



DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA PARA A SEPARAÇÃO DE CÉLULAS
ANIMAIS COM SIMULTÂNEA PURIFICAÇÃO DO BIOFÁRMACO PRODUZIDO

Romi Lamb Machado

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Rio de Janeiro
Setembro de 2008

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA PARA A SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ANIMAIS COM SIMULTÂNEA PURIFICAÇÃO DO BIOFÁRMACO PRODUZIDO

Romi Lamb Machado

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:

Prof. Alberto Claudio Habert, Ph.D.

Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.

Profa. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Prof. Antonio Carlos Augusto da Costa, D.Sc.

Profa. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

SETEMBRO DE 2008

Machado, Romi Lamb

Desenvolvimento de um Sistema para a Separação de Células Animais com Simultânea Purificação do Biofármaco Produzido/Romi Lamb Machado. - Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2008.

XII, 140 p.: il; 29,7 cm

Orientador: Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2008.

Referências Bibliográficas: p. 116-125.

1. Membrana de afinidade. 2. Separação de células animais. 3. Adsorção. I. Castilho, Leda dos Reis *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA PARA A SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ANIMAIS COM SIMULTÂNEA PURIFICAÇÃO DO BIOFÁRMACO PRODUZIDO

Romi Lamb Machado

Setembro/2008

Orientadores: Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Programa: Engenharia Química

Neste trabalho, fluidodinâmica computacional foi aplicada no desenvolvimento de módulos de permeação visando ao emprego em processos integrados de perfusão e purificação de GM-CSF. Foram avaliadas a tensão de cisalhamento e a queda de pressão através da membrana, com objetivo de desenvolver módulos que forneçam níveis de tensões de cisalhamento capazes de evitar incrustação sem, contudo, causar danos celulares. O ligante heparina e o sistema tamponante acetato (20 mM, pH 5,0) foram selecionados para a purificação de GM-CSF. Foram obtidas membranas de PEI/PVP para a construção do módulo indicado por CFD, com permeabilidade inicial de 772 L/h.m².bar. Heparina foi imobilizada no módulo de permeação obtido em concentração de 3,60 mg de heparina/cm² membrana. A etapa de imobilização de heparina foi seguida de reticulação por glutaraldeído. Durante a filtração em batelada de meio de cultivo contendo células em suspensão, a viabilidade celular manteve-se acima de 90% por 4 horas, obteve-se fatores de purificação de GM-CSF acima de 3, a retenção celular foi de 100% e a redução da permeabilidade da membrana foi de 65%, em relação à permeabilidade original.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

DEVELOPMENT OF A SYSTEM FOR INTEGRATED SEPARATION OF
MAMMALIAN CELLS AND BIOPHARMACEUTICAL PURIFICATION

Romi Lamb Machado

September/2008

Advisors: Leda dos Reis Castilho

Ricardo de Andrade Medronho

Department: Chemical Engineering

In this work, computational fluid dynamics was applied in the development modules of hollow fibers aiming at using them in process integrated of perfusion and purification of the GM-CSF. Shear stress and pressure drop through the membrane were evaluated, aiming at developing the cartridge which shall provide shear strain rate capable of avoiding fouling without causing cellular damages. The heparin ligand and acetate buffer (20 mM, pH 5,0) were selected for the GM-CSF purification. PEI/PVP composite membranes were obtained for the development of the cartridge indicated by CFD results, with initial permeability of 772 L/h.m².bar. Heparin was immobilized in the cartridge with 3,60 mg of heparin/cm² of membrane. Glutaraldehyde crosslinking was carried out after heparin immobilization. In batch filtration of cultive medium with suspension cells the viability remains over 90% for 4 hours, the GM-CSF purification factor was over 3, the cell retention was 100% and the membrane permeability reduction was 65%, in relation to the original permeability.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	xii
1.Introdução.....	1
2.Objetivos do trabalho	4
3.Revisão Bibliográfica.....	5
3.1.Biotecnologia empregando células animais	5
3.2.O biofármaco GM-CSF recombinante	8
3.3.Sistemas de cultivo e modos de operação	9
3.4.Equipamentos de retenção celular para cultivos em perfusão	12
3.5.Processos de purificação dos produtos.....	16
3.5.1.Cromatografia de afinidade em membranas	20
3.5.2.Processos integrados de cultivo e purificação	22
3.6.Fluidodinâmica computacional.....	23
3.6.1.Descrição da Geometria.....	24
3.6.2.Geração da malha	24
3.6.3.Condições do Escoamento e Seleção dos Modelos.....	26
3.6.4.Resolução das Equações de Conservação	28
3.6.5.Análise dos Resultados.....	28
4.Metodologia.....	29
4.1.Projeto do equipamento de retenção celular	29
4.1.1.Planejamento estatístico das simulações	29
4.1.2.Geometria, malha e condições iniciais e de contorno empregadas em fluidodinâmica computacional	31
4.1.3.Simulação do sistema empregado experimentalmente.....	34
4.2.Cromatografia de Afinidade	34
4.2.1.Ensaio cromatográfico de adsorção de GM-CSF para seleção do ligante de afinidade.....	34
4.2.2.Obtenção do suporte cromatográfico	35
4.2.2.a) Obtenção das fibras ocas de PEI-PVP.....	35
4.2.2.b) Construção do módulo de filtração	37
4.2.2.c) Caracterização das fibras ocas	39
4.2.2.d) Imobilização do ligante	42

4.2.3.Determinação de Curvas de Saturação	45
4.2.4.Ensaio Cromatográfico de adsorção em heparina imobilizada em fibras ocas de PEI/PVP	46
4.2.5.Experimento de filtração em batelada de sobrenadante de cultivo celular contendo células em suspensão	47
4.2.6.Técnicas analíticas.....	49
4.2.6.a) Determinação da concentração protéica	49
4.2.6.b) Quantificação de heparina	50
4.2.6.c) Eletroforese SDS-PAGE (eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo dodecilsulfato de sódio)	50
4.2.6.d) Identificação de GM-CSF por Dot ou Slot Blot	50
4.2.6.e) Western Blot para identificação de GM-CSF	51
4.2.6.f) Quantificação de GM-CSF.....	51
4.2.7.Técnicas relativas ao cultivo celular	52
4.2.7.a) Determinação da concentração celular	52
4.2.7.b) Determinação da viabilidade celular	52
4.2.7.c) Cultivo celular em suspensão e adaptação a SFB reduzido.....	53
4.2.7.d) Congelamento das células	54
4.2.7.e) Descongelamento das células	54
5.Resultados e Discussão	55
5.1.Fluidodinâmica computacional.....	55
5.1.1.Simulação do sistema empregado experimentalmente.....	66
5.2.Seleção do ligante de afinidade	69
5.3.Obtenção do suporte cromatográfico	78
5.3.1.Obtenção das fibras ocas de PEI-PVP.....	79
5.3.2.Imobilização de Heparina em Membrana de PEI/PVP	84
5.4.Determinação das Curvas de Saturação	92
5.5.Ensaio de separação de células CHO.....	97
5.6.Ensaio cromatográfico para adsorção de GM-CSF no módulo de permeação contendo heparina imobilizada	101
6.Conclusões e Perspectivas futuras	103
Referências Bibliográficas	105
ANEXOS.....	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 – Demanda anual mundial por produtos aprovados para uso terapêutico obtidos a partir de células animais.	7
Figura 3.2 – Modos de operação de biorreatores.....	10
Figura 3.3 – Representação esquemática da filtração tangencial.	15
Figura 3.4 – Representação esquemática do princípio de separação da cromatografia de afinidade.....	18
Figura 3.5 - Esquema representativo de uma Curva de Saturação em sistemas cromatográficos.	19
Figura 4.1 – Etapas desenvolvidas em CFD para construção da geometria, da malha e definição das condições iniciais e de contorno.....	33
Figura 4.2 – Aparato experimental empregado no processo de preparo de fibras ocas por fiação úmida	36
Figura 4.3 – Esquema da carcaça de vidro construída para suportar as membranas.	38
Figura 4.4 – Esquema dos modos de operação das fibras ocas suportadas no módulo de filtração.....	38
Figura 4.5 – Representação esquemática do aparato experimental empregado para a compactação e caracterização das fibras ocas.....	41
Figura 4.6 – Fluxograma do processo para obtenção das fibras ocas de PEI/PVP, recobertas por poli(etilenoimina), contendo heparina imobilizada e reticulação com glutaraldeído.	43
Figura 4.7 – Representação esquemática da etapa de alimentação dos ensaios cromatográficos empregando as membranas contendo heparina imobilizada, obtidas no presente trabalho.....	47
Figura 4.8 – Operação do módulo de membranas nos ensaios cromatográficos.....	47
Figura 4.9 – Representação esquemática das etapas de lavagem, eluição e regeneração dos ensaios cromatográficos empregando as membranas contendo heparina imobilizada, obtidas no presente trabalho.....	47
Figura 4.10 – Representação esquemática do aparato experimental empregado em ensaio de filtração em batelada, com variação da pressão através da membrana, para a determinação da viabilidade celular e da permeação de fluido através do módulo de fibras ocas.....	49

Figura 5.1 – Exemplo de linha de controle empregada para elaboração de regiões com refinamento de malha.....	56
Figura 5.2 – Ponto 7 do planejamento de simulações. Geometria em fatia de 36° com centro em ângulo, sem corte, e refinamento no entorno da membrana..	57
Figura 5.3 – Resultado da simulação do Ponto 7 do planejamento de simulações, com diferentes refinamentos. Geometria em fatia de 36° com corte central reto a 1,5 do centro do módulo.	57
Figura 5.4 – Malha tetraédrica do casco do Ponto 7 do planejamento de simulações....	58
Figura 5.5 – Detalhe da malha tetraédrica da membrana referente ao Ponto 7 do planejamento de simulações.	59
Figura 5.6 – Malha tetraédrica do casco do Ponto 7 do planejamento de simulações, permitindo visão da malha extrusada na região de simetria.....	59
Figura 5.7 – Malha tetraédrica do casco do Ponto 7 do planejamento de simulações, permitindo visão da malha extrusada na direção axial..	60
Figura 5.8 – Variação da pressão ao longo do comprimento na fibra oca.	61
Figura 5.9 – Variação da queda de pressão transmembrana entre a entrada e a saída do módulo, para todas as simulações realizadas.	62
Figura 5.10 – Tensão de cisalhamento máxima observada nos módulos de fibras ocas simulados.....	62
Figura 5.11 – Comparação dos valores simulados e preditos pelo modelo da Equação 5.2 para a variação da queda de pressão transmembrana entre a entrada e a saída $[\Delta(\Delta P_{TM})]$ dos módulos simulados.	65
Figura 5.12 – Simulação por CFD de módulo com comprimento de 1 cm, contendo 130 membranas de 950 μm de diâmetro interno, simulado como fatia de 36°.....	66
Figura 5.13 – Resultados obtidos para a simulação por CFD do módulo obtido experimentalmente, comprimento de 1 cm, contendo 40 membranas de 1459 μm de diâmetro interno, simulado como fatia de 36°.....	67
Figura 5.14 – Estruturas dos ligantes de afinidade heparina (A) e azul de cibacron F3G-A (B), estudados para a adsorção de GM-CSFrh.	70
Figura 5.15 – Ensaio cromatográfico empregando azul de cibacron como ligante imobilizado em membrana comercial, com injeção de GM-CSF (comercial + sobrenadante). Tampão fosfato pH 7,5, gradiente salino.....	71

Figura 5.16 – Ensaio cromatográfico empregando azul de cibacron como ligante imobilizado em membrana comercial, com injeção de GM-CSF (comercial + sobrenadante). Tampão fosfato pH 7,5, eluição em degrau de NaCl.	72
Figura 5.17 – Ensaio cromatográfico empregando azul de cibacron como ligante imobilizado em membrana comercial, com injeção de GM-CSF (comercial + sobrenadante). Tampão Tris-HCl pH 7,5, eluição em gradiente de NaCl.	73
Figura 5.18 – Ensaio cromatográfico empregando heparina como ligante imobilizado em gel comercial, com injeção de GM-CSF (comercial + sobrenadante). Tampão fosfato de sódio pH 7,5, eluição em gradiente de NaCl.	75
Figura 5.19 – Ensaio cromatográfico empregando heparina como ligante imobilizado em gel comercial, com injeção de GM-CSF (comercial + sobrenadante). Tampão acetato pH 5,0, eluição em gradiente salino.	76
Figura 5.20 – Imunoensaio de <i>dot blot</i> das frações coletadas nas etapas de eluição e regeneração dos ensaios cromatográficos realizados com alimentação de GM-CSFrh comercial, empregando como ligantes azul de Cibacron (solução tampão Tris-HCl, 20 mM, pH 7,5) e heparina (solução tampão acetato de sódio, 20 mM, pH 5,0), ambos imobilizados em produto comercial.	78
Figura 5.21 – Estrutura dos polímeros empregados para obtenção das fibras ocas.	79
Figura 5.22 – Fotomicrografias da seção transversal da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C1	81
Figura 5.23 – Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F4C8.	83
Figura 5.24 – Módulo de permeação com carcaça de vidro e membrana de PEI/PVP sem uso e extremidade mostrando o arranjo das fibras empacotadas	84
Figura 5.25 – Esquema de reação de poli(éter imida) com poliaminas.	85
Figura 5.26 – Imunoensaio do tipo <i>slot blot</i> , realizado com amostras das etapas dos ensaios de adsorção em membrana PEI/PVP cortada em pedaços.	89
Figura 5.28 – Proteína recuperada nas etapas dos ensaios de adsorção em membrana PEI/PVP cortada em pedaços.	90
Figura 5.29 – GM-CSF recuperado nas etapas de eluição e regeneração dos ensaios de adsorção em membrana PEI/PVP cortada em pedaços.	91
Figura 5.30 – Ensaio de adsorção de GM-CSF comercial em módulo de permeação contendo heparina imobilizada, $Q_P = 1,0$ mL/min.	93

