-12.

Silveira, S. T.; Quines L. K. M.; Burkert C. A. V.; Kalil S. J. (2008), Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 31, p. 477-482.

Skidmore, G. L; Chase, H. A. (1989), Multi-component adsorption of proteins to ion exchangers. *Chemical Engineering Research Design*, v. 67, p. 244-254.

Vonshak, A. (1997), *Spirulina platensis (Arthrospira)* – Physiology, cell biology and biotechnology. Ed. Taylor & Francis, p. 196 – 198.

Artigo 3

**Modelagem do processo de adsorção de C-ficocianina em
resina de troca iônica em leito expandido**

Modelagem do processo de adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica em coluna de leito expandido

Caroline Costa Moraes¹, Susana Juliano Kalil¹

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos – Engenharia de Alimentos - Caixa Postal 475 – 96201-900- Rio Grande – RS

RESUMO

A modelagem matemática do processo de adsorção de extrato não clarificado de C-ficocianina em resina de troca iônica em coluna de leito expandido foi desenvolvida. Para elaboração deste trabalho, primeiramente foi avaliado o perfil hidrodinâmico do leito expandido, utilizando tampão fosfato pH 7,5 e extrato bruto não clarificado de C-ficocianina. Depois de conhecido o comportamento hidrodinâmico, foram feitas curvas de ruptura, em três diferentes graus de expansão (2,0; 2,5 e 3,0) com extrato bruto de C-ficocianina contendo células. Para a elaboração do modelo foram adotadas as seguintes hipóteses: a concentração de C-ficocianina no poro do adsorvente está em equilíbrio com a concentração adsorvida na superfície e esta adsorção é representada pelo modelo de Langmuir; o perfil hidrodinâmico da fase líquida pode ser descrito pelo modelo da dispersão axial; a distribuição do tamanho de partícula foi considerada a mesmo ao longo da altura do leito, as propriedades reológicas do extrato bruto foram consideradas as mesmas em todos os experimentos, independente da concentração do extrato. Os parâmetros cinéticos e de transferência de massa foram estimados através de um algoritmo heurístico, o PSO “Particle Swarm Optimization”. Como resultados, verificou-se, pelo perfil hidrodinâmico, uma expansão do leito maior quando se aplicou extrato não clarificado. Assim, para uma mesma velocidade linear aplicada, a altura atingida pela resina, ao trabalhar-se com caldo bruto, será maior que quando aplicada uma solução tampão. Após a obtenção das curvas de ruptura e do modelo matemático, as simulações feitas para diferentes alturas de leito mostraram que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais. Através da avaliação dos resultados em termos de capacidade de adsorção e eficiência, a condição de adsorção de extrato bruto não clarificado de C-ficocianina que se mostra mais vantajosa para uma maior produtividade, é quando se alimenta o extrato até atingir 10% de saturação da resina, em grau de expansão 2,0, com uma altura inicial de leito de 30 cm.

Palavras-chave: C-ficocianina, adsorção, leito expandido, modelagem matemática e simulação.

1. INTRODUÇÃO

Principal componente da família das ficobiliproteínas, C-ficocianina (Patil e Raghavarao, 2007) é um pigmento acessório fotossintético azul que pode ser utilizado como corante em alimentos e em cosméticos, mas também apresenta muitas propriedades que tornam seu uso adequado na indústria médica e farmacêutica (Soni et al., 2006). C-ficocianina (C-FC) é encontrada geralmente no interior das células de cianobactérias como as do gênero *Spirulina* (*Arthrospira*). Quando purificada, C-ficocianina apresenta ação antioxidante frente aos radicais hidroxílicos (Estrada et al., 2001) e radicais peróxidos (Romay et al., 2001). Tem sido também avaliada sua capacidade como agente antitumoral e antiinflamatório (Reddy et al., 2003). Estudos têm mostrado que a C-ficocianina age como um estimulante do sistema imunológico, aumentando a contagem de leucócitos, cuja função principal é manter a saúde dos órgãos do corpo, proteger contra o câncer e úlceras (Eriksen, 2008).

A purificação de qualquer produto biotecnológico tradicionalmente envolve as etapas de precipitação, centrifugação, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico, ou a combinação destes (Ling et al., 2004), seguidos de uma ou mais etapas cromatográficas, como principalmente cromatografia de troca iônica, de afinidade, de interação hidrofóbica ou de adsorção. Industrialmente, a eliminação de etapas no processo de purificação pode vir a viabilizá-lo não só tecnicamente, mas economicamente. Um processo que vem recebendo atenção é a adsorção de proteínas na presença de biomassa através do uso de leito fluidizado, particularmente o uso de leito expandido (Kaczmarek e Bellot, 2005). O aumento na porosidade do leito permite que pequenas partículas na fase móvel passem através do leito expandido sem necessitar sua prévia remoção (Xia et al., 2007). A adsorção em leito expandido (ALE) conceitualmente apresenta uma série de vantagens sobre operações em leito empacotado para operação em larga escala, particularmente por isolar e purificar bioprodutos de grandes volumes de extratos brutos contendo material particulado (Pai et al., 1999).

Embora esta técnica se mostre interessante para purificação, há atualmente poucos estudos que relatam a purificação de C-ficocianina usando cromatografia de leito expandido e incluem os trabalhos de Bermejo et al. (2006) e Niu et al. (2007), que purificaram C-ficocianina através de cromatografia em leito expandido, utilizando cromatografia de troca iônica e cromatografia de interação hidrofóbica, respectivamente.

O conhecimento do comportamento do leito em função das propriedades físicas das partículas e do fluido é de fundamental importância para as operações usando ALE. Essa caracterização baseia-se em especial na medida da expansão do leito em função da velocidade linear do fluido e, ainda, em função dos fatores de distribuição de tamanho de partículas, viscosidade do fluido e presença de célula. A viscosidade do caldo proveniente

da fermentação é maior que a da água e varia fortemente com a composição e concentração de biomassa (Nayak, 2001).

Em um estudo cinético dos processos adsorptivos em cromatografia determina-se com frequência a chamada curva de ruptura, que, ao contrário da determinação dos modelos em reator de mistura, avalia o processo adsorptivo em uma condição dinâmica semelhante à condição real de operação do processo. A curva de ruptura fornece os valores da concentração de ruptura e da concentração de exaustão, que são sugeridos como sendo 10 e 90% da concentração de entrada, respectivamente. A determinação do ponto de ruptura e do formato da curva afeta a eficiência de adsorção (Jungbauer, 2005).

Estas curvas de ruptura podem ser matematicamente modeladas, através de equações que descrevem o comportamento hidrodinâmico e perfil de adsorção no leito expandido. Com o modelo matemático que descreva a curva de ruptura, é possível fazer simulações do processo em condições determinadas, sem necessidade de realizar experimentos, portanto, sem gastos de operação.

Até o momento, nenhuma publicação relatando a modelagem matemática da adsorção de C-ficocianina em resinas de troca iônica, em coluna de leito expandido, foi encontrada. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento hidrodinâmico do extrato de C-ficocianina na presença de células, bem como fazer a modelagem e simulação do processo de adsorção da mesma.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Biomassa e C-ficocianina

A biomassa utilizada foi a cianobactéria *Spirulina platensis* LEB 52, cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG. A biomassa seca, congelada e moída foi adicionada ao solvente extrator conforme Moraes et al.(2010), na concentração de 160g/L. Após a extração, o caldo bruto contendo células foi diluído e ajustado o pH em 7,5.

2.2 Adsorvente e coluna

Dois adsorventes próprios para purificação em leito expandido foram estudados quanto a adsorção de C-ficocianina. Estes adsorventes são constituídos de matriz macroporosa de agarose, com núcleo de quartzo. Um dos adsorventes, Streamline DEAE (GE Helathcare), é um trocador aniônico fraco que possui como grupo funcional $-O-CH_2CH_2-N+(C_2H_5)_2H$. O outro adsorvente, Streamline Q XL (GE Healthcare) é um trocador aniônico forte que possui como grupo funcional um amônio quaternário (Amersham Biosciences, 2002). Ambos trocadores têm sua faixa de pH de trabalho entre 2 e 13 e promovem graus de expansão do leito de 2 a 3 vezes.

2.3 Medida do grau de expansão

As características de expansão do leito foram medidas usando a coluna Streamline 25 com um preenchimento de resina para fornecer um leito de 10 cm de altura. O líquido em estudo foi alimentado na coluna com uma vazão crescente até que a superfície do leito passasse a ficar difusa e instável. A alimentação foi realizada a vazões sucessivamente menores até zero. Um intervalo de 20 minutos foi feito entre as alterações de vazão para permitir a estabilização. Após a estabilização, foi feita a leitura da altura do leito, que é expressa como uma função da velocidade linear. Ao plotar a velocidade superficial *versus* a expansão do leito, em formato log-log, a regressão linear permite determinar o coeficiente de Richardson-Zaki e a velocidade terminal (Richardson e Zaki, 1954).

Os ensaios foram feitos com diferentes soluções de fluidização, uma sendo o extrato bruto não clarificado de C-ficocianina e a outra tampão fosfato de sódio 0,025M pH 7,5.

2.4 Obtenção da curva de ruptura em coluna de leito expandido

A coluna contendo 10 cm de leito de resina foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,025M pH 7,5 de modo a obter o grau de expansão 2,0, 2,5 ou 3,0, por cerca de 20 a 30 minutos, até obtenção de um leito estável. A seguir, a solução de C-ficocianina não clarificada, com concentração de aproximadamente 1,5 mg/mL, pH 7,5, proveniente da extração direta, foi alimentada na velocidade estabelecida pelo comportamento hidrodinâmico para obtenção de cada GE. As frações na saída da coluna foram coletadas com auxílio de um coletor de frações e então centrifugadas para separação das células, e medida a concentração de C-ficocianina (Eq. 1) em cada alíquota. Foi plotado o gráfico C/C_0 *versus* volume de alimentação, de modo a se obter o valor de q (Eq. 2) e os dados foram usados para modelagem matemática do processo de adsorção. A comparação das curvas de ruptura foi feita e os resultados expressos pelo valor de q a 10% e 80% da curva de ruptura e pelo cálculo da eficiência global de coluna (Eq.3) e de processo (Eq.4).

$$C - FC = \frac{(A_{620} - 0,474 A_{652})}{5,34} \quad (1)$$

$$q = \frac{C_0 (V_f - V_m) - \int_{V_m}^{V_f} C dV}{m_{ads}} \quad (2)$$

$$Eficiência\ global\ de\ coluna = \frac{V_{80\%} - \int_{V_m}^{V_{80\%}} C/C_0 dV}{V_{80\%}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Eficiência global de processo} = \frac{V_{10\%} - \int_{V_m}^{V_{10\%}} C/C_0 dV}{V_{10\%}} \times 100 \quad (4)$$

3. MODELO MATEMÁTICO

O desenvolvimento de um modelo matemático para descrever o processo de adsorção de C-ficocianina em leite foi baseado nas seguintes hipóteses:

- i. A concentração de C-ficocianina no poro do adsorvente esta em equilíbrio com a concentração adsorvida na superfície interna da parede do poro;
- ii. O comportamento hidrodinâmico da fase líquida pode ser descrito pelo modelo da dispersão axial;
- iii. A distribuição do tamanho de partícula foi considerada a mesma ao longo do leite, bem como a porosidade;
- iv. As propriedades reológicas do extrato bruto de C-ficocianina contendo células foram consideradas as mesmas em todos os experimentos, independente da concentração do extrato;
- v. A adsorção de células na partícula de resina foi considerada negligenciável. O balanço de massa na coluna, para a concentração de C-ficocianina pode ser expresso pela Equação 5.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - v_z \frac{\partial C}{\partial z} - \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{3k_f}{R_p} (C - C_{r=R_p}) \quad (5)$$

As condições iniciais e de contorno são:

$$t = 0 \rightarrow C(z,0) = 0 \quad (6)$$

$$z = 0 \rightarrow C = C_0 \quad (7)$$

$$z = H \rightarrow \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad (8)$$

O balanço diferencial para a fase sólida é representado pelo modelo matemático cinético, conforme a Equação 9:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = [k_1 \cdot C \cdot (q_m - q) - k_2 \cdot q] \quad (9)$$

Onde k_1 e k_2 são constantes cinéticas, C é a concentração de C-ficocianina em solução, q é a concentração de C-ficocianina adsorvida na resina e q_m é a capacidade máxima de adsorção da resina. A condição inicial foi:

$$t = 0 \rightarrow q(z,0) = 0 \quad (10)$$

No equilíbrio, a isoterma de adsorção pode ser representada pelo modelo de Langmuir (Eq. 11), conforme anteriormente observado em estudos prévios (Artigo 2).

$$q^* = \frac{q_m C^*}{K_D + C^*} \quad (11)$$

A equação diferencial parcial apresentada na Equação 5 foi numericamente resolvida utilizando-se o método de discretização de Crank-Nicholson, que gera um sistema de equações lineares, que foi numericamente resolvido pelas rotinas do DLSLRG FORTRAN IMSL. O balanço diferencial de massa para a fase sólida (Eq. 9) foi integrado ao longo do tempo utilizando-se as rotinas da LIMEX para cada posição na coluna (Deuffhard et al., 1987). Os parâmetros do modelo, q_m , k_1 , k_2 , D_l , k_f e ε foram estimados utilizando um método heurístico, o PSO (Particle Swarm Optimization).

A versão do PSO usada nesse estudo foi baseada no trabalho de Schwaab et al. (2008), que apresenta uma descrição detalhada do algoritmo. O intervalos de busca para os parâmetros do modelo foram definidos de acordo com o dados obtidos em estudos prévios (Artigo 2), como segue: $q_m \in [5, 70]$, k_1 e $k_2 \in [10^{-5}, 10^{-1}]$, $D_l \in [10^{-7}, 10^{-4}]$, $k_f \in [10^{-3}, 1]$, e $\varepsilon \in [0,50, 0,9]$.

A estimativa dos parâmetros consiste em minimizar a soma dos mínimos quadrados (SMQ), como descrito pela Equação 12, onde y é o vetor das curvas de ruptura experimentais e y^{calc} é o vetor calculado pelo modelo.

$$\text{SMQ} = \sum_{i=1}^{n=3} (y_i - y_i^{\text{calc}})^2 \quad (12)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expansão do leito

A correlação empírica de Richardson-Zaki, $U=U_T\varepsilon^n$, onde U é a velocidade superficial, ε é a porosidade, n é o índice de expansão do leito e U_T é a velocidade terminal, foi usado para descrever as características de expansão do leito.

As características de expansão do leito para Streamline Q XL com extrato bruto de C-ficocianina contendo células e com tampão fosfato de sódio 0,025M pH 7,5 como meios de fluidização estão apresentadas na Figura 3.1.

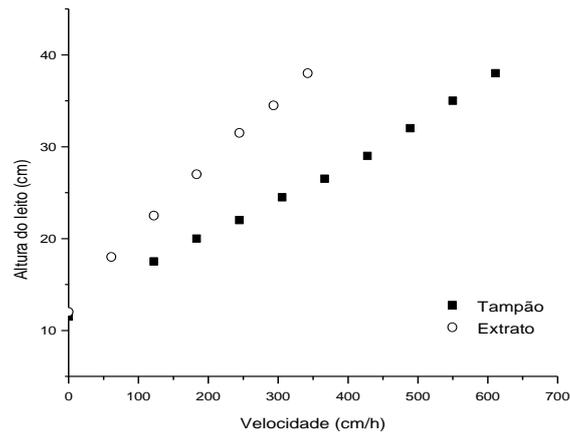


Figura 3.1: Altura de expansão do leito em função da velocidade superficial.

Verificou-se uma expansão do leito maior quando se aplicou extrato não clarificado. Assim, para uma mesma velocidade linear aplicada, a altura atingida pela resina, ao trabalhar-se com caldo bruto, será maior que quando aplicada uma solução tampão.

A Figura 3.2 apresenta o gráfico do Ln da velocidade linear pelo Ln da porosidade. Para tal, foi considerada a porosidade do leito fixo como sendo 0,4 (Chang e Chase, 1996). Através do coeficiente angular, se obtém o valor do expoente de Richardson-Zaki e, a partir do coeficiente linear, se obtém a velocidade terminal (U_t).

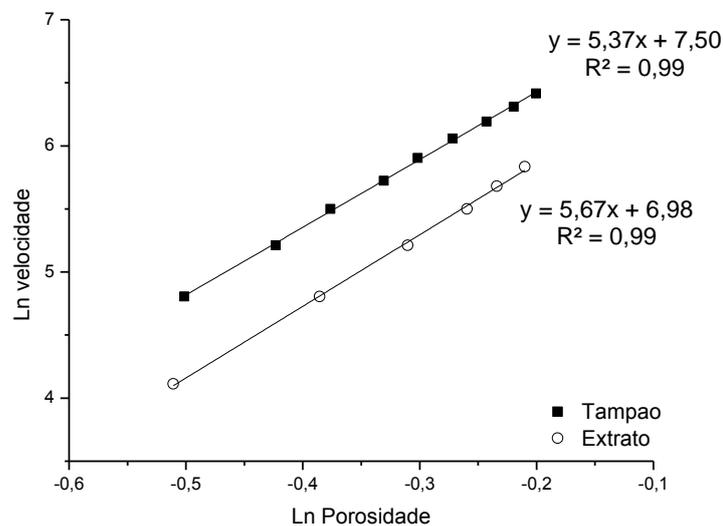


Figura 3.2: Logaritmo natural da velocidade versus logaritmo natural da porosidade para tampão 0,025M pH 7,5 e extrato de C-ficocianina não clarificado.

Os valores experimentais para a velocidade terminal foram 1806 cm/h e 1074 cm/h e o parâmetro n de Richardson-Zaki foi 5,37 e 5,67 para a solução tampão e extrato não clarificado, respectivamente. O alto coeficiente de correlação das equações sugere que a equação de Richardson-Zaki é um bom modelo para prever o comportamento

hidrodinâmico das partículas do adsorvente em sistemas de leito expandido, até mesmo quando o fluidizador contém grandes quantidades de material biológico suspenso (Biazus et al., 2006). Valores de n entre 5,3 e 5,8 foram reportados por Chang e Chase (1996) e Kalil et al., (2005).

Chang e Chase (1996) observaram que a velocidade terminal diminui e n aumenta conforme a densidade e viscosidade da solução de trabalho. Este fato também foi observado no presente trabalho. Em geral, soluções protéicas contendo células são mais densas e viscosas que soluções salinas como tampões.

4.2 Comparação das curvas de ruptura com célula e sem célula

Foram feitas duas curvas de ruptura, uma com extrato bruto de C-ficocianina clarificado e outra com extrato contendo células, a fim de verificar a influência do material celular na performance de adsorção. As curvas de ruptura foram feitas no grau de expansão 3,0 e estão apresentadas na Figura 3.3.

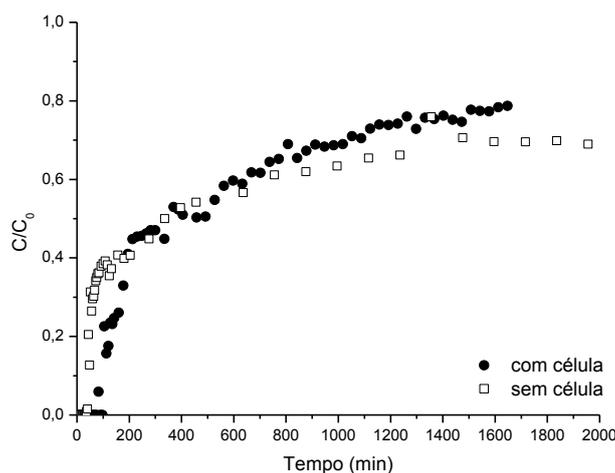


Figura 3.3: Adsorção de C-ficocianina em leito expandido em resina Streamline Q XL: curvas de ruptura construídas com extrato clarificado e não clarificado.

As curvas de ruptura para os extratos clarificado e não clarificado apresentaram comportamento muito semelhante, indicando que a performance de adsorção foi praticamente a mesma em ambos os casos, o que significa que as células em suspensão provavelmente não ocupam os sítios de adsorção da resina, e portanto, não há necessidade de um termo adicional de adsorção de células ao modelo matemático.

4.2 Estimativa de parâmetros e simulação do modelo

Em modelagem do processo de adsorção é usual estimar os parâmetros cinéticos (q_m , k_1 , e k_2) através de regressão não linear e correlações empíricas para calcular os parâmetros de transporte (D_l , k_f , e ϵ) para simular o processo em leito fixo ou expandido. Na

maioria dos casos, o modelo tem uma boa performance, ajustando-se bem aos dados experimentais. Entretanto, em algumas simulações feitas com extrato bruto, este processo tem mostrado muitos desvios entre o modelo e os dados experimentais (Moraes et al., 2009).

A estimativa dos parâmetros do presente trabalho foi feita usando o algoritmo PSO, que em geral apresenta bons resultados, apresentando um conjunto de parâmetros como o ótimo do processo. Para tal utilizou-se 3 curvas de ruptura experimentais, em diferentes graus de expansão. As curvas de ruptura foram feitas com extrato bruto de C-ficocianina contendo células, nas velocidades superficiais de 95, 160 e 230 cm/h, equivalentes a aproximadamente 10, 15 e 20 mL/min, para os graus de expansão 2,0, 2,5 e 3,0, respectivamente. Idealmente, um grupo de parâmetros ótimo deve existir, mas a redução de dados realista não pode produzir um único conjunto de parâmetros, mesmo usando um método de estimativa de parâmetros com características globais, como o PSO. Os valores dos parâmetros encontrados pelo modelo estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Parâmetros estimados pelo algoritmo PSO para os três graus de expansão.

Parâmetros	Grau de Expansão (GE)		
	2,0	2,5	3,0
k_1 (mL/mg.s)	$1,65 \times 10^{-3}$	$3,46 \times 10^{-4}$	$3,71 \times 10^{-4}$
k_2 (1/s)	$7,99 \times 10^{-3}$	$2,24 \times 10^{-3}$	$2,63 \times 10^{-4}$
q_m (mg/mL)	67,27	57,09	55,32
D_1 (m ² /s)	$4,19 \times 10^{-5}$	$5,29 \times 10^{-5}$	$7,44 \times 10^{-5}$
ϵ	0,51	0,67	0,66
k_f (m/s)	0,292	0,438	0,855

Na literatura não existem valores reportados para os parâmetros estimados. No entanto, o valor de q_m é maior que o observado no reator de mistura, para adsorção de extrato clarificado C-ficocianina na mesma resina (Artigo 2). Embora exista pouca bibliografia que apresente os valores de q_m em reator de mistura e em leite expandido, Moraes et al. (2009) já haviam observado este comportamento, e ele acontece porque no leite expandido o comportamento é semelhante a reatores de mistura em série ou reator tubular.