Figura 5.31 – Ensaio de adsorção de GM-CSF comercial em módulo de permeação contendo heparina imobilizada, $Q_P = 2,2$ mL/min.....	94
Figura 5.32 – Ensaio de adsorção de GM-CSF comercial em módulo de permeação contendo heparina imobilizada, $Q_P = 3,4$ mL/min.....	95
Figura 5.33 – Curvas de ruptura em termos de proteína total obtidas para as linhas de permeado, nas diferentes vazões estudadas.....	95
Figura 5.34 – Perfil cromatográfico típico dos ensaios realizados após a obtenção das curvas de ruptura de GM-CSF, empregando heparina como ligante imobilizado na membrana de PEI/PVP obtida no presente trabalho, com injeção de GM-CSF (comercial + sobrenadante).....	96
Figura 5.35 – Acompanhamento da viabilidade celular ao longo do experimento de filtração em batelada de meio de cultivo contendo células em suspensão.....	97
Figura 5.36 – Ensaio de filtração em batelada de meio de cultivo contendo células em suspensão.....	98
Figura 5.37 – Módulo de permeação original e após o ensaio de filtração de meio de cultivo contendo células animais em suspensão, apresentando deformação das fibras..	99
Figura 5.38 – Permeabilidade hidráulica do módulo contendo membrana de PEI/PVP, determinada com a membrana original e após os ensaios de imobilização do ligante heparina e de filtração de meio de cultivo com células CHO-GM-CSF em suspensão.....	100
Figura 5.39 – Ensaio cromatográfico de adsorção de GM-CSF no módulo de permeação contendo heparina imobilizada, com alimentação concomitante com o ensaio de filtração em batelada de sobrenadante com células animais..	102

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Métodos de purificação comumente utilizados, propriedades exploradas para promover a separação e características de desempenho de cada técnica	16
Tabela 4.1 – Matriz utilizada no planejamento das simulações com fluidodinâmica computacional.	30
Tabela 4.2 – Matriz codificada das variáveis estudadas, empregadas no planejamento das simulações, correspondente à Tabela 4.1.	30
Tabela 4.3 – Conjunto de experimentos propostos para a determinação da concentração da solução e do tempo da reação de reticulação com glutaraldeído	44
Tabela 4.4 – Condições operacionais dos ensaios para a determinação das curvas de saturação.	46
Tabela 5.1 – Matriz empregada para o desenvolvimento das simulações empregando fluidodinâmica computacional.	61
Tabela 5.2 – Análise dos resultados do planejamento estatístico, com base no modelo completo (Equação 1).	63
Tabela 5.3 – Análise dos resultados do planejamento estatístico, com base no modelo da Equação 5.2.	64
Tabela 5.4 – Valores das variáveis L , D_{int} e N que minimizam $\Delta(\Delta P_{TM})$	65
Tabela 5.5 – Sistemas tamponantes empregados nos ensaios cromatográficos para a seleção de ligante para a purificação de GM-CSF.	70
Tabela 5.6 – Melhores resultados obtidos nos ensaios de adsorção de GM-CSF.	77
Tabela 5.7 – Condições experimentais manipuladas para a obtenção das fibras ocas de PEI/PVP (15/10 % m/m)	80
Tabela 5.8 – Características da membrana de fibra oca simulada inicialmente e obtida experimentalmente	83
Tabela 5.9 – Características do módulo de permeação obtido	84
Tabela 5.10 – Dados experimentais obtidos nos ensaios de imobilização de heparina em membrana cortada e no módulo de permeação	87
Tabela 5.11 – Condições operacionais dos ensaios para a determinação das curvas de saturação.	92
Tabela 5.12 – Coeficiente de permeabilidade do módulo de permeação, obtidos a partir das equações das retas da Figura 5.38.	101

1. Introdução

Biofármacos são proteínas de uso terapêutico, produzidas por processos biotecnológicos que se baseiam normalmente em sistemas de cultivo *in vitro*, porém também podem ser utilizados sistemas *in vivo* através do emprego de animais e plantas transgênicas (HOUDEBINE, 2002; VALDÉS *et al.*, 2003).

Por sofrerem fortes modificações pós-tradução (glicosilação, γ -carboxilação e β -hidroxilação), para obtenção de biofármacos recombinantes é indicado o emprego de células animais como sistema de expressão, uma vez que as mesmas são capazes de realizar as modificações pós-tradução complexas exigidas para a atividade biológica da proteína em questão, e também são capazes de excretar no meio a proteína heteróloga produzida.

Hoje em dia, linhagens de células animais estáveis encontram-se disponíveis em bancos depositários internacionais e podem ser mantidas em cultivo por longos períodos de tempo. Podem apresentar elevado nível de expressão protéica, promovem modificações pós-tradução similares às realizadas pelas células humanas e podem ser adaptadas ao cultivo em suspensão e sem suplementação de soro fetal bovino. Este último ponto é particularmente importante, dada à exigência crescente, por parte das agências regulatórias, de produção de proteínas recombinantes na ausência de componentes de origem animal, que podem ser possíveis fontes de contaminação do produto.

A forma como as células são cultivadas é um fator que influencia a qualidade final do produto, uma vez que as condições de cultivo alteram o padrão de glicosilação das proteínas (FUSSENEGGER *et al.*, 1999; RAJU *et al.*, 2000). O cultivo em escala comercial pode empregar garrafas rotatórias, microcarregadores, sistemas em suspensão e biorreatores de fibras ocas. O cultivo em suspensão em geral é o mais efetivo (LUBINIECKI, 1998), devido à manutenção de concentração homogênea de células, nutrientes, metabólitos e produto, facilitando o monitoramento e controle da cultura (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

Desde que as células animais modificadas geneticamente são capazes de excretar o produto de interesse no meio de cultivo, o primeiro passo, no sentido de recuperá-lo é a separação de células, que pode ser realizada por várias operações unitárias. Mas ocorre que células animais respondem ao estresse hidrodinâmico em minutos, pela alteração de seu metabolismo celular e expressão gênica. Em um nível

subletal a dissipação da força mecânica inicialmente resulta no aumento do transporte passivo, contudo com danos aos receptores de superfície da membrana (AL-RUBEAI *et al.*, 1995). Desta forma, é de suma importância que um eficiente equipamento para a retenção de células no biorreator se faça presente, mas que desenvolva tensões de cisalhamento que não inviabilize as células cultivadas. Segundo CASTILHO (2001), as células podem ser mantidas por até 15 minutos, sob condições com tensão de cisalhamento de 60 Pa, sem que a viabilidade celular seja afetada de forma significativa.

Diferentes técnicas de separação podem ser usadas para reter células no biorreator durante a perfusão. Elas são usualmente baseadas em ação centrífuga (centrífuga, hidrociclone), sedimentação gravitacional, filtração (filtro rotativo, filtros com fluxo tangencial, filtros dinâmicos), separações dieletoforéticas e ultra-som. Diferentes tipos de equipamentos têm sido utilizados e estudados para este fim, no entanto, esta operação ainda apresenta muitas limitações (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

Uma opção é a filtração em membranas, visto que apresenta uma série de vantagens tal como simplicidade de processo e fácil adaptação ao sistema, elevada capacidade de filtração com completa retenção celular (facilitando o *downstream processing*), operação externa ao biorreator, permitindo manuseio asséptico para a resolução de problemas (tal como incrustação), custo relativamente baixo de operação e habilidade para usar o mesmo processo para uma grande quantidade de diferentes produtos, sem grande aumento de trabalho de desenvolvimento.

Uma vantagem adicional referente à utilização de membranas é a possibilidade de emprego das mesmas em processos integrados de cultivo celular e purificação do produto. Neste caso, o emprego de membranas de afinidade permite a realização simultânea de etapas de separação de células e purificação, possibilitando a remoção de produtos inibitórios (melhorando taxas de crescimento e formação de produtos), a retirada de produtos lábeis (minimizando a degradação do produto formado), a obtenção de maiores rendimentos globais e menores custos associados aos processos de recuperação e de purificação, visto que admitem a integração de várias etapas de separação do produto em apenas uma. As membranas de afinidade combinam a alta seletividade das resinas de afinidade às altas produtividades das membranas de microfiltração (CASTILHO *et al.*, 2002a).

Esta integração de etapas num mesmo processo reduz os custos e perdas durante a obtenção do biofármaco, fazendo da filtração em membranas de afinidade

uma operação promissora, visto que, segundo THÖMMES e colaboradores (1996), as etapas de recuperação e purificação de um produto podem ser responsáveis por até 80% dos custos de produção em processos biotecnológicos, custos estes fortemente ligados ao número de etapas envolvidas, pois, com o aumento do número de etapas, aumenta o tempo de processamento e decresce o rendimento global do processo.

Como a separação é dada pela interação seletiva do ligante com a biomolécula de interesse, o produto fica adsorvido, enquanto as outras substâncias passam pela membrana com menor ou sem qualquer interação, sendo recolhidas no permeado. Os compostos maiores que o poro da membrana (células, debris celulares e impurezas) são coletados na corrente de retido e a molécula de interesse é recolhida durante a etapa de eluição, no permeado (ROPER E LIGHTFOOT, 1995).

Entretanto, para que a purificação do produto possa ser realizada na presença de células, em especial no caso de integração com o cultivo em perfusão, torna-se essencial o emprego de módulos de hidrodinâmica adequada, capazes de permitir um eficiente controle da incrustação e uma operação estável por períodos prolongados.

Neste contexto, visando a superar os problemas relacionados à incrustação e à ruptura prematura de solutos em módulos de filtração tangencial, a fluidodinâmica computacional (CFD) se apresenta como uma ferramenta útil para a otimização da geometria e das condições operacionais de módulos de membranas de adsorção. CFD pode auxiliar no desenvolvimento de módulos que conjuguem quedas homogêneas de pressão através da membrana, níveis de tensão cisalhante adequados para evitar a incrustação sem causar danos às células, assim como elevada densidade de empacotamento das membranas.

2. *Objetivos do trabalho*

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um dispositivo para retenção celular com simultânea recuperação do fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), adaptado às características especiais de células animais, para uso em um sistema de cultivo em perfusão, empregando membranas de adsorção para combinar a separação das células com a purificação do biofármaco produzido.

Para o desenvolvimento deste equipamento, foram estudadas diferentes geometrias de módulos de fibras ocas, utilizando, para este fim, a fluidodinâmica computacional (CFD). Após a identificação de uma geometria que, idealmente, proporcionasse uma distribuição uniforme de fluxo ao longo das membranas, associada a tensões de cisalhamento compatíveis com a manutenção da viabilidade celular e, ao mesmo tempo, suficientes para evitar incrustação das fibras, o equipamento foi construído e testado. Nestes testes, o desempenho quanto à retenção celular e à purificação do produto foi avaliado.

Objetivos específicos:

- Determinar, com auxílio de CFD, configurações de módulos de membrana de fibra oca com tensão de cisalhamento adequada às células animais e reduzida variação da diferença de pressão através da membrana.
- Selecionar ligantes e condições cromatográficas para a adsorção de GM-CSF.
- Contruir o módulo de permeação indicado por CFD.
- Desenvolver um suporte cromatográfico, a partir da obtenção de fibras ocas com características de microfiltração, contendo ligantes seletivos à adsorção de GM-CSF.
- Avaliar o desempenho do processo de retenção celular e simultânea purificação de GM-CSF no módulo de permeado obtido.

3. *Revisão Bibliográfica*

3.1. *Biotecnologia empregando células animais*

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante na década de 70 marcou o início de uma nova era na Biotecnologia, e a manufatura de proteínas terapêuticas, especificamente a insulina humana produzida por *E.coli*, representou a primeira aplicação industrial desta tecnologia (WALSH, 2003). Este avanço permitiu a produção em larga escala de praticamente qualquer proteína fisiologicamente ativa, desde que um gene apropriado seja incorporado a um sistema de expressão adequado (KUNITAKE *et al.*, 1997).

Embora proteínas recombinantes em geral possam ser produzidas em diferentes tipos de hospedeiros, tais como bactérias, leveduras, fungos filamentosos, células de insetos e vegetais, assim como animais e plantas transgênicas, para a produção de proteínas de uso terapêutico as células de mamíferos têm se consolidado como o sistema de expressão preferido. Atualmente, cerca de 70% de todas as proteínas recombinantes com finalidade farmacêutica produzidas em escala industrial são oriundas de células animais (WURM, 2004).

Ainda que de fácil manipulação e cultivo, microrganismos são menos empregados na produção de biofármacos, uma vez que não são capazes de produzir proteínas complexas devido à ausência de diversos mecanismos de modificação pós-tradução ou à realização destas com padrões distintos, resultando em proteínas imunogênicas ao homem (LUBINIECKI, 1998). As células de insetos, apesar de serem de eucariotos superiores, não realizam adequadamente algumas modificações pós-tradução mais complexas de proteínas humanas. Estudos recentes têm visado à humanização de proteínas expressas neste sistema, com foco específico na N-glicosilação (sialização), mas os resultados ainda são preliminares (JARVIS, 2003). O emprego de animais transgênicos para a produção de proteínas recombinantes, por sua vez, vem sendo proposto desde a década de 1990 como alternativa de baixo custo para a obtenção de biofármacos, porém desvantagens relacionadas à dificuldade de controle do produto e de manutenção da reprodutibilidade em organismos completos vêm impedindo que produtos obtidos neste sistema de expressão sejam aprovados pelas agências regulatórias (LARRICK e THOMAS, 2001). Plantas transgênicas, embora mais seguras e de propagação mais controlada que animais, apresentam limitações

relativas a diferenças nas modificações pós-tradução requeridas para a correta síntese de proteínas humanas. O mesmo ocorre com células vegetais cultivadas *in vitro*. Mesmo assim, foi aprovada para comercialização nos EUA, em janeiro de 2006, a primeira vacina obtida a partir de cultura de células vegetais (*Financial Times*, 01/02/2006). Trata-se de uma vacina veterinária, que consiste da proteína imunogênica do vírus da doença de *Newcastle* (doença aviária de origem viral com sintomas respiratórios), expressa em células de tabaco recombinantes, e demonstra a possibilidade de aplicação da tecnologia também para outras proteínas recombinantes.

As células de mamíferos, por sua vez, são capazes de realizar de forma adequada as modificações pós-tradução comumente encontradas nas complexas proteínas que têm aplicação terapêutica, tais como glicosilação, γ -carboxilação e β -hidroxilação. A glicosilação é a mais crítica das modificações pós-tradução, já que está associada a diversas propriedades importantes das proteínas, tais como atividade biológica, solubilidade, antigenicidade, imunogenicidade, resistência à inativação e à ação de proteases (FUSSENEGGER *et al.*, 1999; MONTOR e SOGAYAR, 2003).

Além deste aspecto, o fato de que as células de mamíferos geneticamente modificadas geralmente excretam no meio as proteínas heterólogas produzidas, facilita e reduz os custos de purificação dos biofármacos produzidos. Estes fatores, associados ao fato de que, dentre os produtos biofarmacêuticos mais recentes, destacam-se os administrados por longo tempo ou em doses elevadas, tais como os anticorpos monoclonais (LUBINIECKI, 1998), explica porque vem crescendo de forma significativa a demanda por produtos obtidos através do cultivo de células animais. Na Figura 3.1 (adaptada de BUTLER, 2005) pode ser observado o número de biofármacos aprovados pelas agências regulatórias, obtidos através de bioprocessos empregando células animais, nos últimos 20 anos e a demanda de biofármacos em quilogramas a nível mundial. Após 2000, há uma maior inclinação na curva correspondente ao número de produtos, resultado do aumento do número de anticorpos aprovados para uso terapêutico, os quais são empregados em doses relativamente elevadas.

Em 1986, o primeiro ano descrito na Figura 3.1, foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) o primeiro anticorpo monoclonal para uso terapêutico, o Ortoclone OKT3 murino, para uso no tratamento de rejeição aguda, em transplantes cardíacos ou hepáticos (SHIRE e NGUYEN, 2004).

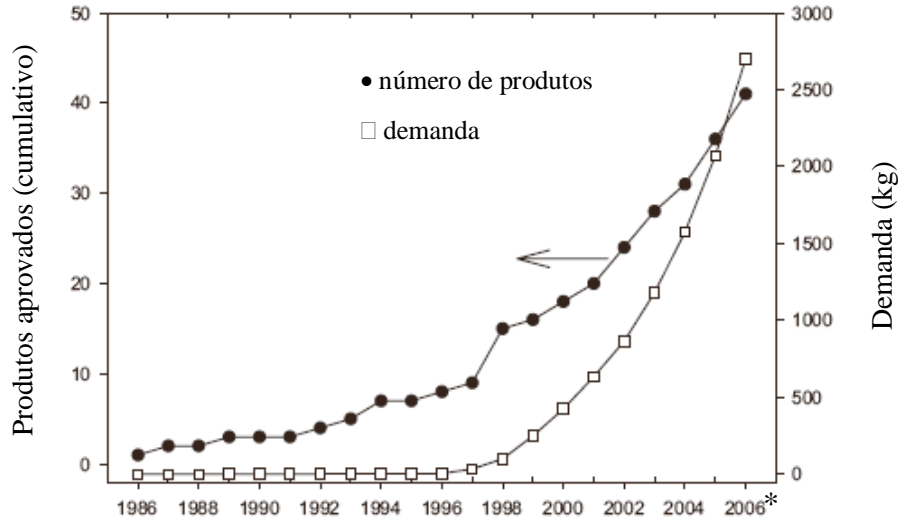


Figura 3.1 – Demanda anual mundial por produtos aprovados para uso terapêutico obtidos a partir de células animais (adaptado de BUTLER, 2005). Onde (*) é uma estimativa do autor.

Somente em 1987 o FDA aprovou para comercialização a primeira proteína terapêutica produzida por células animais recombinantes: o ativador tecidual de plasminogênio humano (t-PA).

Desde então, inúmeros outros biofármacos chegaram ao mercado, tais como a eritropoetina (EPO), que estimula a produção de glóbulos vermelhos e é empregada no tratamento de anemia e como co-adjuvante em casos de câncer e AIDS; os fatores sanguíneos VIII e IX, empregados no tratamento da hemofilia; os fatores estimulantes de colônias (G-CSF e GM-CSF), que estimulam a produção de glóbulos brancos, fortalecendo o sistema imune de pacientes com neutropenia, câncer e AIDS; e anticorpos monoclonais, usados tanto para diagnóstico (*in vitro* e *in vivo*) quanto para fins terapêuticos, em especial no tratamento de diversos tipos de câncer (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

A maioria dos produtos hoje em comercialização é obtida a partir de células da linhagem CHO (células de ovário de hamster chinês, ou em inglês *Chinese hamster ovary cells*), uma vez que se verificou que estas realizam a glicosilação de forma muito semelhante às células humanas, assim como foi observado que poucos vírus que causam doenças em seres humanos são capazes de se replicar nesta linhagem celular, o que constitui um fator de segurança para a produção de biofármacos de uso humano. Por estas razões, as células dessa linhagem são consideradas como o sistema principal e melhor caracterizado de produção de proteínas recombinantes terapêuticas

(LUBINIECKI, 1998; CHU e ROBINSON, 2001; ANDERSEN e KRUMMEN, 2002).

Se a utilização de células de mamíferos como sistemas de expressão permite o processamento adequado das proteínas, em contrapartida a manutenção dessas células em cultura tem custo elevado e exige inúmeros cuidados em relação à contaminação e às tensões de cisalhamento encontradas nos equipamentos de cultivo e separação, que podem causar danos celulares.

Por não possuírem parede celular, assim como por apresentarem elevado tempo de duplicação e tamanho elevado em comparação com o tamanho de bolhas de aeração encontradas em biorreatores, as células de mamíferos apresentam uma sensibilidade intrínseca (AUGUSTO e OLIVEIRA, 2001). Alguns trabalhos sobre a relação entre o rompimento celular e as tensões cisalhantes, às quais são expostas as células, têm sido relatados, sendo que BORN e colaboradores (1992) observaram rompimento celular com tensões desde 0,019 até 100 Pa. Segundo CASTILHO (2001), as células podem ser mantidas por até 15 minutos, sob condições com tensão de cisalhamento de 60 Pa, sem que a viabilidade celular seja afetada de forma significativa. Esta variabilidade pode ser justificada pelas diferenças entre as linhagens celulares, composição do meio de cultivo (em especial presença ou ausência de soro), dispositivo e condições operacionais utilizados.

3.2. O biofármaco GM-CSF recombinante

O fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é uma citocina, que atua como agente hematopoético, influenciando na maior produção de células brancas do sangue, especialmente granulócitos, macrófagos e ainda de plaquetas.

O interesse no GM-CSF humano vem da sua capacidade em estimular a produção de granulócitos e macrófagos em pacientes imunossuprimidos, como resultado de uma doença ou de tratamento clínico empregando radiação ou quimioterápicos, além do tratamento de leucemia mielóide. A introdução do tratamento clínico com GM-CSF humano apresenta resultados promissores, sendo indicado para reversão ou prevenção da diminuição de glóbulos brancos de origem distinta, em particular associadas à toxicidade de drogas empregadas no tratamento quimioterápico do câncer, de modo que é prescrito para casos de leucemia, AIDS, tratamento com AZT e ganciclovir, quimioterapia do câncer e transplante de medula óssea (HUSSEIN *et al.*, 1995).

O GM-CSF recombinante pode ser obtido através da modificação genética de leveduras, bactérias e células animais, sendo o padrão de glicosilação final determinado pelo organismo transgênico (DORR, 1993). O GM-CSF humano em sua forma natural ocorre como uma proteína de glicosilação variável, com massa molar entre 18 e 32 kDa, e 14 kDa quando não glicosilado, com uma seqüência de 127 resíduos de aminoácidos (FORNO *et al.*, 2004).

3.3. *Sistemas de cultivo e modos de operação*

Células animais são na natureza, em sua maioria, dependentes de ancoragem, ou seja, necessitam de uma superfície sólida para aderirem e se proliferarem. Entretanto, linhagens derivadas de células sangüíneas ou tumorais, assim como linhagens normais, que passaram por um processo de adaptação, são capazes de crescer em suspensão. Células das linhagens CHO e BHK (*Baby hamster kidney cells*, células renais de hamster), muito usadas industrialmente para a produção de biofármacos e vacinas, são passíveis de adaptação ao crescimento em suspensão, podendo ser cultivadas em sistemas agitados.

O uso de culturas de células animais em larga escala tornou-se mais comum na década de 1980, gerando assim necessidade de melhorar as tecnologias tradicionais que vinham sendo utilizadas. As peculiaridades de células animais, quando comparadas a microorganismos, passaram a orientar desenvolvimentos nessa área. A questão da sensibilidade das células às tensões de cisalhamento, por exemplo, foi tratada com maior atenção, assim como a baixa taxa específica de crescimento, a baixa produtividade específica e a inibição por produtos de seu próprio metabolismo (especialmente amônia e lactato) (AUGUSTO e OLIVEIRA, 2001).

Existem diferentes técnicas para o cultivo de células de mamíferos, tanto aderentes quanto independentes de suporte. Para as primeiras, utilizam-se frascos T estáticos ou garrafas rotatórias, em menor escala, e biorreatores de fibras ocas ou sistemas com microcarregadores, quando maiores escalas de produção são requeridas.

Para células independentes de suporte, cultivadas em suspensão, são empregados frascos agitados do tipo *spinner* (pequena escala) e biorreatores agitados ou do tipo *air lift* (maior escala). Para a produção comercial de biofármacos, tem-se consolidado o uso de cultivos em suspensão (LUBINIECKI, 1998), utilizando-se biorreatores do tipo tanque agitado, uma vez que concentrações homogêneas de células, nutrientes, metabólitos e produto podem ser mantidas, permitindo melhor

monitoramento e controle do cultivo (MERCILLE *et al.*, 2000) e extrapolação de escala facilitada (BIRCH e ARATHOON, 1990).

A operação dos sistemas de cultivo pode ser feita de quatro diferentes modos (Figura 3.2A): em batelada, batelada alimentada, sistema contínuo simples e contínuo com reciclo celular (perfusão) (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

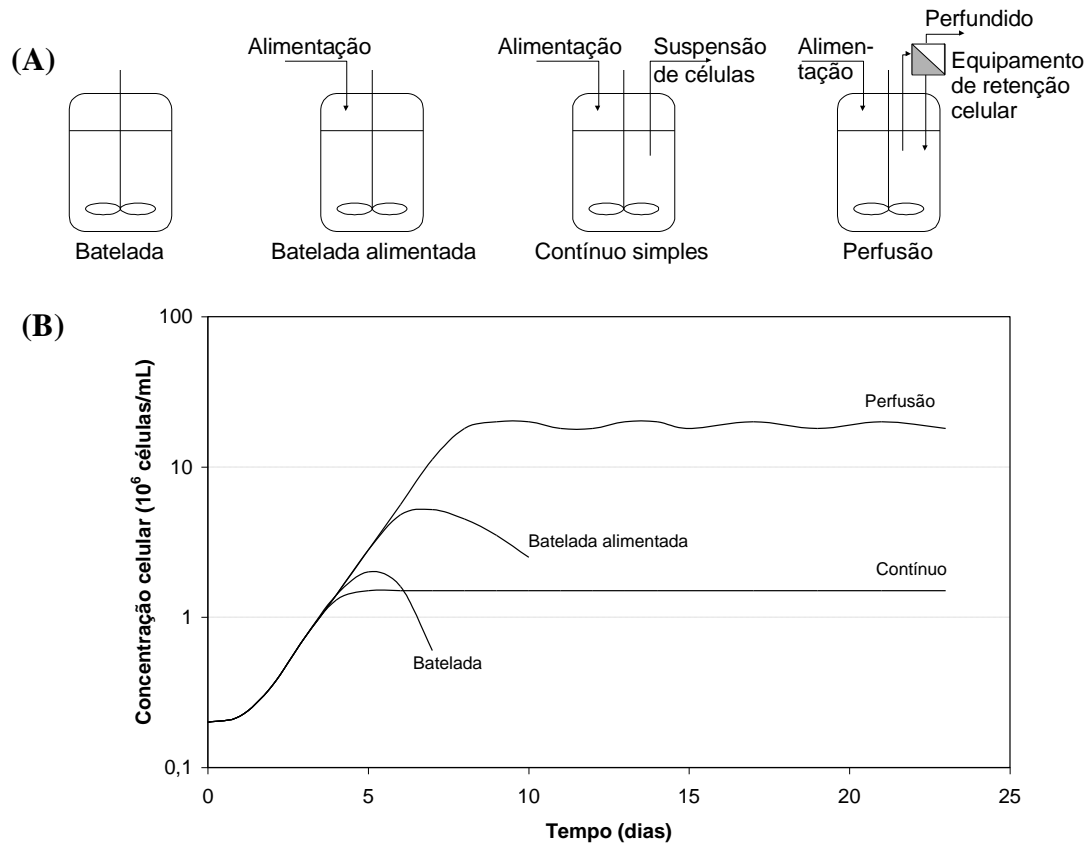


Figura 3.2 – Modos de operação de biorreatores. (A) Esquema de diferentes modos de operação de biorreatores com células animais em suspensão (CASTILHO e MEDRONHO, 2002). (B) Comparação das concentrações celulares obtidas em função do modo de operação de biorreatores (adaptado de GRIFFITHS, 1992).