A Figura 3.4 apresenta os resultados relativos ao processo de simulação da adsorção de C-ficocianina, de acordo com o modelo proposto, com os parâmetros estimados apresentados na Tabela 3.1 e a média dos resultados experimentais das curvas de ruptura, feitas em duplicata, para cada grau de expansão. As curvas de ruptura simuladas apresentaram bom ajuste aos dados experimentais até o nível de 80% das curvas de

rupturas. Observa-se, entretanto, que o equilíbrio não foi alcançado, em nenhum grau de expansão estudado, pois a concentração de saída não atinge o valor da de entrada, mas fica em aproximadamente em 80% deste valor. Comportamento semelhante a este foi observado por Tong et al. (2003) com relação a adsorção de albumina bovina (BSA) em resina de troca iônica Streamline DEAE em leito expandido. Tais autores comentam que é possível que as moléculas de BSA formem dímeros na coluna, o que resultaria numa adsorção adicional, que não é estimada pelo modelo de Langmuir. Além disso, sugerem que a porosidade e a dispersão axial não são iguais ao longo da coluna, o que pode levar a pequenos erros ao ajuste do modelo matemático. Yun et al. (2005) também estudando a adsorção de BSA em Streamline DEAE em leito expandido, observando os mesmos desvios no modelo após 80% da curva de ruptura, atribuíram a falta de ajuste à distribuição do tamanho de partícula e da porosidade, consideradas constantes ao longo de todo o leito no modelo.

No caso da adsorção de extrato não clarificado de C-ficocianina, outro fato deve ser salientado: a grande quantidade de material em suspensão. Anspach et al. (1999) comentam que as células e pedaços de células podem formar agregados, em função da carga presente nelas, o que causa problemas ao comportamento hidrodinâmico do leito. Além disso, é possível que estes agregados acabem por bloquear a entrada da coluna, causando turbulência na parte inferior do leito, mudanças no perfil de adsorção e até colapso do leito. Em testes preliminares, onde concentrações maiores de biomassa foram alimentadas à coluna, o colapso do leito foi observado após poucos minutos de alimentação.

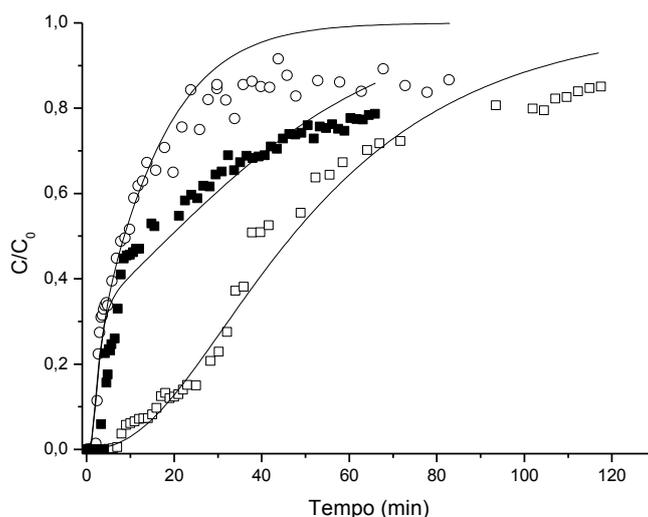


Figura 3.4: Curvas de ruptura para adsorção de C-ficocianina em leito expandido na concentração de 1,5 mg/mL, $H_0=10$ cm, nos graus de expansão de 2,0 (\square), 2,5 (\circ) e 3,0 (\blacksquare) e curvas simuladas pelo modelo (—).

Para avaliar os resultados, o cálculo de q (capacidade de adsorção) e da eficiência global de coluna e de processo para cada curva de ruptura e simulação foram feitos, e os resultados estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Capacidades de adsorção (q) e eficiências experimentais e preditas para adsorção de C-ficocianina em coluna de leito expandido.

	10% de saturação (processo)		80% de saturação (coluna)		
	Experimental	Predito	Experimental	Predito	
GE 2,0	q (mg/mL)	4,6	5,2	15,7	14,0
	Eficiência global(%)	96,4	96,7	50,1	60,3
GE 2,5	q (mg/mL)	1,2	1,0	6,0	5,4
	Eficiência global(%)	99,1	97,0	45,5	48,6
GE 3,0	q (mg/mL)	3,1	1,9	20,1	12,7
	Eficiência global(%)	98,0	96,7	40,6	45,6

A Tabela 3.2 confirma o bom ajuste do modelo aos dados experimentais, uma vez que os valores obtidos nos experimentos e os preditos pelo modelo estão de acordo. É possível observar também que no grau de expansão 2,0 o valor de q é maior, tanto para 10% quanto para 80%, que nos demais graus de expansão, o que leva à conclusão de que nessa velocidade a adsorção de C-ficocianina é maior, possivelmente devido ao tempo de contato da proteína com a resina. Nos graus de expansão 2,5 e 3,0 o fluido percorre a coluna em pouco tempo, não sendo assim possível uma adsorção mais eficiente.

Em um processo de adsorção em leito expandido as variáveis que podem ser alteradas são a altura inicial de leito de resina, a velocidade (ligada diretamente ao grau de expansão) e a concentração de amostra, além do pH e temperatura de adsorção. Uma vez que as duas últimas já foram otimizadas em estudos prévios (Artigo 2) e que a concentração da amostra não pode ser aumentada por causa da concentração de material em suspensão, foi feito um estudo da altura inicial de leito. Três simulações, feitas para grau de expansão 2,0, com as alturas iniciais de leito de 15, 20 e 30 cm foram realizadas, de acordo com o modelo matemático proposto. Os resultados de q e eficiência estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Capacidades de adsorção (q) e eficiências nas simulações feitas para GE 2,0 e diferentes alturas inicial de leito.

		10% de saturação (processo)	80% de saturação (coluna)
H ₀ =15 cm	q (mg/mL)	7,7	18,9
	Eficiência(%)	97,3	62,6
H ₀ =20 cm	q (mg/mL)	9,8	21,9
	Eficiência(%)	97,6	64,5
H ₀ =30 cm	q (mg/mL)	13,1	25,7
	Eficiência(%)	97,8	67,6

Com base na Tabela 3.3 observa-se que duplicando a altura inicial do leito (de 15 cm para 30 cm) o valor de q não dobra, aumenta 1,7 vezes e, comparando todos os valores, a progressão é do aumento de aproximadamente 10 mg de C-ficocianina a cada 5 cm a mais na altura de leito. Os processos apresentaram praticamente a mesma eficiência, para todas as alturas de leito avaliadas. No entanto, a vantagem de trabalhar-se com maiores volumes de resina reside no fato do aumento da produtividade, pois com maior volume de resina é possível trabalhar com maiores volumes de extrato bruto. O processo de adsorção é, portanto, robusto e permite trabalhar numa faixa ampla de altura de leito.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou o uso e aplicabilidade da modelagem matemática para prever as curvas de ruptura da adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline Q XL em coluna de leito expandido, usando extrato bruto contendo células. O modelo se ajustou bem aos dados experimentais para o procedimento de estimativa de parâmetros e simulação.

A condição de adsorção de extrato bruto não clarificado de C-ficocianina que se mostra mais vantajosa para uma maior produtividade, é quando se alimenta o extrato até atingir 10% de saturação da resina, em grau de expansão 2,0, com uma altura inicial de leito de 30 cm.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amersham Biosciences. *Instructions*.2002. Catálogo.

Anspach, F.B.; Curbelo, D.; Hartmann, R.; Garke, G.; Deckwer, W-D. (1999), Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *Journal of Chromatography A*, v.865, p. 129-144.

Bermejo, R.; Felipe, M. A.; Talavera, E. M.; Alvarez-Pez, J. M. (2006), Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. *Chromatographia*, v. 63, p. 59-66.

Biazus, J.P.M.; Severo Jr., J.B.; Santana, J.C.C.; Souza, R.R.; Tambourgi, E.B. (2006). Study of amylases recovery from maize malt by ion-exchange expanded bed chromatography. *Process Biochemistry*, v.41, p.1786-1791.

Chang, Y. K.; Chase, H. A. (1996), Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: the effect of degree of bed expansion on adsorption performance. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 2, p. 512-525.

Deuflhard E.; Hairer E.; Zugck J. (1987), One step and extrapolation methods for differential-algebraic systems. *Numerische Mathematik*, v. 51, p. 501-516.

Eriksen, N.T. (2008), Production of phycocyanin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, p. 1-14.

Estrada, J. E. P.; Bescós, P. B.; Fresno, A. M. V. (2001), Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *IL Farmaco*, v. 56, p. 497-500.

Jungbauer, A. (2005), Chromatographic media for bioseparation. *Journal of Chromatography A*, v.1065, p.3-12.

Kaczmariski, K.; Bellot, J-C. (2005), Influence of particle diameter distribution on protein recovery in the expanded bed adsorption process. *Journal of Chromatography A*, v. 1069, p. 91-97.

Kalil, S. J.; Maugeri-Filho, F.; Rodrigues, M. I. (2005). Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an intracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 581-586.

Ling, T. C.; Loong, C. K.; Tan, W. S.; Tey, B. T.; Abdullanh, W. M. W.; Ariff, A. (2004), Purification of filamentous bacteriophage M13 by expanded bed anion exchange chromatography. *The Journal of Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 228-232.

Moraes, C. C.; Burkert, J. F. M.; Kalil, S. J. (2010), C-phycocyanin extraction process for large-scale use. *Journal of Food Biochemistry*. (in press)

Moraes, C.C.; Mazutti, M.A.; Rodrigues, M.I.; Maugeri, F.; Kalil, S.J. (2009), Mathematical modeling and simulation of inulinase adsorption in expanded bed column. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p.4395-4401.

Nayak, D. P. (2001), Studies of Protein Purification on Expanded Bed. *Doctor of Philosophy in Biotechnology*. University of Pune, Índia.