A principal característica que difere estes modos de operação é o modo de alimentação de nutrientes e remoção de meio exaurido e produto. Cada um destes métodos apresenta vantagens e desvantagens, de modo que a escolha do modo de operação é um parâmetro de suma importância na definição do processo produtivo (KADOURI e SPIER, 1997).

No cultivo em batelada, o meio de cultivo é adicionado ao biorreator e, em seguida, o mesmo é inoculado com células. Não ocorre adição nem remoção de meio de cultivo do biorreator durante todo o processo. Desta forma, as células se proliferam,

consumindo os nutrientes e produzindo metabólitos e produto, os quais podem atingir concentrações inibitórias. Assim, a progressiva exaustão de nutrientes e acúmulo de metabólitos resulta em diminuição de crescimento celular e ativação dos mecanismos de morte celular (necrose e apoptose). Por isso, embora seja um processo simples e bastante popular, a operação em batelada expõe as células animais a contínuas variações das condições ambientais, propiciando a obtenção de concentrações celulares máximas relativamente baixas, de cerca de 2×10^6 células/mL, em períodos de cultivo relativamente curtos (Figura 3.2B), o que resulta em baixas produtividades (TOKASHIKI, *et al.*, 1990; FUSSENEGGER e BAILEY, 1999). No entanto, é um cultivo que permite mais fácil controle e está menos sujeito à contaminação.

A batelada alimentada consiste na realização de uma batelada inicial, à qual se segue um período em que se passa a adicionar o meio de cultivo de forma contínua ou intermitente, em condições de volume variável. A concentração de nutrientes no biorreator pode ser, desta forma, ajustado para promover condições adequadas ao crescimento celular, porém, como não há remoção de meio de cultivo, ainda ocorre o acúmulo de metabólitos (TOKASHIKI *et al.*, 1990). Comparado ao sistema em batelada, este processo permite períodos de cultivos mais prolongados e a obtenção de concentrações celulares mais elevadas (Figura 3.2B), aumentando a produtividade do sistema. Entretanto, a inibição do crescimento celular pode ocorrer pelo acúmulo de metabólitos, como lactato e amônia. Estudos relatam a otimização deste sistema através da adição de galactose e glutamato em conjunto com glicose e glutamina, de forma a reduzir o acúmulo de amônia e lactato através da exploração de vias metabólicas alternativas, aumentando o período de operação do biorreator (ALTAMIRANO *et al.*, 2000).

O modo de operação contínuo simples consiste, após um período inicial de propagação em batelada, na ininterrupta alimentação do biorreator com meio de cultivo, com contínua remoção da mesma quantidade de suspensão celular. Assim, opera-se a volume constante e em estado estacionário, de modo que as concentrações de células, nutrientes, metabólitos e produto permanecem constantes ao longo do tempo. A vazão de alimentação do biorreator é fixada de acordo com a taxa específica de crescimento das células, de modo a evitar arraste completo das mesmas do biorreator. Neste processo, os nutrientes são constantemente renovados e o acúmulo de metabólitos é evitado, resultando em condições ambientais estáveis por um longo período de tempo. No entanto, o inconveniente deste processo reside no fato de não ser possível alcançar

altas concentrações celulares (Figura 3.2B), devido à baixa velocidade específica de crescimento das células, que limita a vazão de alimentação de nutrientes aplicável para que não ocorra o arraste completo das células (TOKASHIKI *et al.*, 1990).

Os processos contínuos com reciclo celular, conhecidos como sistemas em perfusão, possibilitam a constante renovação do meio de cultivo, associada à retenção das células no biorreator. Assim como nos processos contínuos simples, o controle de parâmetros como oxigênio dissolvido, pH e concentração de substrato é facilitado, os produtos secundários tóxicos são continuamente removidos e o produto de interesse é continuamente recuperado (CASTILHO e MEDRONHO, 2002). Deste modo, o curto período de permanência do produto no interior do biorreator (inferior a 1 dia) é adequado à produção de proteínas lábeis e sensíveis à degradação enzimática (KADOURI e SPIER, 1997). O período improdutivo do sistema é relativamente pequeno em comparação ao tempo total de operação, limitando-se à fase de crescimento inicial, operada em batelada.

A operação do sistema em perfusão se prolonga por elevados períodos de tempo (Figura 3.2B). Elevadas concentrações celulares são mantidas devido à retenção celular, propiciando maiores concentrações do produto de interesse sob altas vazões de alimentação e coleta de produto, resultando em produtividades aproximadamente dez vezes superiores às obtidas em batelada e batelada alimentada. Quando operado de forma adequada, é possível a operação em estado quase estacionário e com eficiente controle da fisiologia celular, fornecendo o que alguns autores denominam “estado estacionário fisiológico” (MATANGUIHAN *et al.*, 2000).

3.4. Equipamentos de retenção celular para cultivos em perfusão

Apesar das diversas vantagens associadas aos sistemas em perfusão, trata-se de um modo de operação ainda não largamente difundido em escala industrial. Isto se deve, principalmente, à necessidade de emprego de equipamentos de separação que promovam, de forma eficiente, a retenção das células no biorreator (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

Idealmente, os dispositivos de retenção celular devem apresentar as seguintes características:

- devem permitir operação e desempenho estáveis por longos períodos de tempo, de modo que a interrupção do processo não se dê em função da falência do separador;
- devem propiciar elevadas eficiências de separação, maximizando a concentração de

células viáveis no biorreator;

- devem ser de fácil limpeza, esterilização e uso;
- não devem causar danos às células, o que é especialmente importante devido à ausência de parede celular em células animais e à sua consequente sensibilidade a tensões de cisalhamento;
- não devem induzir alterações no metabolismo celular e na qualidade do produto, tal como no padrão de glicosilação.

Diferentes tipos de equipamentos têm sido utilizados para reter as células no interior de biorreatores operando em perfusão. Muitos são equipamentos tradicionais, adaptados à separação de células animais, tais como aqueles baseados na separação por sedimentação gravitacional, em campo centrífugo (centrífugas e hidrociclones) e por filtração (*spin-filters* e filtros com membranas). Desenvolvimento de equipamentos alternativos, tais como filtros dielétricos e separadores ultra-sônicos, também têm sido reportados (WOODSIDE *et al.*, 1998).

A diferença de densidade entre a célula e o meio de cultivo é o princípio de separação no qual se baseiam centrifugação e sedimentação, sendo a velocidade terminal da partícula fator determinante no processo. Como as células animais apresentam velocidade terminal muito baixa em campos gravitacionais, visto que as densidades de fluido e sólido são semelhantes, isto se reflete na necessidade de elevadas áreas para sedimentação e em longos tempos de exposição das células ao ambiente não oxigenado do sedimentador (SEARLES *et al.*, 1994). Sedimentadores do tipo lamelado, que propiciam elevadas áreas de sedimentação em equipamentos relativamente compactos, apresentam a desvantagem de possibilitarem adesão celular em suas lamelas, gerando a necessidade de revestimentos especiais ou de emprego de vibração para evitar entupimentos (CASTILHO e MEDRONHO, 2002).

A velocidade terminal das células pode ser ampliada com a aplicação de um campo centrífugo, tal como em centrífugas e hidrociclones. No entanto, o uso de centrífugas contínuas para retenção celular, dependendo da intensidade do campo centrífugo, pode expor as células a elevadas tensões cisalhantes. Além disso, quando empregadas para retenção celular, pode ocorrer a obstrução dos canais de saída (JÄGER, 1992). Soma-se a isto a presença de partes móveis, que eleva a complexidade mecânica, torna obrigatório o emprego de selos mecânicos, dificulta a manutenção da esterilidade e eleva o custo dos equipamentos.

Hidrociclones, embora empreguem, tal como centrífugas, a sedimentação em campo centrífugo como princípio de separação, não possuem partes móveis e são dispositivos de fácil operação e previsão de desempenho. O campo centrífugo é criado pelo movimento em espiral do fluido, visto que a suspensão é alimentada tangencialmente a um corpo cilíndrico. O campo criado permite separar as partículas com diferentes densidades e/ou tamanhos, contidas na suspensão. Assim, no orifício inferior (*underflow*), são coletadas partículas com maior densidade ou tamanho e, no orifício superior (*overflow*), podem ser obtidas as partículas com menor densidade ou tamanho. Sua aplicação na separação de células animais é recente (LÜBBERSTEDT *et al.*, 2000; PINTO *et al.*, 2005; PINTO, 2007), porém os altos níveis de eficiência de separação obtidos, associados à manutenção da viabilidade celular, demonstram que seu uso como equipamento de retenção celular em processos em perfusão é promissor. Embora hidrociclones proporcionem níveis de tensão cisalhante relativamente altos, o baixo tempo de residência das células no interior do equipamento, da ordem de frações de segundos, explica porque não foram observados danos às células nem ativação de mecanismos de morte celular por apoptose (MEDRONHO *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2005; PINTO, 2007).

Sistemas baseados em filtração, tais como *spin-filters* e módulos de filtração tangencial com membranas, também vêm sendo empregados em processos em perfusão. O principal fator limitante destes sistemas refere-se à obstrução progressiva do meio filtrante, decorrente do acúmulo de células, *debris* celulares e macromoléculas em sua superfície (VAN REIS e ZYDNEY, 2001). Além de limitar a vazão de filtrado e reter compostos de tamanho maior do que o esperado, tal obstrução progressiva reduz o tempo de operação do processo (WOODSIDE *et al.*, 1998).

Spin-filters consistem de malhas filtrantes rotatórias, geralmente posicionados internamente no biorreator, de modo que sua falência representa também o término do processo. Entretanto, quando posicionados externamente ao biorreator, é possível tentar a sua substituição por outro dispositivo idêntico, para fins de continuidade do cultivo em perfusão. Entretanto, esta substituição envolve riscos de contaminação do biorreator.

Sistemas de filtração com membranas, por sua vez, geralmente são operados externamente ao biorreator, permitindo a sua substituição no caso de ocorrência de incrustação da membrana. Estes sistemas, baseados em membranas de microfiltração, apresentam completa retenção celular, facilitando as etapas subseqüentes de tratamento, assim como simplicidade de operação e facilidade de ampliação de escala. Eles

consistem de módulos contendo membranas planas ou tubulares, operados em modo tangencial (Figura 3.3), onde a suspensão a ser filtrada é alimentada paralelamente à superfície da membrana, e o fluido permeia através da membrana devido à diferença de pressão entre a corrente de alimentação e de permeado. A elevada tensão de cisalhamento presente na superfície da membrana, decorrente da alimentação tangencial, reduz o acúmulo de células, *debris* celulares e macromoléculas junto à mesma, minimizando a ocorrência dos fenômenos de incrustação e polarização por concentração e, conseqüentemente, mantendo o fluxo de filtrado quase-estacionário por um longo tempo (RIPPERGER e ALTMANN, 2002).

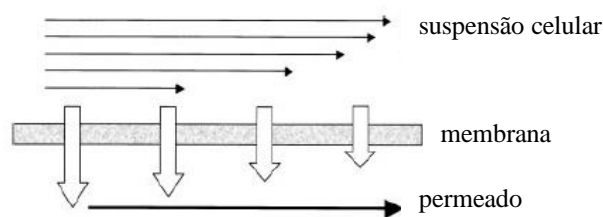


Figura 3.3 – Representação esquemática da filtração tangencial (adaptada de VOISARD *et al.*, 2003).