- Niu, J-F.; Wang, G-C.; Lin, X-z.; Zhou, B-C. (2007), Large-scale recovery of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 850, p. 267-276.
- Pai, A.; Gondkar, S.; Sundaram, S.; Lali, A. (1999), Expanded bed adsorption on supermacroporous cross-linked cellulose matrix, *Bioseparation*, Netherlands, v. 8, p. 131-138.
- Patil, G.; Raghavarao, K. S. M. S. (2007), Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin. *Biochemical Engineering Journal*, v. 34, p. 156-164.
- Reddy, C. M.; Subhashini, J.; Mahipal, S. V. K.; Bhat, V. B.; Reddy, P. S.; Kiranmai, G. Madyastha, K. M.; Reddanna, P. (2003), C-phycoyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 304, p. 385-392.
- Richardson, J. F.; Zaki, W. N. (1954), Sedimentation and fluidization: part I. *Transactions Institute Chemical Engineering*, v. 32, n. 1, p. 35-53.
- Romay, C.; Remírez, D.; González, R. (2001), Actividad antioxidante de la ficocianina frente a radicales peroxílicos y la peroxidación lipídica microsomal. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, v. 20, p. 38-41.
- Schwaab, M.; Biscaia, E. C.; Monteiro, J. L.; Pinto, J. C. (2008), Nonlinear parameter estimation through particle swarm optimization. *Chemical Engineering Science*, v. 63, p. 1542-1552.
- Soni, B.; Kalavadia, B.; Trivedi, U.; Madamwar, D. (2006), Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India, *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2017-2023.
- Tong, X-D; Xue, B.; Sun, Y. (2003), Modeling of expanded bed protein adsorption by taking into account axial particle size distribution. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, p. 265-272.
- Xia, H-F.; Lin, D-Q.; Yao, S-J. (2007), Evaluation of new high-density ion exchange adsorbents for expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1145, p. 58-66.
- Yun, J.; Lin, D. Q.; Yao, S. J. (2005), Predictive modeling of protein adsorption along the bed height by taking into account the axial nonuniform liquid dispersion and particle classification in expanded beds. *Journal of Chromatography A*, v. 1095, p. 16-26.

Artigo 4

Purificação de extrato de C-ficocianina na presença de células por cromatografia de troca iônica em leito expandido

(Purification of an extract of C-phycoyanin in the presence of cells using expanded bed ion exchange chromatography – Artigo submetido para o periódico Separation and Purification)

Purificação de extrato de C-ficocianina na presença de células por cromatografia de troca iônica em leite expandido

Caroline Costa Moraes¹, Susana Juliano Kalil¹

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos
Caixa Postal 475 – 96201-900 Rio Grande – RS

RESUMO

C-ficocianina é um corante natural azul que pode ser extraído de cianobactérias como *Spirulina platensis*. A purificação de extrato bruto C-ficocianina contendo células foi avaliada neste artigo, através de cromatografia de troca iônica em leite expandido. A etapa de eluição foi estudada, objetivando-se sua otimização através de um delineamento composto central rotacional (DCCR), sendo as variáveis independentes pH e volume de eluição tendo como respostas a concentração, o rendimento e a recuperação. A avaliação das curvas de contorno indicam que a faixa de trabalho que satisfaz todas as respostas é em pH ao redor de 6,5 e volumes próximos a 150 mL. Tais condições permitiram a obtenção de C-ficocianina com pureza 1,62 (A_{620}/A_{280}), concentração 2,35 mg/mL, com um rendimento e recuperação de 40 mg/g e 67%, respectivamente. Observou-se pelos cromatogramas que a C-ficocianina não foi eluída em baixas concentrações de NaCl, portanto fez-se um novo experimento, nas melhores condições estabelecidas pelo DCCR, contendo uma etapa de pré-eluição com 0,1M de NaCl. Esta alteração permitiu aumentar a pureza para 2,9 (1,8 vezes a anteriormente alcançada), concentração 3 mg/mL, sem mudança significativa no rendimento e recuperação.

Palavras-chave: Leite expandido, Troca iônica, Purificação, Ficocianina, Otimização, Eluição

1. INTRODUÇÃO

Corantes empregam um papel especial nos alimentos que irão ser consumidos. Normalmente criam uma expectativa fisiológica e psicológica e as atitudes são desenvolvidas pela experiência e tradição que o consumidor possui de determinado produto. Sendo as crianças os principais consumidores de alimentos e guloseimas artificialmente coloridos, o crescimento da consciência da importância de corantes naturais, especialmente de alimentos e cosméticos, tem ocupado uma grande demanda de fontes naturais e biológicas de corantes (Sarada et al., 1999). Cianobactérias e algas possuem uma ampla variedade de componentes coloridos como carotenóides, clorofila e ficobiliproteínas (Sarada et al., 1999). Espécies do gênero *Spirulina* são fontes não dispendiosas de ficobiliproteínas (Minkova et al., 2003), além de possuir certificado GRAS (Generally Recognized as Safe), permitindo seu uso em alimentos.

Ficocianina é um pigmento de coloração azul, da família das ficobiliproteínas, que pode ser isolado como complexo proteína-pigmento, já que é uma proteína solúvel em água e possui fluorescência (Abalde et al., 1998). Quando purificadas, ficobiliproteínas podem ser usadas como corantes em alimentos e mais amplamente para técnicas de fluorescência como citometria, imunoenaios fluorescentes e microscopia (Viskari & Colyer, 2003). Seu uso tem sido citado também por suas propriedades terapêuticas pela atividade imunológica e atividade anticarcinogênica (Román et al., 2002) e também possui propriedade antioxidante, anti-artrite e anti-inflamatória (Pardhasaradhi et al., 2003).

A razão de pureza é dada pela relação entre a absorção máxima visível e a absorção a 280, quando esta é superior a 4,0, ficocianina apresenta grau analítico, no entanto, quando este valor é superior a 0,7, este pigmento pode ser utilizado como um biocorante na indústria de alimentos e cosméticos (Abalde et al., 1998; Patil et al., 2006).

A bioseparação de proteínas, que se refere à recuperação e purificação de produtos protéicos, oriundos de várias correntes biológicas de obtenção, é uma importante operação unitária na indústria de alimentos, farmacêutica e biotecnológica. Anspach et al. (1999) consideram que a cromatografia de troca iônica é a tecnologia mais largamente utilizada no preparo de proteínas seja em escala de laboratório ou de produção. A recuperação da atividade biológica é usualmente excelente. As razões para o sucesso da troca iônica são a sua ampla aplicabilidade, seu alto poder de resolução, sua alta capacidade e a simplicidade e controlabilidade deste método. A troca iônica pode ser utilizada em um leito fixo (geralmente para pequena escala) e em leito expandido.

A adsorção em leito expandido envolve etapas de clarificação, concentração e purificação em uma única operação. O uso de adsorventes com densidade controlada permite obter um leito estável, com cada partícula mantendo uma posição discreta no leito

com um pequeno movimento circular. Deste modo, este processo, comparado ao leite fluidizado, apresenta uma maior capacidade de adsorção, com o leite expandido se comportando como um reator tubular durante a aplicação da alimentação (Hu et al., 2001, Snow, 1994).

A purificação de C-ficocianina utilizando colunas de leite expandido já foi anteriormente reportada por Niu et al. (2007) e Bermejo et al. (2006). Embora esses autores tenham utilizado técnicas cromatográficas diferentes, sendo o primeiro cromatografia de interação hidrofóbica e o segundo cromatografia de troca iônica, em nenhum artigo foi estudado a purificação de um extrato bruto não clarificado. Além disso, estes, bem como a maior parte dos artigos relacionados à purificação em leite expandido, enfocam mais particularmente o perfil hidrodinâmico do leite ou particularidades da resina utilizada (Biazus et al., 2006, Lin et al., 2004, Bruce e Chase, 2001), e não na otimização da adsorção ou eluição.

Com base no exposto acima, o objetivo deste trabalho foi purificar C-ficocianina de *Spirulina platensis* através do uso de cromatografia de troca iônica em leite expandido, e estudar a etapa de eluição visando maximizar o rendimento e a recuperação deste bioproduto, sem diluição do mesmo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Biomassa

A biomassa utilizada foi a cianobactéria *Spirulina platensis* LEB 52, cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG. A biomassa foi seca, congelada e moída e estocada a -18°C para utilização nos experimentos de cromatografia de troca iônica em leite expandido.

2.2 Extração de C-ficocianina

A biomassa de *Spirulina platensis* seca, congelada e moída foi adicionada ao solvente extrator conforme Moraes et al.(2010), na concentração de 160g/L. Após a extração, o caldo bruto contendo células foi diluído e ajustado o pH em 7,5.

2.3 Adsorvente

Foi utilizado um adsorvente constituído de matriz macroporosa de agarose, com núcleo de quartzo. Este adsorvente, Streamline Q XL® (GE Healthcare), que é um trocador aniônico forte (Amersham Biosciences, 2002), possui uma faixa de pH de trabalho entre 2 e 13 e promove graus de expansão do leite de 2 a 3 vezes.

2.4 Purificação de C-ficocianina

Para os experimentos de purificação foi utilizada uma coluna Streamline™ 25 (D.I 2,5 cm x 100 cm de altura). A coluna foi preenchida com 50 mL de resina Streamline Q XL, resultando em uma altura total de leito de 10 cm em todos os experimentos. A resina foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,5 a uma velocidade de 180 cm/h em fluxo ascendente, o que proporcionou um grau de expansão (GE) de 2 vezes (20 cm de leito). Em todos os ensaios, 145 mL do extrato de C-ficocianina foram alimentados em fluxo ascendente a uma velocidade 88 cm/h, mantendo um GE de 2,0. Após a lavagem, realizada com 1000 mL de tampão fosfato de sódio 25mM em pH de trabalho em modo expandido, a vazão foi interrompida e o leito de resina foi sedimentado até 10 cm. O adaptador foi movido até a posição 10 cm e a eluição foi feita em modo fixo e em fluxo descendente, sob condições de pH e volume estabelecidas pelo delineamento composto central rotacional (Tabela 4.1). Frações de 10 mL foram coletadas ao longo do experimento. Para cada fração foram calculadas a concentração de C-ficocianina (C-FC) e a pureza (PE), conforme as Equações 1 e 2, respectivamente:

$$C - FC = \frac{(A_{620} - 0,474 A_{652})}{5,34} \quad (1)$$

$$PE = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (2)$$

As frações eluídas que apresentaram valores de PE maiores que 0,7 foram usadas para avaliar a recuperação (Eq. 3) e o rendimento (Eq. 4) da etapa de eluição.

$$\% \text{ Recuperação} = \sum \frac{(\text{C-FC recuperada na eluição} \times \text{Volume})}{\text{C-FC inicial} \times \text{Volume inicial}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Rendimento (mg/g)} = \sum \frac{\text{mg de C-FC das frações recuperada na eluição}}{\text{g de biomassa utilizada na extração}} \quad (4)$$

2.5 Eletroforese (SDS-PAGE)

Utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel utilizado continha 12,5% de poliacrilamida e espessura de 0,75 mm. As amostras foram pré-incubadas com 10% (p/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol, 20% (v/v) e β-mercaptoetanol, 0,02% (p/v) de azul de bromofenol e 0,15 M de tampão Tris-HCl, pH 6,8, por 5 min a 95°C. As amostras correram à temperatura ambiente e a revelação do gel foi feita com nitrato de prata. As seguintes proteínas foram usadas como marcadores moleculares (kDa): fosforilase b (94,0), albumina (67,0), ovoalbumina (43,0), anidrase carbônica (30,0), inibidor de tripsina (20,0) e α-lactoalbumina (14,4). C-ficocianina comercial (Sigma) foi utilizada como padrão.

2.6 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Para obter a otimização da etapa de eluição, foi feito um DCCR 2^2 com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios, conforme Rodrigues e lemma (2005). As variáveis estudadas foram pH e volume de eluição, que variaram conforme a Tabela 1, e as respostas consideradas foram concentração, rendimento de eluição e recuperação de C-ficocianina. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* Statistica 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos ensaios de purificação, as etapas de equilíbrio e alimentação da amostra foram iguais para todos os ensaios do planejamento experimental. Como a viscosidade do caldo bruto de C-ficocianina contendo células era diferente da viscosidade do tampão, uma menor velocidade foi necessária para promover o mesmo grau de expansão.

Após a etapa de adsorção, a resina foi lavada para retirada das células remanescentes e das proteínas não adsorvidas. Esta etapa foi feita utilizando o pH correspondente ao de cada ensaio de eluição, para que no momento da eluição o possível gradiente de pH não interferisse no processo de dessorção. Os resultados dos ensaios de eluição procederam conforme a Tabela 4.1, apresentada abaixo.

Tabela 4.1: Valores reais (em parênteses) e codificados para o DCCR e resultados para concentração, rendimento e recuperação de C-ficocianina.

Ensaio	X_1	X_2	Concentração (mg/mL)	Rendimento (mg/g)	Recuperação (%)
1	-1 (5,5)	-1 (250)	1,34	38,73	72,34
2	1 (7,5)	-1 (250)	1,67	39,76	69,80
3	-1 (5,5)	1 (750)	0,48	46,13	77,29
4	1 (7,5)	1 (750)	0,79	33,60	50,44
5	-1,41(5,1)	0 (500)	1,01	39,70	67,31
6	1,41(7,9)	0 (500)	0,92	31,34	50,59
7	0 (6,5)	-1,41(150)	2,35	40,04	66,89
8	0 (6,5)	1,41(850)	0,75	49,55	71,56
9	0 (6,5)	0 (500)	0,92	42,22	67,77
10	0 (6,5)	0 (500)	0,95	43,81	70,08
11	0 (6,5)	0 (500)	0,98	44,81	68,83

X_1 = pH e X_2 = Volume de eluição

Uma análise de variância foi realizada para as resposta Concentração, Rendimento e Recuperação e os resultados estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis Rendimento (Rend), Recuperação (Rec) e Concentração (C-FC).

Fonte de variação	SQ			GL			MQ			F teste		
	Rend	Rec	C-FC	Rend	Rec	CF	Rend	Rec	C-FC	Rend	Rec	C-FC
Regressão	255,55	625,65	2,420	4	3	4	63,89	208,55	0,605	15,69	14,11	16,10
Resíduo	24,42	103,49	0,225	6	7	6	4,07	14,78	0,038			
Falta de ajuste	21,01	100,80	0,223	4	5	4	5,25	20,16	0,056			
Erro puro	3,41	2,68	0,002	2	2	2	1,70	1,34	0,001			
Total	279,98	729,14	2,645	10	10	10	27,99	72,91	0,265			

Rendimento e Concentração: $F_{0,90; 4; 6} = 5,34$

Recuperação: $F_{0,90; 3; 7} = 3,07$

Utilizando a Tabela 4.2, é possível obter o valor de F calculado por F tabelado ($F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$), a 90% de confiança, que foi 3,75 ($R^2=0,91$), 3,01 ($R^2= 0,91$) e 4,79 ($R^2= 0,86$), para rendimento, recuperação e concentração, respectivamente, indicando que o modelo obtido é preditivo e significativo com uma significância de 0,1. As equações codificadas, que descrevem o modelo, estão apresentadas pelas Equações 5, 6 e 7 e as superfícies de resposta e curvas de contorno relativas a esse modelo estão apresentadas na Figura 4.1.

$$\text{Concentração} = 0,95 + 0,06 X_1 - 0,04 X_1^2 - 0,50 X_2 + 0,25 X_2^2 \quad (5)$$

$$\text{Rendimento} = 44,03 - 2,92 X_1 - 4,35 X_1^2 + 1,84 X_2 - 3,39 X_1 X_2 \quad (6)$$

$$\text{Recuperação} = 69,84 - 6,64 X_1 - 4,44 X_1^2 - 6,08 X_1 X_2 \quad (7)$$

Os modelos mostram que o volume de eluição é mais significativo para a concentração e o rendimento do que para a recuperação. A Tabela 4.1 mostra que a concentração variou entre 0,48 e 2,35 mg/mL, o rendimento variou entre 31,3 e 49,5 mg/g enquanto a recuperação variou entre 50,4 e 77,3%.

Com base na Figura 4.1, pode-se observar que a faixa de valores maiores de rendimento e recuperação são encontrados próximos ao pH 5,1 e no maior volume de eluição estudado (850 mL). Em contrapartida, a concentração é reduzida em até 80% quando o volume é aumentado. Dessa forma, a otimização da etapa de eluição torna-se difícil, uma vez que maiores recuperações implicam em menores concentrações. Neste trabalho deseja-se um produto mais concentrado, uma vez que um corante para uso na indústria alimentícia não pode ser muito diluído, pois acarretaria na adição de grandes volumes na amostra. Estas perdas na concentração podem ser evitadas, trabalhando-se com menores volumes de eluição (200-150 mL) se a esta for feita em pH 6,5, uma vez que as perdas no rendimento e recuperação, comparadas com volume de 850 mL, não chegam a 15%. Estas condições correspondem ao ensaio 7 (pH 6,5 e volume de eluição 150 mL).

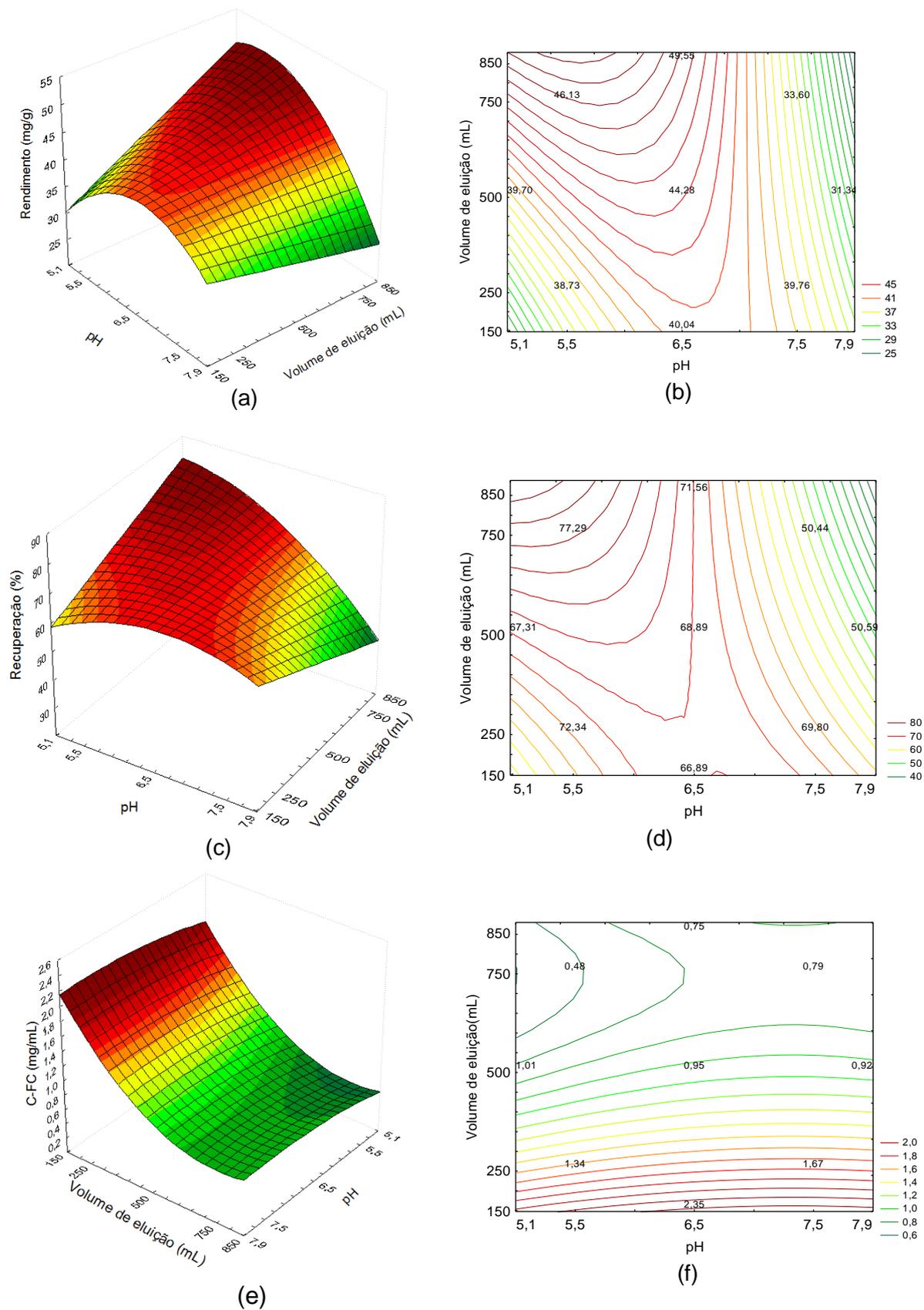


Figura 4.1: Superfície de resposta e curvas de contorno para (a, b) Rendimento, (c, d) Recuperação e (e, f) Concentração.

No presente estudo, C-ficocianina foi obtida com uma pureza de 1,62 (um aumento de 3,2 vezes quando comparado ao extrato inicial), concentração 2,35 mg/mL, rendimento de 40 mg/g e recuperação em torno de 67%, no ensaio 7. Para validar estes resultados, as condições do ensaio 7 foram aplicadas novamente, em triplicata, e os resultados foram comparados. As respostas obtidas nestes ensaios para concentração, pureza, rendimento e recuperação apresentaram uma porcentagem de variação inferior a 6%. A Figura 4.2 apresenta o cromatograma de um destes ensaios, e observa-se que 10, das 15 frações coletadas durante a eluição, apresentaram pureza superior a 0,7, correspondendo a 67% de recuperação.

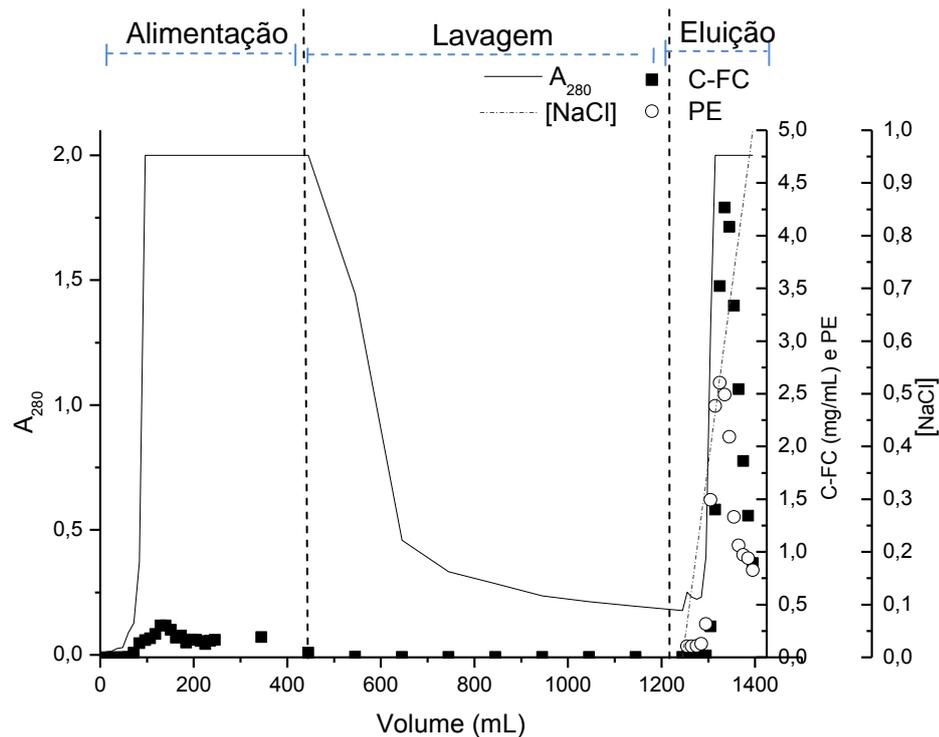


Figura 4.2: Cromatograma do processo de purificação de C-ficocianina, com eluição feita em gradiente linear salino 0-1M em 150 mL, pH 6,5.