Dentre as técnicas alternativas desenvolvidas recentemente, a separação ultrassônica se destaca. Ela baseia-se no emprego de forças acústicas, as quais atuam sobre as células em um campo de ondas estacionárias, proporcionalmente às diferenças de compressibilidade e densidade existentes entre as células e o meio de cultivo. Este campo ultrassônico gera agregados de células e aumenta o seu tamanho, resultando em um aumento de velocidade terminal que propicia a sedimentação dos mesmos e obtenção de elevadas eficiências de separação (95 a 100%). Entretanto, seu uso introduz energia no sistema e pode ocorrer aumento de temperatura, diminuindo a viabilidade celular e prejudicando a obtenção de proteínas termolábeis (PUI *et al.*, 1995). DOBLHOFF-DIER e colaboradores (1994) buscaram resolver este problema com a inserção de uma camisa de resfriamento. Por outro lado, os filtros acústicos apresentam baixa capacidade para operar em biorreatores de grande porte, e já foi observado que o aumento da taxa de perfusão e da concentração celular resulta em uma queda significativa da eficiência de separação (SHIRGAONKAR *et al.*, 2004).

Assim, pode-se concluir que a quase totalidade dos equipamentos de retenção de células animais tem apresentado limitações (WOODSIDE *et al.*, 1998; CASTILHO e MEDRONHO, 2002; VOISARD *et al.*, 2003), tais como a colmatação progressiva das

membranas (KAWAHARA *et al.*, 1994), a adesão celular nas paredes de sedimentadores (BATT *et al.*, 1990), as variações de temperatura no separador ultrassônico e o entupimento dos canais de saída de centrífugas contínuas (JÄGER, 1992). Isto demonstra a necessidade de desenvolvimento de novos equipamentos ou geometrias alternativas de equipamentos de retenção celular que possam propiciar, simultaneamente, altas eficiências de separação, elevada estabilidade e ausência de danos às células.

3.5. *Processos de purificação dos produtos*

Após a etapa de cultivo e separação celular, seguem-se, em um processo biotecnológico, as etapas de recuperação e purificação do bioproduto (*downstream processing*). Tipicamente, e em especial no caso de bioprodutos de uso terapêutico, o grau de pureza final é fator essencial para permitir a comercialização do produto. Por isso, para promover a purificação do bioproduto de interesse a partir da complexa e diluída mistura (sobrenadante de cultura celular), são empregados múltiplos estágios de processamento. Os múltiplos estágios de processamento baseiam-se em diferentes técnicas de purificação, que exploram diferentes princípios de separação e apresentam diferentes desempenhos, em termos de capacidade, rendimento, resolução e custo (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Métodos de purificação comumente utilizados, propriedades exploradas para promover a separação e características de desempenho de cada técnica (MORAES *et al.*, 2007).

Princípio de Separação: Propriedade Explorada	Técnica	Capacidade	Rendimento	Resolução	Custo
Solubilidade	Extração Líquido-Líquido	Alta	Alto	Baixa	Baixo
	Precipitação Fracionada	Alta	Alto	Baixa	Baixo
Tamanho	Microfiltração, Ultrafiltração, Diálise	Alta	Médio	Baixa	Baixo
	Cromatografia de Exclusão Molecular	Muito baixa	Alto	Média	Médio
Carga Elétrica	Cromatografia de Troca Iônica	Média	Médio	Média	Médio
Especificidade de Interação com Ligantes	Cromatografia de Afinidade	Média-baixa	Baixo	Muito alta	Alto
Hidrofobicidade Superficial	Cromatografia de Fase Reversa	Média	Médio	Alta	Alto
	Cromatografia de Interação Hidrofóbica	Média	Médio	Média	Médio

Por envolverem múltiplas etapas, consistindo de técnicas de purificação por vezes sofisticadas, com perdas inerentes de produto a cada estágio, que acarretam em

baixos rendimentos globais, os processos de recuperação e purificação do produto podem responder por até 90% dos custos totais de produção (CUNHA *et al.*, 2003).

Destes custos totais de produção, a fração relativa à recuperação do produto está, portanto, fortemente relacionada ao número de estágios envolvidos, uma vez que o tempo de processamento cresce e o rendimento do produto decresce com o aumento do número de estágios. Uma forma de reduzir a quantidade de estágios de recuperação e purificação do produto é utilizar técnicas de alta resolução, tais como a cromatografia de afinidade.

A cromatografia de afinidade tem como base a interação bioespecífica reversível entre a proteína de interesse e um ligante, sendo, portanto, ideal para a purificação de proteínas que se encontram diluídas em um meio complexo. Em condições ideais, o desenvolvimento de um sistema de afinidade eficiente pode resultar em fatores de purificação de até 1000 vezes em uma única etapa, com recuperação quase completa do produto (ROPER e LIGHTFOOT, 1995).

Na Figura 3.4, representa-se esquematicamente o princípio de separação da cromatografia de afinidade. Em (a), é mostrada a etapa de adsorção, onde o produto de interesse (P) interage com um ligante complementar (L) imobilizado em uma matriz sólida (M). Os demais componentes da alimentação não interagem com o material cromatográfico. Em (b), é mostrada a etapa de eluição, na qual o produto é desorvido através da adição de um contra-ligante (C) ou da alteração das condições ambientais (pH, força iônica ou temperatura, dentre outras), minimizando a intensidade da interação de afinidade.

A alta seletividade e a elevada resolução de separação da cromatografia de afinidade derivam da especificidade de interação entre ligante e adsorvato, que consistem de pares tais como anticorpo-antígeno, enzima-cofator, etc. Estas características permitem que a cromatografia de afinidade seja usada para purificação de substâncias presentes de forma diluída em misturas biológicas complexas, possibilitando que grandes volumes de material de partida sejam aplicados ao material cromatográfico e o produto eluído seja recuperado em pequenos volumes, de modo que, além de elevados fatores de purificação, obtêm-se, também, altos fatores de concentração, geralmente com elevados rendimentos. Estas características permitem que um passo de cromatografia de afinidade seja utilizado em substituição a múltiplos passos consistindo de técnicas menos seletivas, reduzindo o número de estágios de

processamento e, conseqüentemente, comportando um aumento do rendimento global do processo.

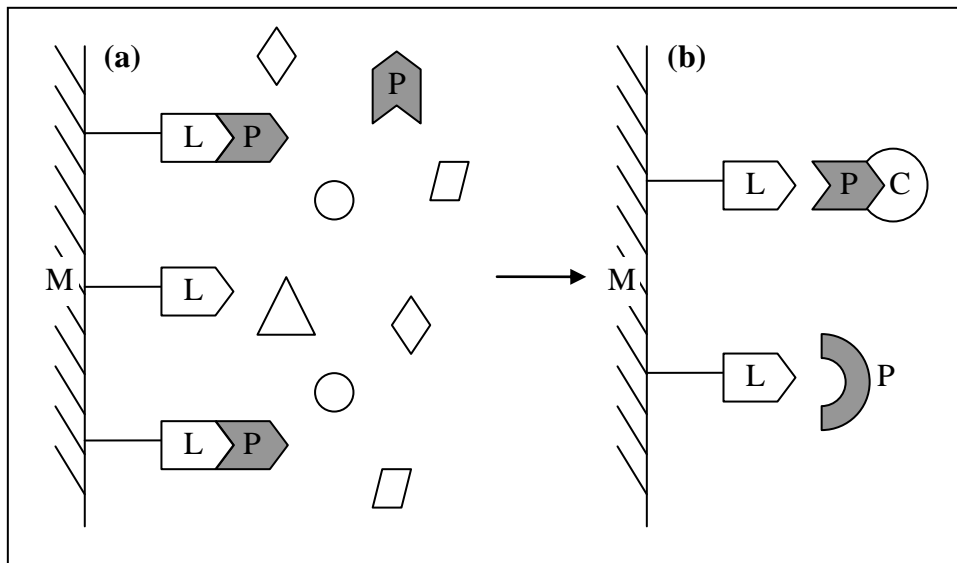


Figura 3.4 – Representação esquemática do princípio de separação da cromatografia de afinidade. Onde (a) etapa de adsorção; (b) etapa de eluição; (M) matriz sólida; (P) produto de interesse; (L) ligante complementar imobilizado na matriz; (C) contra-ligante ou alteração das condições ambientais (pH, força iônica ou temperatura, dentre outras).

Curvas de saturação ou ruptura

Durante a operação de processos cromatográficos executa-se uma alimentação continuada e por um curto espaço de tempo não há saída de proteínas da coluna. Isso ocorre até que a amostra percorra todo o espaço interno da matriz. A partir de então, moléculas não adsorvidas começam a sair do suporte e a curva de concentração de proteínas *versus* tempo tende a subir rapidamente, até que a concentração de saída do sistema (C), se aproxime do valor da concentração da amostra injetada (C_0), estabelecendo uma relação C/C_0 igual a 1.

A curva observada tem perfil assintótico, demonstrando estabelecimento do estado estacionário, em que não há na matriz mais sítios de adsorção disponíveis para as proteínas. A Figura 3.5 apresenta um desenho esquemático, característico deste comportamento, para alimentações em modo frontal nos procedimentos cromatográficos.

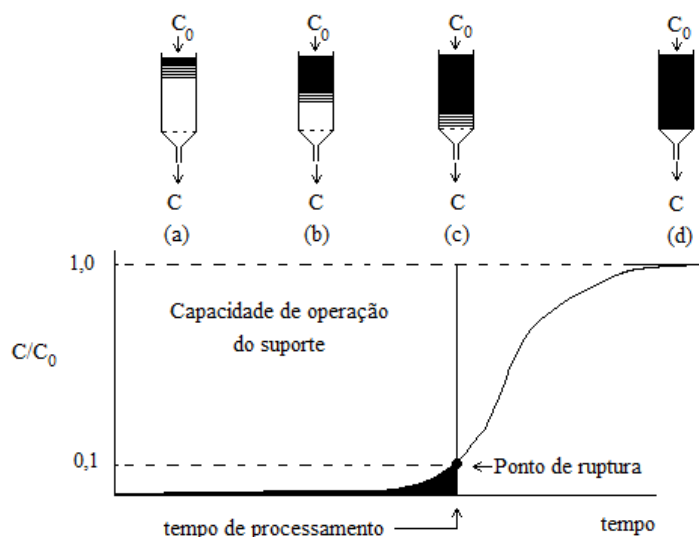


Figura 3.5 - Esquema representativo de uma Curva de Saturação em sistemas cromatográficos. Onde: (C_0) concentração da amostra injetada, (C) concentração de saída do sistema, (a-d) fases da alimentação da matriz (adaptada de SERPA, 2002).

Em processos de purificação industrial de proteínas de alto custo é importante minimizar a perda de produtos na linha de saída, durante a etapa de alimentação, porém é desejável utilizar toda a capacidade de retenção da matriz cromatográfica. Assim, idealmente, a alimentação deve seguir até que inicie a saída da molécula de interesse da coluna. Segundo CHARCOSSET e colaboradores (1995), um valor correspondente a 0,10 para a relação C/C_0 , indica o momento no qual se interrompe a alimentação em aplicações industriais. O valor da massa de proteína injetada até o ponto onde C/C_0 corresponde a 0,10 é chamado de capacidade dinâmica da matriz sob as condições de adsorção estudadas.

A fim de otimizar o processo de separação, e evitar perda de soluto no efluente, é necessário estudar a dinâmica da matriz, que é o resultado de uma complexa mistura de equilíbrios, fluxos não ideais, dispersão axial, volumes mortos, transferência de massa e taxas de adsorção. Muitas das informações necessárias para avaliar o desempenho da coluna estão contidas nas Curvas de Ruptura, que podem ser utilizadas para determinar quanto da capacidade da coluna está sendo utilizada, quanto soluto é perdido no efluente e o tempo de processo (MANSIR *et al.*, 2001).

As informações obtidas através das Curvas de Ruptura, são importantes para a transição dos processos de uma escala laboratorial para média e grande escala, visando a sua aplicação industrial.

3.5.1. *Cromatografia de afinidade em membranas*

Nos processos cromatográficos, a interação entre o produto de interesse e o material cromatográfico ocorre, na maioria dos casos, pela presença de ligantes imobilizados em uma matriz ou suporte. Tradicionalmente, estes suportes consistem de partículas geliformes porosas, as quais apresentam problemas de compressibilidade e resistência mecânica. Adicionalmente, o acesso dos solutos aos sítios de adsorção se dá através da sua difusão através dos poros da matriz, que apresentam diâmetro reduzido, resultando em um controle do processo pela lenta difusão nos poros. Estas limitações difusionais intra-partícula acarretam em elevadas quedas de pressão e tornam obrigatória a operação a baixas vazões.

Em função disto, vem sendo proposto, desde a década de 1990, o uso de membranas microporosas como matrizes para a cromatografia (THÖMMES e KULA, 1995). Este tipo de cromatografia, realizada em membranas, pode ser diferenciada da cromatografia convencional em gel, uma vez que, quando o fluido passa através dos poros da membrana, o transporte dos solutos até o interior dos poros é regido por convecção. Este transporte convectivo facilita o acesso da biomolécula aos sítios de adsorção, tornando possível a operação dos sistemas cromatográficos a elevadas vazões e baixas quedas de pressão (GHOSH, 2002).

São propriedades desejáveis para uma matriz cromatográfica características tais como alta permeabilidade, elevada porosidade, estabilidade mecânica, térmica e estabilidade química, disponibilidade de grupos funcionais para imobilização dos ligantes, hidroflicidade, insolubilidade em água, baixa ou nenhuma adsorção não específica, dentre outras (HARRIS e ANGAL, 1995; HAUPT e BUENO, 2000).