Niu et al. (2007) relatam que com o uso do leito expandido muitas das operações unitárias realizadas com o objetivo de concentrar a amostra e isolamento parcial, como precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de permeação em gel, que são comuns nos protocolos de purificação usuais, são eliminadas. Além disso, segundo os autores um ciclo típico de purificação por ALE que inclui equilíbrio (20-40 min), alimentação (30-40 min), lavagem (60-80 min) e eluição (30-120 min), levam em geral de 2,5 a 3,5 horas. Neste trabalho o tempo total foi cerca de 2,3 horas.

Bermejo et al. (2006) estudaram a purificação de extrato bruto de C-ficocianina sem a presença de células através de cromatografia de troca iônica em leito expandido, e obtiveram C-ficocianina 3 vezes mais purificada que o extrato inicial, com recuperação variando entre 60-80%. Niu et al. (2007) usaram cromatografia de interação hidrofóbica em

leito expandido para purificar caldo clarificado C-ficocianina, e obtiveram um produto 4 vezes mais puro que o caldo inicial, com recuperação de 35% e rendimento de 31 mg/g. Em um estudo de purificação, a recuperação é inversamente proporcional à pureza, e deve-se então estabelecer um critério de pureza e a partir deste, otimizar o processo para obter um máximo de recuperação (Wheelwright, 1989). No presente estudo, se forem consideradas somente as frações mais purificadas, é possível obter C-ficocianina com incremento de 4 vezes na pureza, com uma recuperação ao redor de 50%.

Com o critério de pureza adotado, os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados na literatura. Entretanto, Moraes e Kalil (2009) reportam que é possível combinar a eluição na forma de gradiente linear salino com a eluição tipo degrau, e promover uma melhor resolução do processo no que diz respeito à pureza do produto alvo. Dessa forma, um novo experimento foi realizado, com as mesmas condições do ensaio 7, mas com uma etapa de pré-eluição com 100 mL (2 volumes de leito) de solução salina 0,1M de NaCl em tampão fosfato de sódio 0,025M, pH 6,5. Neste ensaio, a pré-eluição promoveu a remoção de algumas proteínas contaminantes adsorvidas fracamente na resina, conforme pode ser observado na Figura 4.3, o que conduziu a um aumento da pureza do eluato de C-ficocianina. Ao final deste experimento, obteve-se C-ficocianina com concentração de 3 mg/mL, pureza de 2,9 (um incremento de 4,6 quando comparado ao extrato inicial), recuperação de 60% e rendimento de 40 mg/g.

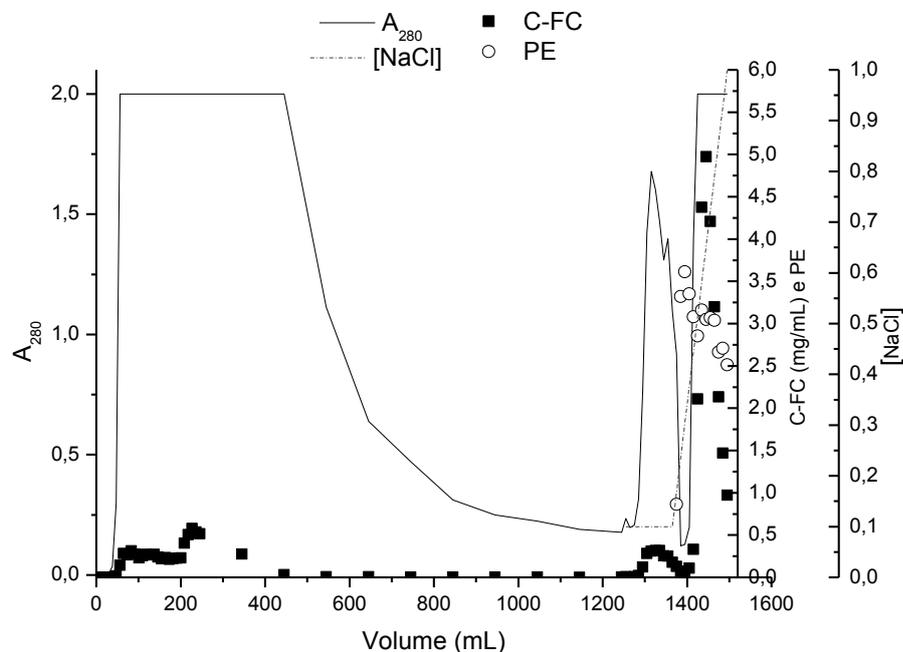


Figure 4.3: Cromatograma da purificação de C-ficocianina em leito expandido com resina Streamline Q XL usando eluição tipo degrau, com 0,1M de NaCl, combinado com gradiente linear salino (0 -1 M) em 150 mL.

A presença de C-ficocianina foi confirmada pela eletroforese, conforme apresentado na Figura 4.4. Amostra do extrato bruto (coluna 3) e purificado (coluna 4) foram comparadas com C-ficocianina comercial (coluna 2). Bermejo et al. (2006) e Niu et al. (2007) comentam que as subunidades α e β de C-FC e C-AFC possuem massa molecular muito parecidas (21,5 e 19,0 kDa, e 19,6 e 17,7 kDa, respectivamente). Conseqüentemente, sua mobilidade em SDS-PAGE é muito similar e é difícil distingui-las por esse método. Entretanto, a Figura 4.4 mostra que algumas proteínas contaminantes foram removidas, quando compara-se a linha 3 (antes da ALE) e a linha 4 (depois da ALE).

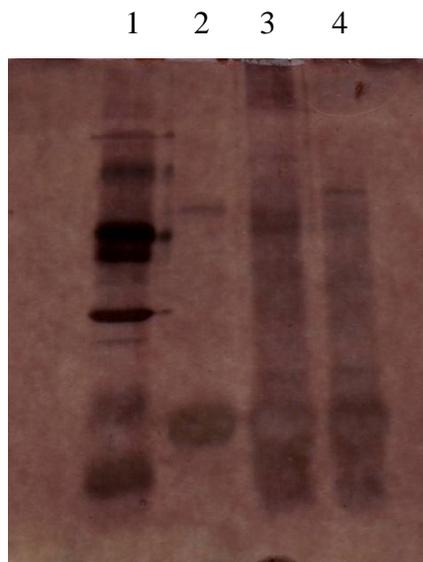


Figura 4.4: Caracterização de diferentes soluções de proteínas por SDS-PAGE. Coluna 1 = Marcador molecular, Coluna 2= C-ficocianina comercial, Coluna 3= extrato bruto de C-ficocianina, Coluna 4 = eluato após ALE.

Assim, este trabalho apresenta resultados iguais ou superiores aos anteriormente publicados, mas com o diferencial de usar extrato não clarificado de C-ficocianina, o que justifica a escolha de leito expandido para purificação, e ainda elimina etapas de clarificação como centrifugação, que além de diminuir a produtividade, é uma etapa dispendiosa no processo industrial.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abalde, J.; Betancourt, L.; Torres, E.; Cid, A. e Barwell, C. (1998), Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*, v. 136, p. 109 – 120.

Anspach, F.B.; Curbelo, D.; Hartmann, R.; Garke, G.; Deckwer, W-D. (1999), Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *Journal of Chromatography A*, v.865, p. 129-144.

Bermejo, R.; Felipe, M. A.; Talavera, E. M.; Alvarez-Pez, J. M. (2006), Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. *Chromatographia* v. 63, p. 59-66.

Biazus, J.P.M.; Severo Jr., J.B.; Santana, J.C.C.; Souza, R.R.; Tambourgi, E.B. (2006). Study of amylases recovery from maize malt by ion-exchange expanded bed chromatography. *Process Biochemistry*, v.41, p.1786-1791.

Bruce, L. J.; Chase, H. A. (2001), Hydrodynamics and adsorption behaviour within an expanded bed adsorption column studied using in-bed sampling. *Chemical Engineering Science*, v.56, p.3149-3162.

Hu, H-B.; Yao, S-J.; Zhu, Z-Q.; Hur, B-K. (2001), Comparison of the adsorption characteristics of expanded bed adsorbent with conventional chromatographic adsorbent. *Korean Journal Chemical Engineering*, v. 18, p. 357-362.

hydrodynamic behavior and Stability of expanded beds. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 87, p. 337-346.

Lin, D-Q; Thömmes, J.; Kula, M-R.; Hubbuch, J.J. (2004), The influence of biomass on the

Minkova, K. M.; Tchernov, A. A.; Tchorbadjieva, M. I.; Fournadjieva, S.T.; Antova, R. E.; Busheva, M. Ch. (2003), Purification of C-phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, v. 102, p. 55-59.

Moraes, C.C.; Kalil, S.J. (2009) Strategy for a protein purification design using C-phycocyanin extract. *Bioresource Technology*, v.100, p.5312-5317.

Moares, C.C.; Burkert, J.F.M; Kalil, S.J. (2010), C-phycocyanin extraction process for large-scale use. *Journal of Food Biochemistry*, (in press)

Niu, J-F.; Wang, G-C.; Lin, X-z.; Zhou, B-C. (2007), Large-scale recovery of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 850, p. 267-276.

Pardhasaradhi, B. V. V.; Mubarak Ali, A.; Leela Kumari, A.; Reddanna, P.; Khar, A. (2003), Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. *Molecular Cancer Therapeutics*. v. 2, p.1165-1170.

Patil, G.; Chethana, S.; Sridevi, A. S.; Reghavarao, K.S.M.S. (2006), Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *Journal of Chromatography A*, v. 1127, p. 76-81.

Rodrigues, M. I.; Iemma, A.F. (2005), *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia sequencial de planejamentos*. Ed. Casa do Pão: Campinas.

Román, B. R.; Pez, J. M. A.; Fernández, F. C. A.; Grima, E. M. (2002), Recovery of pure B-phycoeritrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, v. 93, p. 73-85.

Sarada, R.; Pillai, M. G.; Ravishankar, G. A. (1999), Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 795 – 801.

Snow, U. (1994), Adsorbent reduces primary unit operations for bioprocess recovery. *Genetic Engineering News*, v. 14, p. 320-329.

Viskari, J. P.; Colyer, C. L. (2003), Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical Biochemistry*, v. 319, p. 263-271.