Dentre as membranas disponíveis comercialmente, geralmente feitas de copolímeros aromáticos (policarbonatos, polisulfona e poliétersulfona), poliamidas alifáticas (*nylon*) e polímeros como álcool poli vinílico (PVA) e éster de celulose, muitas podem ser empregadas como matriz para a cromatografia em membranas. Cada uma destas matérias-primas necessita de uma preparação diferente para a imobilização do ligante, que pode envolver etapas de recobrimento da membrana com material hidrofílico, no caso de membranas hidrofóbicas, e ativação da membrana, para geração de grupos reativos para o acoplamento do ligante de afinidade (KLEIN, 2000). A ativação das membranas e a imobilização dos ligantes são realizadas utilizando-se métodos similares àqueles empregados para os géis. A imobilização do ligante pode ser realizada diretamente na membrana ou através de moléculas espaçadoras, que

minimizam possíveis efeitos de impedimento estérico na interação ligante-produto de interesse.

As membranas poliméricas são preparadas com duas geometrias básicas: plana e cilíndrica, sendo ambos os tipos acondicionados em cartuchos ou módulos (HAUPT e BUENO, 2000; GHOSH, 2002). Dentre as membranas cilíndricas, as mais utilizadas apresentam diâmetro reduzido (geralmente na faixa de 0,25 a 2,5 mm) e proporcionam elevadas relações área superficial/volume (GHOSH, 2002).

Na literatura, encontram-se reportados diferentes exemplos de uso de membranas planas e fibras ocas para separações cromatográficas de biomoléculas. BRANDT *et al.* (1988) estudaram membranas de afinidade de ambas as configurações. No caso de membranas planas, o ligante empregado foi gelatina porcina, com o objetivo de purificar fibronectina de plasma humano. No caso das fibras ocas, Proteína-A de *S. aureus* foi empregada como ligante para a purificação de imunoglobulina G. Em ambos os casos, a capacidade adsortiva e a eficiência de utilização dos ligantes foi elevada e, quando comparada com uma coluna cromatográfica baseada em matriz de agarose quanto à capacidade de processamento, esta mostrou ser 24 vezes superior no caso das membranas.

NACHMAN (1992) comparou um módulo de membranas de imunoafinidade baseadas em fibras ocas com colunas cromatográficas contendo géis para a purificação do biofármaco interferon $\alpha 2a$ humano recombinante. A saturação da membrana e conseqüente ruptura do soluto ocorreu posteriormente para as membranas do que para as duas colunas cromatográficas testadas. Em outro exemplo de aplicação dado por esta autora, relativo à purificação de interleucina-2 recombinante, foi verificado que o produto pôde ser recuperado com elevados rendimentos e altos níveis de pureza, o que foi creditado à ausência de limitações difusionais e conseqüente facilidade de acesso ao ligante.

Entretanto, cabe ressaltar que o uso de membranas para fins cromatográficos também está sujeito a problemas de concentração por polarização e incrustação. Assim, torna-se recomendável a operação do sistema em modo tangencial. Contudo, neste caso, deve-se atentar para o fato de que módulos convencionais de filtração tangencial podem acarretar variações significativas na queda de pressão através da membrana ao longo da membrana, propiciando um fluxo não-homogêneo através da mesma, com conseqüente saturação rápida dos sítios de adsorção próximos à entrada do módulo. Isto causa ruptura prematura do soluto, com perda de produto e baixa eficiência de utilização do

ligante nas demais áreas do material adsorvente. Por isso, uma aplicação mais difundida de membranas de adsorção em processos industriais de purificação de proteínas requer o desenvolvimento de módulos de geometria e hidrodinâmica adequadas.

3.5.2. Processos integrados de cultivo e purificação

Outra vantagem importante da utilização de membranas microporosas como suportes para a cromatografia consiste na possibilidade de aplicação direta de suspensões contendo células ou *debris* celulares, possibilitando a integração de etapas de separação de células e purificação primária do produto. FRIEDRICHS *et al.* (2000) empregaram membranas de troca aniônica baseadas em fibras ocas de *nylon* para remover heparina de sangue humano contendo 40% (v/v) de células. KRAUSE *et al.* (1991) demonstrou a aplicação de membranas de afinidade operadas em modo tangencial para promover a separação da enzima malato-desidrogenase a partir de homogeneizado contendo *debris* de *E. coli*, tendo obtido rendimentos de 90%. No caso de biofármacos, foi reportado, com bons resultados, o emprego de membranas de afinidade contendo lisina imobilizada visando à purificação de t-PA a partir de meio de cultivo contendo células CHO (VOGEL *et al.*, 2002).

A integração da separação celular com a purificação primária permite, adicionalmente, acoplar a adsorção do produto diretamente à etapa de cultivo celular, no caso de processos em perfusão. Esta estratégia foi empregada por CASTILHO *et al.* (2002b), que realizou a purificação de um anticorpo monoclonal anti-HIV simultaneamente ao cultivo em perfusão de células CHO. Os autores empregaram como módulo um filtro de disco rotativo projetado empregando fluidodinâmica computacional (CASTILHO e ANSPACH, 2003), onde a presença do rotor promovia uma queda homogênea de pressão através da membrana em toda a membrana e permitia um efetivo controle da incrustação.

Entretanto, para que a purificação do produto possa ser realizada na presença de células, em especial no caso de integração com o cultivo em perfusão, torna-se essencial o emprego de módulos de hidrodinâmica adequada, capazes de permitir um eficiente controle da incrustação e uma operação estável por períodos prolongados.

Neste contexto, visando a superar os problemas relacionados à incrustação e à ruptura prematura de solutos em módulos de filtração tangencial, a fluidodinâmica computacional (CFD) parece ser uma ferramenta útil para a otimização da geometria e das condições operacionais de módulos de membranas de adsorção. A CFD pode

auxiliar no desenvolvimento de módulos que conjuguem quedas homogêneas de pressão através da membrana, níveis de tensão cisalhante adequados para evitar a incrustação sem causar danos às células, assim como elevada densidade de empacotamento das membranas.

3.6. *Fluidodinâmica computacional*

A fluidodinâmica computacional (CFD) é uma ferramenta computacional que engloba soluções numéricas das equações de conservação do momento (equação do movimento) e da massa (equação da continuidade), eventualmente acopladas a qualquer outra equação de conservação, como as equações da energia ou de concentração de espécies químicas. Assim, como esta ferramenta emprega uma simulação baseada em uma geometria virtual ao invés de construção de módulos e condução de testes, ela permite, além da redução de custos e de tempo de obtenção de resultados, simular escoamentos que possuem aferição experimental complicada. Pode-se citar como exemplos de tais simulações: simulações de grandes equipamentos (navios, aviões, etc.), simulações que apresentem risco (explosões, poluição, radiação, etc.) e ainda situações físicas (previsão do tempo), podendo ser, portanto, empregada em análises de segurança, em hidráulica, na área aeroespacial e nos setores automotivo, biomédico, de processos químicos, naval, óleo e gás, geração de energia e esportes (VERSTEEG E MALALASEKERA, 1995).

De forma resumida, ao trabalhar-se com CFD, descreve-se o escoamento de fluidos com equações diferenciais parciais, as quais são discretizadas, transformando-se em um sistema algébrico, que é resolvido e validado. Mas para isto, é necessária uma grande compreensão do problema, para que se possa descrevê-lo adequadamente (existência de transferência de calor, de reação química, entre outros) para, conseqüentemente, utilizar-se de equações e modelos adequados à correta solução do problema (equações de energia, de transferência de massa, equações termodinâmicas).

Os códigos de CFD, comerciais ou não, são estruturados em torno de algoritmos numéricos que podem resolver os problemas de escoamento de fluidos, contendo três elementos principais: um pré-processador, um *solver* e um pós-processador, sendo que as limitações apresentadas referem-se principalmente aos modelos físicos, aos modelos geométricos (detalhamento e robustez) e aos detalhes numéricos (convergência, estabilidade e resolução numérica). Relacionados aos passos descritos acima, CFD pode ser feita pela descrição da geometria (domínio) e geração de malha, especificação das

condições de escoamento (propriedades físicas, condições de contorno e inicial), seleção dos modelos, discretização, especificação dos parâmetros numéricos, solução do escoamento e pós-processamento (análise e visualização).

3.6.1. Descrição da Geometria

São feitas simplificações e hipóteses, integração com ferramentas de CAD, desenhos de engenharia, coordenadas em sistemas cartesianos (x, y, z) , cilíndrico (r, θ, z) e esférico (r, θ, ϕ) . O problema real deve ser definido em termos espaciais de forma que limite possibilidades de instabilidade numérica no processamento futuro (como ângulos reduzidos), não contenha lacunas (*gaps*) na geometria, entre outros.

Cabe destacar que a geometria empregada nas simulações representa o fluido, ou seja o domínio que estará sujeito às condições pré-determinadas, e não o equipamento em si.

3.6.2. Geração da malha

A criação de uma malha, que divide o espaço geométrico do problema em pequenos elementos, permite que as equações sejam resolvidas, empregando métodos numéricos, para cada um dos elementos criados, gerando um sistema de equações, sendo que o esforço computacional necessário será função do número de elementos gerados. Os balanços são feitos de forma que tudo que deixa os limites de um elemento, entra no elemento vizinho, havendo conservação da massa.

A malha a ser confeccionada depende da complexidade da geometria, da acurácia requerida, da localização dos fenômenos de interesse e da capacidade computacional disponível (FONTES *et al.*, 2005).

As malhas em questão podem ser estruturadas (baseada em células hexaédricas) ou não estruturadas (baseadas em elementos tetraédricos, piramidais, hexagonais e outros). Um sistema pode empregar um conjunto de ambas, sendo chamada de híbrida, e ocorre, por exemplo, quando em locais importantes para o escoamento emprega-se malha estruturada para refinamento e malha não estruturada para o resto da geometria. Segundo FONTES e colaboradores (2005) quando são empregadas malhas não estruturadas, cada elemento pode ter um número de vizinhos diferente, podendo ser o formato de cada um deles diferente, ao contrário da malha estruturada, que não permite variações e adaptações de forma fácil. As malhas não estruturadas são mais difíceis de obter, no entanto, conferem grande flexibilidade ao estudo, possibilitando melhor desempenho na

descrição do problema.

Como mencionado acima, a malha divide a geometria em pequenos elementos, nos quais métodos numéricos resolvem as equações de conservação diferenciais gerando um sistema de equações algébricas. Estas equações de conservação podem ser descritas de formas distintas: a integral e a diferencial.

A forma integral é dada pela Equação 3.1:

$$\int_{V(t_2)} Q dV - \int_{V(t_1)} Q dV + \int_{t_1}^{t_2} \oint_{S(t)} \vec{n} \cdot \vec{F} dS dt = \int_{t_1}^{t_2} \int_{V(t)} P dV dt \quad (3.1)$$

onde Q é uma variável conservativa de interesse por unidade de volume (escalar ou vetorial), V(t) é o volume de controle (domínio do fluido), n é o vetor normal à superfície em qualquer ponto desta, F é o somatório dos fluxos de Q através da superfície do volume de controle (vetores ou tensores), S(t) é a área superficial do volume de controle e P é a taxa de produção de Q por unidade de volume.

Se todas as variáveis são contínuas no tempo, então se obtém uma expressão mais simples, tal como a Equação 3.2:

$$\frac{d}{dt} \int_{V(t)} Q dV + \oint_{S(t)} \vec{n} \cdot \vec{F} dS = \int_{V(t)} P dV \quad (3.2)$$

A forma diferencial da Equação de Conservação pode ser obtida aplicando-se o teorema de Gauss para o fluxo na integral de linha, resultando na Equação 3.3:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} + \nabla \cdot \vec{F} = P \quad (3.3)$$

Os principais códigos de CFD usam o método dos volumes finitos para resolver as equações no domínio de fluido.

Discretização

O passo chave no modelo dos volumes finitos é a integração das equações de conservação no volume de controle. A partir dessas equações integradas, valores para os pontos nas faces dos elementos de controle são encontrados a partir de relações simples entre os pontos nodais e os pontos nodais vizinhos, de forma que a equação gerada se

apresenta na forma discretizada no seu ponto nodal.

Quando o sistema envolve convecção e difusão, o principal problema na discretização do termo convectivo é o cálculo do valor da propriedade transportada ϕ nas faces do volume de controle e seu fluxo convectivo através destas fronteiras. Quando se faz a discretização, a difusão afeta a distribuição da quantidade transportada ao longo dos seus gradientes em todas as direções enquanto que a convecção só afeta a propriedade na direção de escoamento.

3.6.3. Condições do Escoamento e Seleção dos Modelos

A escolha das condições de contorno apropriadas e a seleção dos modelos requerem experiência e conhecimento acerca do problema a ser resolvido. Assim, é necessário descrever os processos em termos de escoamento transiente ou permanente, laminar ou turbulento, fluido newtoniano ou não newtoniano, sistema isotérmico ou não, presença de radiação, se ocorrem reações químicas, se o escoamento é multifásico, multicomponente, se ocorre cavitação, ebulição, etc.

As equações de transporte são aquelas que governam os fenômenos fluidodinâmicos através das leis de conservação de massa, momento e energia. Essas leis físicas de conservação podem ser representadas pelas seguintes afirmativas: a massa de um fluido é conservada; a taxa de variação do momento é igual à resultante das forças em um volume de fluido (segunda lei de Newton); a taxa de variação de energia é igual à soma das taxas de adição de calor e das taxas de trabalho realizados em um volume de fluido (primeira lei da termodinâmica).

Conservação da massa

A Equação da Continuidade pode ser deduzida com base em um balanço de massa em um elemento de volume (Equação 3.4).

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot (\rho \vec{v}) = 0 \quad (3.4)$$

na qual v é o vetor velocidade, ρ é a densidade e t é o tempo.

Conservação do momento

Partindo-se da Segunda Lei de Newton, efetuando-se balanço de forças em

volume diferencial, obtém-se a Equação 3.5:

$$\rho \frac{D\vec{v}}{Dt} = -\vec{\nabla}P - \vec{\nabla} \cdot \vec{\tau} + \rho \vec{g} \quad (3.5)$$

onde P é a pressão, $\vec{\tau}$ é o tensor tensão e \vec{g} é a gravidade. Se o escoamento tem ρ e μ constantes, obtém-se a Equação de Navier-Stokes (Equação 3.6):

$$\rho \frac{D\vec{v}}{Dt} = -\vec{\nabla}P + \mu \nabla^2 \vec{v} + \rho \vec{g} \quad (3.6)$$

Modelos de turbulência

Elevados Re se traduzem por elevadas instabilidades no escoamento. O número de Reynolds fornece uma medida da importância relativa das forças de inércia e forças viscosas.

O regime turbulento é de difícil caracterização, pois não se sabe quando nem onde um turbilhão surgirá, nem por quanto tempo persistirá.

A turbulência é um fenômeno altamente difusivo, rotacional e tridimensional, e é altamente dissipativo. No entanto, devido ao fato de que neste trabalho são empregadas condições de escoamento laminar, os modelos de turbulência não serão aqui discutidos.

Lei de Darcy

A correlação empírica proposta por Darcy para escoamento em meios porosos, também conhecida como lei de Darcy, é válida para escoamentos laminares, ou seja, para baixas velocidades. Nestas condições, o escoamento é dominado pelas forças viscosas. Para escoamento isotérmico unidirecional de fluido newtoniano incompressível em meio poroso isotrópico, a queda de pressão ΔP varia linearmente com a velocidade superficial q (Equação 3.7).

$$\frac{\Delta P}{\ell} = -\frac{\mu q}{k} \quad (3.7)$$

onde k é a permeabilidade do meio poroso, ℓ é a espessura do meio e q é a velocidade

superficial do fluido dada por (Equação 3.8):

$$q = \frac{Q}{A} \quad (3.8)$$

onde Q é a vazão que passa através do meio poroso e A é a área transversal ao escoamento.

3.6.4. Resolução das Equações de Conservação

O *solver* é a parte do pacote computacional que responde pela resolução das equações de conservação discretizadas. Para a resolução de dado problema o *software* segue alguns passos: aproximação de variáveis desconhecidas do escoamento por uma média usando funções simples, discretização pela substituição de aproximações em equações governantes do escoamento, manipulações matemáticas subseqüentes e solução de equações algébricas. A diferença entre estas três estratégias de resolução está na aproximação e no processo de discretização das equações. A etapa de integração no volume de controle distingue o método de volumes finitos de outras técnicas de CFD. A indicação resultante de integração expressa a conservação de propriedades relevantes para cada célula finita.

3.6.5. Análise dos Resultados

O pós-processamento possibilita, basicamente, a visualização dos resultados e a realização de cálculos com as principais variáveis envolvidas no problema. São exemplos de possíveis formas para observar os resultados a tomada da variável num plano ou numa reta que atravesse o domínio, ou ainda o cálculo de valores de variáveis (como massa, velocidade, pressão, entre outras) em uma dada superfície ou região de fronteira do sistema.

CFD foi empregado neste trabalho para permitir um estudo detalhado do escoamento em um filtro de fibras ocas, sendo de particular interesse a pressão nas superfícies interna e externa da membrana. Este é um dos exemplos de situações e locais que não poderiam ser facilmente observados experimentalmente.

4. Metodologia

4.1. Projeto do equipamento de retenção celular

Neste trabalho foi projetado um equipamento de retenção celular, visando obter características adequadas para uso em processo de filtração, tal como baixa incrustação, operação do sistema por longos períodos de tempo, assim como manutenção das condições necessárias à sobrevivência celular, representada principalmente pela tensão de cisalhamento, responsável pelo rompimento da membrana celular.

CFD foi empregada, entre outros motivos, pela limitação de uma determinação experimental da tensão de cisalhamento na superfície da membrana, característica intrínseca do conjunto do processo (por exemplo, da velocidade de escoamento e de características da membrana), que pode somente ser correlacionada com a viabilidade celular, no presente trabalho. No entanto, a elaboração de diversos ensaios com cultivos celulares, promovendo diferentes condições de escoamento e tendo como resposta a redução da viabilidade celular torna-se impraticável, tanto em custo, como com relação ao tempo necessário para o desenvolvimento deste conjunto de experimentos. CFD em cultivos celulares, assim como em outras áreas da engenharia (tal como análise de risco e de segurança) apresenta-se como uma alternativa promissora, não só pela redução de custo, mas também por permitir o acesso a resultados confiáveis de características não mensuráveis experimentalmente.

4.1.1. Planejamento estatístico das simulações

Os métodos estatísticos de planejamento experimental são empregados visando à obtenção de máxima informação, a partir de uma mínima quantidade de experimentos. Assim, para o planejamento racional das simulações de CFD a serem feitas, utilizou-se um planejamento fatorial (3^2), visando determinar os efeitos de três variáveis consideradas de relevância para a hidrodinâmica de um módulo de fibras ocas. As variáveis estudadas foram o diâmetro interno das fibras (D_{int}), o comprimento do casco (L) e o número de fibras por módulo (N). As corridas realizadas e as faixas de valores das variáveis podem ser visualizadas na Tabela 4.1. Os valores codificados (normalizados) equivalentes encontram-se na Tabela 4.2. As faixas de valores estudadas foram selecionadas em função das respectivas ordens de grandeza encontradas na literatura (SERPA, 2002;) para módulos de fibras ocas empregados para a purificação

de biomoléculas.

Tabela 4.1 – Matriz utilizada no planejamento das simulações com fluidodinâmica computacional. As variáveis testadas foram o diâmetro interno da fibra (D_{int}), o número de fibras (N) e o comprimento da fibra (L). São mostrados, também, a espessura da membrana (E_{membr}), o diâmetro externo da fibra (D_{ext}), a área transversal interna por fibra (A_{transv}) e a área total disponível para alimentação das fibras ($A_{transv} \times N$), a área superficial interna (A_{int}) e a área total interna das fibras disponível para permeação ($A_{int} \times N$), empregadas na construção da geometria base para as simulações, considerando diâmetro do casco do módulo (D_{casco}) de 20 mm.

Corrida	Variáveis do planejamento fatorial			Outras propriedades dos módulos estudados					
	L (mm)	N (unidades)	D_{int} (mm)	E_{membr} (mm)	D_{ext} (mm)	A_{transv} (mm ²)	$A_{transv} \times N$ (mm ²)	A_{int} (mm ²)	$A_{int} \times N$ (mm ²)
1	80	130	0,95	0,125	1,2	0,709	92,147	238,76	31038,94
2	80	10	0,95	0,125	1,2	0,709	7,088	238,76	2387,61
3	45	70	0,65	0,125	0,9	0,332	23,228	91,89	6432,41
4	10	130	0,35	0,125	0,6	0,096	12,507	11,00	1429,42
5	45	70	0,65	0,125	0,9	0,332	23,228	91,89	6432,41
6	10	130	0,95	0,125	1,2	0,709	92,147	29,85	3879,87
7	10	10	0,35	0,125	0,6	0,096	0,962	11,00	109,96
8	10	10	0,95	0,125	1,2	0,709	7,088	29,85	298,45
9	80	10	0,35	0,125	0,6	0,096	0,962	87,96	879,65
10	80	130	0,35	0,125	0,6	0,096	12,507	87,96	11435,40

Duas respostas foram consideradas de interesse para a análise: a tensão de cisalhamento máxima na superfície interna da membrana de fibra oca (τ_{max}) e a variação na queda de pressão através da membrana ao longo do comprimento da fibra, denominada $\Delta(\Delta P_{TM})$.

Tabela 4.2 – Matriz codificada das variáveis estudadas, empregadas no planejamento das simulações, correspondente à Tabela 4.1.

Corrida	L	N	D_{int}
1	+1	+1	+1
2	+1	-1	+1
3	0	0	0
4	-1	+1	-1
5	0	0	0
6	-1	+1	+1
7	-1	-1	-1
8	-1	-1	+1
9	+1	-1	-1
10	+1	+1	-1

A primeira resposta foi selecionada por estar relacionada à sensibilidade das células animais e, portanto, ligada à retenção celular. A análise da tensão cisalhante máxima fornece informações sobre a possibilidade de rompimento da célula, quando alimentada ao módulo em questão.

A segunda resposta, a $\Delta(\Delta P_{TM})$, que pode ser determinada através da Equação 4.1, foi selecionada por que um interesse deste trabalho também é a minimização da $\Delta(\Delta P_{TM})$ ao longo da fibra, com o objetivo de evitar uma sub-utilização dos ligantes imobilizados na região final das mesmas, devido à saturação prematura dos sítios disponíveis para adsorção e ruptura do soluto de interesse (*break-through*) na parte inicial da fibra, como discutido no capítulo anterior.

$$\Delta(\Delta P_{TM}) = (P_{interna} - P_{externa})_{entrada} - (P_{interna} - P_{externa})_{saída} = \Delta P_{TMentrada} - \Delta P_{TMsaída} \quad (4.1)$$

Como será discutido no Capítulo 4, os dados de variação na queda de pressão foram analisados estatisticamente com o auxílio do *software* EER (STEPPAN *et al.*, 1998), para fins de avaliação da significância dos efeitos das variáveis estudadas sobre esta resposta e de posterior minimização de $\Delta(\Delta P_{TM})$.

4.1.2. Geometria, malha e condições iniciais e de contorno empregadas em fluidodinâmica computacional

A parte de fluidodinâmica computacional deste trabalho foi realizada empregando-se os *softwares* da empresa ANSYS: para a construção de uma geometria (descrição do volume de interesse para as simulações de CFD) foi usado o *software* Design Modeler 9.0; para a confecção das malhas o CFX Mesh 9.0; e para implementação das condições de contorno, simulação e observação dos resultados o CFX 10.0.

A geometria dos módulos, baseada nos dados da Tabela 4.1, foi obtida como uma fatia de 36 graus, ou seja, um módulo cilíndrico dividido em dez partes. Tendo em vista a formação de um ângulo na parte central do módulo (pelo corte em fatias), foi adotado um plano de corte ($X = 1,5$ mm), removendo a parte angular e, portanto, uma possível dificuldade na confecção da malha (elementos com ângulo interno tendendo a zero). A saída do casco foi admitida como sendo em anel, devido ao fato de se estar

trabalhando com apenas uma fatia do módulo e ser necessária a manutenção da condição de simetria. Assim, foram desenvolvidos módulos em fatia, com 1, 7 ou 13 membranas, que pela condição de simetria representam N de 10 a 130 membranas, com L entre 1 e 8 cm e diâmetros internos entre 350 e 950 μm .

Os sólidos que representam o casco, as membranas e o interior das membranas, para uso nas simulações em CFD foram obtidas conjuntamente, formando um só corpo, de modo que resultam em um só arquivo. A integração entre as malhas, também obtidas em conjunto, mas representando diferentes corpos (casco, membrana e interior da membrana), foi feita usando interpolação (integração de malhas do tipo GGI). Visando facilitar a integração das malhas, assim como reduzir o esforço computacional, foi empregada uma malha não-estruturada na superfície correspondente à seção transversal do módulo, sendo que na superfície de contato da membrana e do casco empregaram-se tamanhos e condições de geração de malha exatamente iguais (condição de refino com prismas com base quadrilátera), a fim de permitir uma boa sobreposição de ambas as malhas neste local. O restante da malha foi elaborado de forma também não-estruturada, mas a partir de prismas com base triangular, com refino na saída do casco e em algumas outras regiões, como será descrito no próximo capítulo.

Assim, foi elaborado um esboço, com cotas e ângulos pré-definidos, formando em uma base bidimensional (a seção transversal da fatia do módulo), com determinado número de membranas, e, a partir desta base, o módulo foi extrusado no comprimento determinado pelo planejamento. A Figura 4.1 permite visualizar de forma resumida as etapas desenvolvidas em CFD para construção da geometria, da malha e definição das condições iniciais e de contorno. A obtenção da geometria e a confecção das malhas usadas em CFD, assim como detalhamentos podem ser observados no Anexo I.