Wheelwright, S.M. (1989), The design of downstream processes for large-scale protein purification. *Journal of Biotechnology*, v.11, p. 89-102.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES

6. CONCLUSÕES GERAIS

Após a realização deste estudo, pode-se concluir que:

- Este trabalho mostrou o uso e aplicabilidade da modelagem matemática para prever as curvas de ruptura da adsorção de inulinase em resina de troca iônica Streamline SP em coluna de leito expandido, usando extrato bruto proveniente da fermentação, usando células. O modelo se ajustou bem aos dados experimentais tanto para o procedimento de estimativa de parâmetros e quanto para a validação;
- Através da modelagem e simulação do processo de adsorção, foi possível verificar que a maior eficiência de adsorção de extrato não clarificado de inulinase em resina Streamline SP em coluna de leito expandido foi obtida quando a concentração de inulinase no extrato fica entre 120 e 170 U/mL e a altura do leito é entre 20 e 30 cm, com grau de expansão 3,0. Também se ressalta que o uso da modelagem matemática associada com a metodologia do planejamento experimental é uma ferramenta útil e promissora para otimização de processos cromatográficos;
- O estudo das condições de adsorção de extrato clarificado de C-ficocianina em resina de troca iônica revelou que a resina Streamline Q XL adsorve mais C-ficocianina que a resina Streamline DEAE nos valores de pH entre 5,5 e 7,5. A maior adsorção foi observada em pH 7,5 e a temperatura não influenciou na adsorção na faixa estudada (5°C a 25°C) quando a resina Streamline Q XL foi utilizada;
- A isoterma de adsorção da C-ficocianina, em pH 7,5 e 25°C feita em reator de mistura, foi descrita pelo modelo de Langmuir, e os valores q_m e K_d estimados a partir da equação linearizada da isoterma, foram de 26,67 mg/mL e 0,067 mg/mL, respectivamente;
- A modelagem matemática da adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline Q XL em leito expandido apresentou bom ajuste aos dados experimentais, mostrando-se uma ferramenta útil para simular o processo de adsorção em condições idealizadas, sem a necessidade de muitos experimentos;
- A condição de adsorção de extrato bruto não clarificado de C-ficocianina em coluna de leito expandido que se mostrou mais vantajosa para uma maior produtividade, é quando se alimenta o extrato até atingir 10% de saturação da resina, em grau de expansão 2,0, com uma altura inicial de leito de 30 cm;

- No estudo de purificação de extrato bruto não clarificado de C-ficocianina através de cromatografia de troca iônica em leite expandido, observou-se que o pH e o volume de eluição interferem na pureza, recuperação e concentração do produto final. A avaliação das curvas de contorno indicam que na faixa de trabalho de pH ao redor de 6,5 e volumes de eluição próximos a 150 mL (equivalente a 3 volumes de leite), é possível obter C-ficocianina com pureza 1,62, concentração 2,35 mg/mL, com um rendimento e recuperação de 40 mg/g e 67%, respectivamente;
- A etapa de pré-eluição num processo de purificação de extrato bruto não clarificado de C-ficocianina mostrou-se importante para o aumento da pureza deste bioproduto. Quando a eluição, no pH e volume otimizados, foi combinada com uma etapa de pré-eluição com 0,1M de NaCl, obteve-se C-ficocianina com pureza de 2,9 (1,8 vezes a anteriormente alcançada sem a pré-eluição), concentração 3 mg/mL, sem mudança significativa no rendimento e recuperação.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão de continuidade deste estudo, tem-se:

- Modelar o processo de adsorção de C-ficocianina em reator de mistura;
- Modelar a eluição de C-ficocianina em coluna de leito expandido no modo fixo;
- Modelar a eluição de inulinase em coluna de leito expandido no modo fixo;
- Realizar um estudo combinando a cromatografia de troca iônica em leito expandido com a etapa de ultrafiltração, e avaliar o incremento na concentração e pureza do extrato;

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFIA GERAL

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde, J.; Betancourt, L.; Torres, E.; Cid, A.; Barwell, C. (1998), Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*, v. 136, p. 109 – 120.
- Alleoni, L.R.F.; Camargo, O.A.; Casagrande, J.C. (1998), Isotermas de Langmuir e de Freundlich na descrição da adsorção de boro em solos altamente intemperizados. *Scientia Agricola*, v.55, p. 379-389.
- Amersham Biosciences. *Instructions*.2002. Catálogo.
- Amersham Pharmacia Biotech. *Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods*. AB Ed. Catálogo, b.
- Amersham Pharmacia Biotech. *Protein Purification Handbook*. 3ª Ed. Catálogo.a.
- Anspach, F.B.; Curbelo, D.; Hartmann, R.; Garke, G.; Deckwer, W-D. (1999), Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *Journal of Chromatography A*, v.865, p. 129-144.
- Antelo, F., Purificação de ficocianina de *Spirulina platensis* através de sistema aquoso bifásico e caracterização cinética da desnaturação térmica. *Dissertação de mestrado*, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 2007.
- Araújo, M.O.D., Adsorção de albumina de soro bovino em resinas trocadoras de íons. *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1996.
- Bak, H.; Thomas, O. R. T.; Abildskov, J. (2007), Lumped parameter model for prediction of initial breakthrough profiles for the chromatographic capture of antibodies from a complex feedstock. *Journal of Chromatography B*, v. 848, p. 131-141.
- Barboza, M.; Almeida, R. M. R. G.; Hokka, C. O. (2002), Intrinsic kinetic parameters of clavulanic acid adsorption by ion-exchange chromatography. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 41, p. 5789-5793.
- Belter, P.A.; Cussler, E.L.; HU, W. *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*. New York: John Wiley & Sons, 1988. 368p.
- Bennett, A.; Bogorad, L. (1973), Complimentary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology*, v. 58, p. 419-435.
- Bermejo, R.; Felipe, M. A.; Talavera, E. M.; Alvarez-Pez, J. M. (2006), Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. *Chromatographia* v. 63, p. 59-66.

- Bhat, V. B.; Madyasatha, K. M. (2001), Scavenging of peroxyntirite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection Against Oxidative Damage to DNA. *Biological and Biophysical Research Communications*. v. 285, p. 262-266.
- Biazus, J.P.M.; Severo Jr., J.B.; Santana, J.C.C.; Souza, R.R.; Tambourgi, E.B. (2006). Study of amylases recovery from maize malt by ion-exchange expanded bed chromatography. *Process Biochemistry*, v.41, p.1786-1791.
- Bruce, L. J.; Chase, H. A. (2001), Hydrodynamics and adsorption behaviour within an expanded bed adsorption column studied using in-bed sampling. *Chemical Engineering Science*, v.56, p.3149-3162.
- Bruce, L. J.; Chase, H. A. (2002), The combined use of in-bed monitoring and an adsorption model to anticipate breakthrough during expanded bed adsorption. *Chemical Engineering Science*. v. 57, p. 3085-3093.
- Cano, T.; Offringa, N.D.; Willson, R.C. (2005), Competitive ion-exchange adsorption of proteins: Competitive isotherms with controlled competitor concentration. *Journal of Chromatography A*, v.1079, p. 116-126.
- Cecchi, H.M. *Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos*. Campinas,SP: Editora da Unicamp, 1999.
- Chang, Y. K.; Chase, H. A. (1996), Development of operating conditions for the protein purification using expanded bed techniques: the effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 512-526.
- Charoenrat, T.; Ketudat-Cairns, M.; Jahic, M.; Enfors, S-O.; Veide, A. (2006). Recovery of recombinant β -glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high-cell-density culture broth, *Journal of Biotechnology*, p.86-98, v. 122.
- Chase, H. A. (1984), Affinity separations utilizing immobilized monoclonal antibodies - a new tool for the biochemical engineer. *Chemical Engineering Science*, v. 39, p. 1099 – 1125.
- Chen, G.;Sun, Z.; Wang,Y.; Qian, X. (1997), Purification and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*.v.37, p.362-367.
- Chen, T.; Wong, Y-S.; Zheng, W. (2006), Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. *Phytochemistry*, v.67, p.2424-2430.
- Chen, W-D.; Ding, X-Y.; Sun, Y. (2003), Modeling of the whole expanded bed protein adsorption process with yeast cell suspensions as feedstock. *Journal of Chromatography A*. v. 1012, p. 1-10.

Chojnacka, K.; Noworyta, A. (2004), Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. v.34, p.461-45.

Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 2º ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1990. 279p.

Costa, J.A.V.; Linde, G.A.; Atala, D.I.P.; Mibileli, G.M.; Krüger, R.T. (2000) Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.16, p.15-18.

Degerman, M.; Jakobsson, N.; Nilsson, B. (2007), Modeling and optimization of preparative reversed-phase liquid chromatography for insulin purification. *Journal of Chromatography A*, v. 1162, p. 41-49.

Deuffhard E.; Hairer E.; Zugck J. (1987), One step and extrapolation methods for differential-algebraic systems. *Numerische Mathematik*, v. 51, p. 501-516.

Dufossé, L., (2006), Microbial Production of food grade pigments, *Food Technology and Biotchnology*. v,44, p.313-321.

Eriksen, N.T. (2008), Production of phycocyanin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, p. 1-14.

Estrada, J.E.P.; Bescós, P.B.; Fresno, A.M.V. (2001), Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *IL Farmaco*, v. 56, p. 497-500.

Fenneteau, F.; Aomari, H.; Chahal, P.; Legros, R. (2002), Modeling of Scale-down effects on the hydrodynamics of expanded bed adsorption columns. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 81, p.790-799.

Ferreira, G.N.M.; Cabral, J.M.S.; Prazeres, D.M.F. (2000), Anion exchange purification of plasmid DNA using expanded bed adsorption. *Bioseparation*, Netherlands, p. 1-6, v. 9.

Freitag, R.; Horváth, C. (1995), Chromatography in the downstream processing of biotechnological products. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Berlin, v. 53, p. 17-59.

Ghose, S.; Chase, H. (2000a), Expanded bed chromatography of proteins in small diameter columns. I. Scale down and validation. *Bioseparation*.v.9, p.21-28.

Ghose, S.; Chase, H. (2000b), Expanded bed chromatography of proteins in small diameter columns. II. Methods development and scale up. *Bioseparation*.v.9, p.29-36.

Goldberg, E. (1998), Bioprocessing in the pharmaceutical industry. *Biotechnology Advances*, v.16, p.771-777.

Harsa, S.; Furusaki, S. (1994), Separation of amyloglucosidase using B-cyclodextrin/chitosan. *Separation Science and Technology*. v. 29, p. 639-650.

Henning, K.D., Degel, J. *Purification of air, water and off gas - solvent recovery - Activated carbon for solvent recovery* (1990). Paper presented at the Meeting of the European Rotogravure Association Engineers Group Mulhouse/France.

Hjorth, R. (1999), Expanded bed adsorption: elution in expanded bed mode. *Bioseparation*, v.8, p. 1-9.

Horstmann, B.J.; Chase, H.A. (1989), Modelling the affinity adsorption of immunoglobulin G to protein a immobilized to agarose matrices. *Chemical Engineering Research and Design*. v.67, p.243.

Hu, H-B.; Yao, S-J.; Zhu, Z-Q.; Hur, B-K. (2001), Comparison of the adsorption characteristics of expanded bed adsorbent with conventional chromatographic adsorbent. *Korean Journal Chemical Engineering*, v. 18, p. 357-362.

Jakobsson, N.; Degerman, M.; Stenborg, E.; Nilsson, B. (2007), Model based robustness analysis of an ion-exchange chromatography step. *Journal of Chromatography A*, v. 1138, p. 109-119.

Jakobsson, N.; Karlsson, D.; Axelsson, J. P.; Zacchi, G.; Nilsson, B. (2005), Using computer simulation to assist in the robustness analysis of an ion-exchange chromatography step. *Journal of Chromatography A*, v. 1063, p. 99-109.

Jungbauer, A. (2005), Chromatographic media for bioseparation. *Journal of Chromatography A*, v.1065, p.3-12.

Kaczmarek, K.; Bellot, J-C. (2005), Influence of particle diameter distribution on protein recovery in the expanded bed adsorption process. *Journal of Chromatography A*, v. 1069, p. 91-97.

Kalil, S. J. (2000), Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido – *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Kalil, S. J.; Barboza, M.; Maugeri, F.; Rodrigues, F. (2006), Studies on the adsorption of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 onto an ion exchange resin. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, p. 223-228.

Kalil, S. J.; Maugeri-Filho, F.; Rodrigues, M. I. (2005). Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an intracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 581-586.

Kalil, S. J.; Suzan, R.; Maugeri, F.; Rodrigues, M. I. (2001), Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. *Applied Biochemical and Biotechnology*, v. 94, p. 257-264.

Kalil, S. J., Burkert, C. A. V., Burkert, J. F. M., Silveira, S.T., Moraes, C. C., Costa, J. A. V. (2008). Patente: Privilégio de Inovação n.PI0801702-6, Obtenção do extrato de ficocianina a. 19 de Fevereiro de 2008 (Depósito).

Kaltenbrunner, O.; Giaverini, O.; Woehle, D.; Asenjo, J.A. (2007), Application of chromatographic theory for process characterization towards validation of an ion-exchange operation. *Biotechnology and Bioengineering*, v.98, p.201-210.

Li, P.; Xiu, G.; Rodrigues, A. E. (2005), Experimental and modeling study of protein adsorption in expanded bed. *AIChE Journal*, v. 51, p. 2965-2977.

Lin, D-Q; Thömmes, J.; Kula, M-R.; Hubbuch, J.J. The influence of biomass on the hydrodynamic behavior and Stability of expanded beds. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 87, p. 337-346.

Ling, T. C.; Loong, C. K.; Tan, W. S.; Tey, B. T.; Abdullanh, W. M. W.; Ariff, A. (2004), Purification of filamentous bacteriophage M13 by expanded bed anion exchange chromatography. *The Journal of Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 228-232.

Liu, L.; Chen, X.; Zhang, X.; *et al.* (2005), One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. *Journal. of Biotechnology*, v.116, p.91-100.

Madhyastha, H. K.; Radha, K. S.; Sugiki, M.; Omura, S.; Maruyama, M. (2006), Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina fusiformis* and its effect on the induction of urokinase-type plasminogen activator from calf pulmonary endothelial cells. *Phytomedicine*, v. 13, p. 564-569.

Manera, A.P.; Kamimura, E.S.; Brites, L.M.; Kalil, S.J. (2008), Adsorption of amyloglucosidase from *Aspergillus niger* NRRL 3122 using ion exchange resin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.51, p. 1015-1024.

Mendes, G.L. (2006), Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados. Dissertação de Mestrado, UNICAMP.

Medeiros, F.O.; Alves, F.G.; Lisboa, C.R.; Martins, D.S.; Burkert, C.A.V.; Kalil, S.J. (2008), Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de beta-galactosidase para uso em laboratório. *Química nova*, v. 31, p. 336-339.

Mendieta-Taboada, O.; Kamimura, E. S.; Maugeri, F. (2001), Modelling and simulation of the adsorption of the lipase from *Geotrichum* sp. on hydrophobic interaction columns. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 781-786.

Minkova, K. M.; Tchernov, A. A.; Tchorbadjieva, M. I.; Fournadjieva, S.T.; Antova, R. E.; Busheva, M. Ch. (2003), Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, v. 102, p. 55-59.

Minkova, K.; Tchorbadjieva, M.; Tchernov, A.; Stojanova, M.; Gigova, L.; Busheva, M. (2007), Improved procedure for separation and purification of *Arthrospira africanum* phycobiliproteins. *Biotechnology Letters*, v.29, p.647-651.

Moares, C.C.; Burkert, J.F.M; Kalil, S.J. (2010), C-phycoerythrin extraction process for large-scale use. *Journal of Food Biochemistry*, (in press)

Moraes, C.C.; Kalil, S.J.(2009). Strategy for a protein purification design using C-phycoerythrin extract. *Bioresource Technology*, v.100, p.5312-5317.

Moraes, C.C.; Mazutti, M.A.; Rodrigues, M.I.; Maugeri, F.; Kalil, S.J. (2009), Mathematical modeling and simulation of inulinase adsorption in expanded bed column. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p.4395-4401.

Nayak, D. P. (2001), Studies of Protein Purification on Expanded Bed. *Doctor of Philosophy in Biotechnology*. University of Pune, Índia.

Niu, J-F.; Wang, G-C.; Lin, X-z.; Zhou, B-C. (2007), Large-scale recovery of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 850, p. 267-276.

Oliveira, L.S.C. Influência da temperatura, grau de expansão e altura do leito sobre a recuperação e purificação de alfa-lactoalbumina a partir de soro de leite bovino em leito expandido de resina hidrofóbica. *Tese de Doutorado*. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003.

Pai, A.; Gondkar, S.; Sundaram, S.; Lali, A. (1999), Expanded bed adsorption on supermacroporous cross-linked cellulose matrix, *Bioseparation*, Netherlands, v. 8, p. 131-138.

Pardhasaradhi, B. V. V.; Mubarak Ali, A.; Leela Kumari, A.; Reddanna, P.; Khar, A. (2003), Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. *Molecular Cancer Therapeutics*. v. 2, p.1165-1170.

Patil, G.; Chethana, S.; Sridevi, A. S.; Reghavarao, K.S.M.S. (2006), Method to obtain C-phycoerythrin of high purity. *Journal of Chromatography A*, v. 1127, p. 76-81.

Patil, G.; Raghavarao, K.S.M.S. (2007), Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoerythrin. *Biochemical Engineering Journal*, v.34, p.156-164.

Pessoa, A. Jr.; Kilikian, B. V. (2005), *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. Ed. Manole, Barueri, SP, p.444.

Reddy, C. M.; Subhashini, J.; Mahipal, S. V. K.; Bhat, V. B.; Reddy, P. S.; Kiranmai, G. Madyastha, K. M.; Reddanna, P. (2003), C-phycoerythrin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 304, p. 385-392.

Reis, A.; Mendes, A.; Lobo-Fernandes, H.; Empis, J. A.; Novais, J. M. (1998), Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc sp.* *Bioresource Technology*, v.66, p.181 – 187.

Richardson, J. F.; Zaki, W. N. (1954), Sedimentation and fluidization: part I. *Transactions Institute Chemical Engineering*, v. 32, n. 1, p. 35-53.

Rito-Palomares, M. (2004), Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography B*, v.807, p.3-11.

Rodrigues, M. I.; Iemma, A.F. (2005), *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia sequencial de planejamentos*. Ed. Casa do Pão: Campinas.

Roe, S. Protein Purification Techniques – A Practical Approach. Oxford University Press. 2^a Ed. New York, 2006.

Román, B. R.; Pez, J. M. A.; Fernández, F. C. A.; Grima, E. M. (2002), Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, v. 93, p. 73-85.

Romay, C.; Remírez, D.; González, R. (2001), Actividad antioxidante de la ficocianina frente a radicales peroxílicos y la peroxidación lipídica microsomal. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, v. 20, p. 38-41.

Santiago-Santos, M. C.; Ponce-Noyola, T.; Olvera-Ramírez, R.; Ortega-López, J.; Cañizares-Villanueva, R. O. (2004), Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix sp.*. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 2047-2052.

Santos, E.S.; Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leite expandido. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.

Sarada, R.; Pillai, M. G.; Ravishankar, G. A. (1999), Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 795-801.

Schwaab, M.; Biscaia, E. C.; Monteiro, J. L.; Pinto, J. C. (2008), Nonlinear parameter estimation through particle swarm optimization. *Chemical Engineering Science*, v. 63, p. 1542-1552.

Scopes, R.K. *Protein Purification: Principles and Practice*. 3 ed. USA: Springer. 380p. 1993.

Shrama, A.D. ; Gill, P.K. (2007), Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. *Journal of Food Engineering*, v.79, p.1172-1178.

Silva, F.R.C. (2000), Estudo da adsorção de inulinas em coluna com resinas de troca iônica: parâmetros experimentais e modelagem. Tese de Doutorado, UNICAMP.

Silva, L.A.; Kuhn, K.R.; Moraes, C.C.; Burkert, C.A.V.; Kalil, S.J. (2009), Experimental Design as a Tool for Optimization of C-Phycocyanin Purification by Precipitation from *Spirulina platensis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.20, p.5-12.

Silva-Santisteban, B. O. Y.; Maugeri, F. (2005), Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 717-724.

Silveira, S. T.; Quines L. K. M.; Burkert C. A. V.; Kalil S. J. (2008), Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 31, p. 477-482.

Skidmore, G. L; Chase, H. A. (1989), Multi-component adsorption of proteins to ion exchangers. *Chemical Engineering Research Design*, v. 67, p. 244-254.

Snow,U. (1994), Adsorbent reduces primary unit operations for bioprocess recovery. *Genetic Engineering News*, v.14, p. 320-329.

Soni, B.; Kalavadia, B.; Trivedi, U.; Madamwar, D. (2006), Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India, *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2017-2023.

Tong, X-D; Xue, B.; Sun, Y. (2003), Modeling of expanded bed protein adsorption by taking into account axial particle size distribution. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, p. 265-272.

Treichel, H.(2001), *Estudo de Meios Industriais para a Produção de Inulinase por Kluyveromyces Marxianus var.Bulgaricus ATCC 16045*. Dissertação de mestrado, UNICAMP.

Viskari, J. P.; Colyer, C. L. (2003), Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical Biochemistry*, v. 319, p. 263-271.

Vonshak, A. (1997), *Spirulina platensis (Arthrospira)* – Physiology, cell biology and biotechnology. Ed. Taylor & Francis, p. 196 – 198.

Wheelwright, S.M. (1987), Downstream processes for large-scale protein purification. *Biotechnology*, v.5, p. 789-193.

Wheelwright, S.M. (1989), The design of downstream processes for large-scale protein purification. *Journal of Biotechnology*, v.11, p. 89-102.

Xia, H-F.; Lin, D-Q.; Yao, S-J. (2007), Evaluation of new high-density ion exchange adsorbents for expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1145, p. 58-66.

Yun, J.; Lin, D. Q.; Yao, S. J. (2005), Predictive modeling of protein adsorption along the bed height by taking into account the axial non uniform liquid dispersion and particle classification in expanded beds. *Journal of Chromatography A*, v. 1095, p.16-26.

Yunes, J.S.; Suzuki, M.T.; Silveira, A.G. *et al.* (1990), Cianobactérias fixadoras de nitrogênio do estuário da Lagoa dos Patos, RS: *Nostoc muscorum*. *Ciência e Cultura*, v.42, p. 375-383.

APÊNDICE A

Mathematical modeling and simulation of inulinase adsorption in expanded bed column – Artigo publicado no Journal of Chromatography A, 1216, p. 4395-4401, 2009