A tubulação que representa a membrana foi considerada um subdomínio poroso com um coeficiente de permeabilidade de $3,3 \times 10^{-15} \text{ m}^2$, valor selecionado da literatura (CASTILHO, 2001). Assumiu-se que o fluxo permeado através da membrana corresponde a 10% da alimentação, visto ser esta uma condição aceitável na operação real. O fluido empregado tem as propriedades físicas da água a 25°C e sua velocidade na entrada da fibra oca é de 1 m/s, sendo a pressão na saída do módulo de 1 atm.

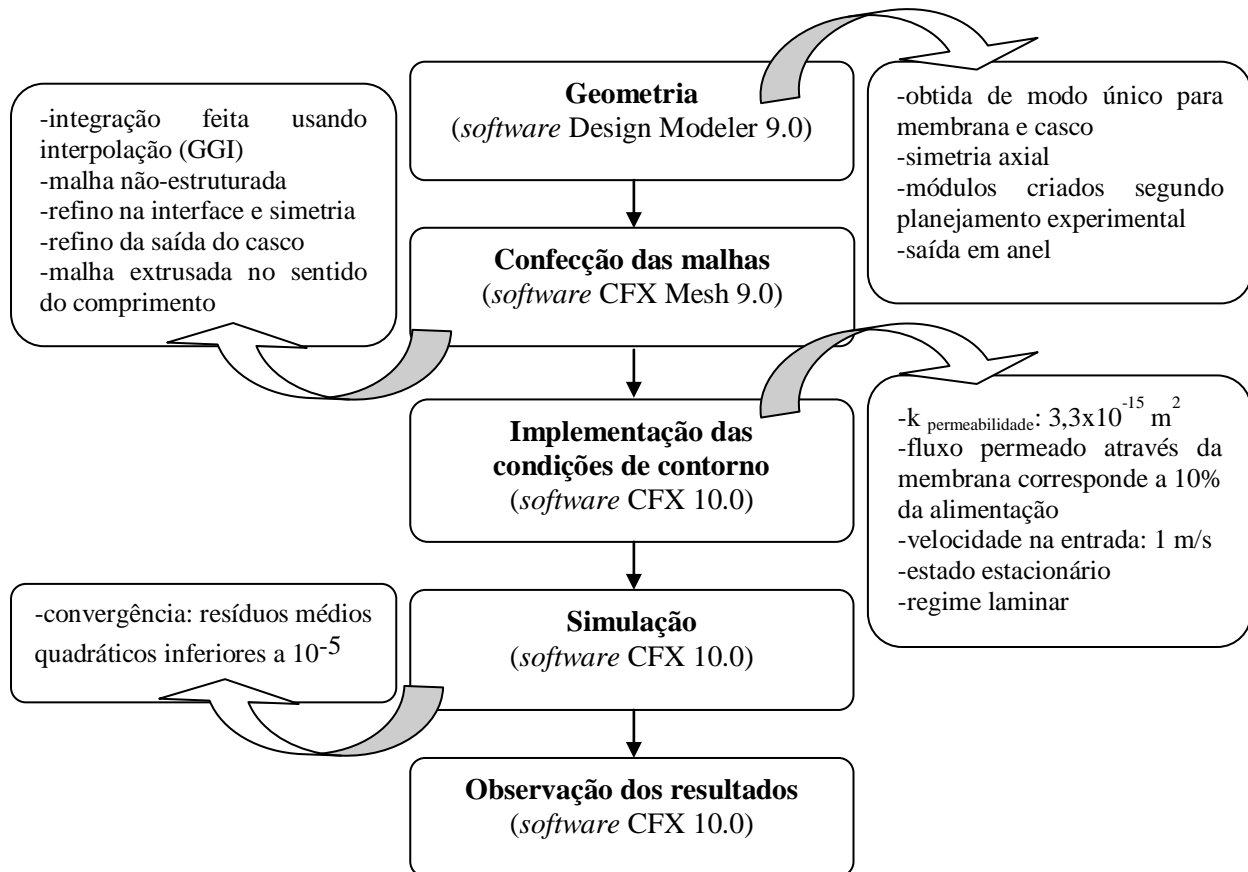


Figura 4.1 – Etapas desenvolvidas em CFD para construção da geometria, da malha e definição das condições iniciais e de contorno.

As simulações foram tridimensionais em estado estacionário, regime laminar e passos de tempo entre 0,001 e 0,008 s para os casos listados na Tabela 4.1. Os passos de tempo são empregados pelo *solver* para discretizar o tempo, de forma análoga ao espaço, que é dividido pela malha. Adotar uma velocidade de escoamento de 1 m/s resulta em um tempo de 0,01 s para que o fluido atravessasse todo o equipamento de 1 cm de comprimento. Sendo assim, empregou-se passos de tempo correspondentes a 1/10 (0,001 s no caso de casco com 1 cm) do tempo de retenção do fluido no equipamento. Adotou-se que, para todas as simulações, a convergência só era obtida quando os resíduos médios quadráticos de todas as equações de conservação eram inferiores a 10^{-5} .

Estas definições de condições de contorno no *software* podem ser visualizadas no Anexo II, onde são apresentadas as condições empregadas nas simulações do planejamento.

4.1.3. Simulação do sistema empregado experimentalmente

Após a obtenção das membranas e do módulo de fibras ocas, com especificação de dimensões de 1 cm de comprimento, 278 µm de espessura de parede, diâmetro externo de 2,015 mm (permitindo somente a inclusão de 40 fibras no módulo final) e coeficiente de permeabilidade (k) de $3,3 \times 10^{-15} \text{ m}^2$, foi simulado o módulo final, empregando tais condições nesta simulação.

Sendo assim, foi construído um novo protótipo, também em fatia de 36 graus, com plano de corte central, contendo 4 fibras. A intenção inicial era colocar um número de membranas correspondente ao planejamento, no entanto, a membrana obtida experimentalmente apresentou diâmetro externo superior ao valor máximo avaliado no planejamento de simulações (1200 µm), mas que pode ser aceita tendo em vista que resultado do planejamento sugere o emprego de membranas com maiores diâmetros.

Foram adotadas condições de refinamento na superfície interna e externa da membrana (regiões de transferência de massa), nas paredes externa do casco e na região de simetria, assim como na região central.

Exceto as características identificadas acima, as demais foram mantidas conforme descritas anteriormente, para as demais simulações em CFD. Deve ser observado que a versão utilizada do *software* CFX (ANSYS) correspondeu então à 11.0, e não mais à versão 9.0, usada inicialmente.

Também foi executado um estudo de malha, visando reduzir o esforço computacional, de modo a obter um resultado das simulações com um número mínimo de pontos e elementos.

As tarefas executadas para o desenvolvimento da geometria e da malha, assim como as condições de contorno adotadas nesta simulação, podem ser observadas nos Anexos I e II, respectivamente.

4.2. Cromatografia de Afinidade

4.2.1. Ensaios cromatográficos de adsorção de GM-CSF para seleção do ligante de afinidade

Com a finalidade de selecionar um ligante adequado para a cromatografia de afinidade, foram realizados ensaios cromatográficos preliminares no equipamento FPLC® System (GE Healthcare) do LabCel – LADEQ – EQ – UFRJ, empregando suportes comerciais contendo os ligantes azul de Cibacron e heparina imobilizados e

diferentes soluções de equilíbrio, eluição e regeneração, visando à purificação de GM-CSF produzido por células CHO. Foram avaliados os sistemas tamponantes acetato de sódio e fosfato de sódio para o ligante heparina e tris-HCl, fosfato-citrato e fosfato para o ligante azul de Cibacron, com eluição através de gradiente de NaCl. Somente o sistema fosfato-citrato também empregou eluição por gradiente de pH.

As vazões empregadas para a fase móvel nas etapas de injeção, lavagem, eluição e regeneração foram, respectivamente, de 1, 2, 2 e 2 mL/min. Primeiramente o sistema foi equilibrado com a solução tampão, seguido da injeção de uma solução contendo GM-CSF. Foram realizados ensaios com alimentação de sobrenadante de cultivo celular de célula CHO-GM-CSF, de GM-CSF comercial e de uma mistura dos dois. Ao fim da injeção, procedeu-se à lavagem, com o mesmo tampão, visando à remoção das proteínas não adsorvidas à membrana. A eluição para remoção das proteínas adsorvidas foi realizada com o aumento da força iônica do meio, com a adição de NaCl, através de um gradiente de 0 a 3 M, na solução tampão. A seguir procedeu-se à regeneração, utilizando NaOH, na concentração de 0,01 M, obtendo a remoção de proteínas de forma drástica, por interferir nas forças hidrofóbicas de adsorção. Ao término da cromatografia, o adsorvente foi lavado com solução tampão de equilíbrio, até a remoção total do hidróxido e foi armazenado em etanol 20%, sob 4°C.

Posteriormente a cada um dos ensaios cromatográficos foram realizados testes de quantificação de proteínas totais, eletroforese SDS-PAGE e imunoenaios do tipo *dot blot* e ELISA nas frações coletadas.

4.2.2. Obtenção do suporte cromatográfico

4.2.2.a) Obtenção das fibras ocas de PEI-PVP

Embora tenham sido feitos esforços no sentido de obter membranas com os valores de diâmetro das fibras planejadas (Tabela 4.1), experimentalmente foram obtidas membranas com diâmetros superiores a 2 mm.

Observa-se que este ganho, em termos de dimensões do diâmetro da membrana pode ser aceito dentro do presente trabalho pois representa um resultado no sentido do maior diâmetro, tal como o resultado obtido no planejamento de simulações.

Deste modo, membranas na forma de fibras ocas foram preparadas por inversão de fases, através de extrusão a frio com a precipitação por imersão. Neste processo de fiação úmida foi empregada uma extrusora (Laboratório PAM – PEQ –

COPPE – UFRJ) através da qual foram bombeadas as soluções de polímero e de líquido interno, sob diferentes condições de fiação, ou seja, variando a distância entre a saída da agulha da extrusora ao banho de precipitação, a vazão e a composição do líquido interno. Um esquema do aparato experimental empregado na extrusão das membranas pode ser visualizado na Figura 4.2.

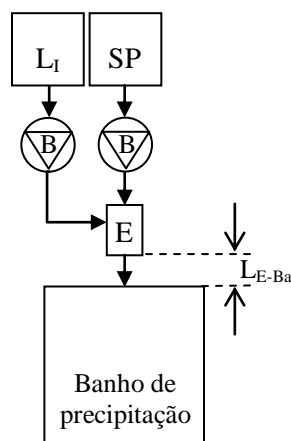


Figura 4.2 – Aparato experimental empregado no processo de preparo de fibras ocas por fiação úmida (adaptado de FRANÇA NETA, 2005). Onde (L_I) solução de líquido interno, (SP) solução polimérica, (B) bombas para alimentação de L_I e SP à extrusora, (E) extrusora e (L_{E-Ba}) distância da saída da extrusora ao banho de precipitação.

A extrusora é composta por dois orifícios concêntricos, sendo que no orifício externo é bombeada a solução polimérica e no interno escoam o líquido interno precipitante, que é responsável por manter o perímetro interno das fibras durante a extrusão, e atuar como frente de precipitação para a superfície interna. O diâmetro do orifício externo foi mantido em 3 mm, estabelecido pelo diâmetro da abertura da peça denominada “capa da extrusora”, construída pela Zamec Usinagem de Precisão Ltda.

A composição em massa da solução polimérica foi mantida constante em 10% de poli(vinilpirrolidona) (PVP), 15% de poli(éterimida) (PEI) e 75% de N-metil-2-pirrolidona (NMP) (solvente). A pressão de extrusão da solução polimérica também foi mantida constante em 7 kgf/cm² (6,865 bar), resultando em uma alimentação de 4 g/min, sem o emprego de estiramento, ou seja, as membranas extrusadas pendiam livremente da saída da extrusora até o banho externo de precipitação, composto por água destilada.

A princípio, como líquido interno foi utilizado uma mistura de 70% de solvente (NMP) e 30% de não solvente (água deionizada). No entanto, devido à deformação do perímetro interno (fenômeno conhecido como *die-swell*), após os ensaios iniciais, foram adicionados 10% de PVP, a uma solução 85% solvente/15% não solvente (resultando

em 10% de PVP; 76,4% de solvente; 13,6% de não solvente), visando obter perímetros internos mais regulares. Os percentuais mencionados são dados mássicos. A vazão do líquido interno foi variada entre 1,3 e 4,3 mL/min.

A distância entre a saída da extrusora e o banho externo de precipitação (L_{E-Ba}), foi variada entre 1 e 29 cm. As diferentes composições de líquido interno, assim como as diferentes distâncias entre a saída da extrusora e o banho externo de precipitação, foram empregadas visando obter diferentes frentes de precipitação da membrana. Cada um dos eventos de fiação, descrito segundo as condições de L_{E-Ba} , vazão e composição de líquido interno podem ser visualizados no Anexo IV.

As membranas obtidas foram então submersas em água destilada a 60°C, em estufa, por um período de 12 horas em recipiente fechado e a seguir foram secas pelo método de troca de solventes, evitando assim colapso dos poros. Tal método consiste em submeter as membranas, oriundas do banho de água destilada e resfriadas a temperatura ambiente, a uma seqüência de banhos de solventes, na ordem etanol 95% e N-hexano, por períodos de 2 horas, sob temperatura ambiente. Após esta seqüência as membranas são deixadas expostas ao ambiente, em capela, para evaporação do solvente residual e completa secagem, por 24 horas.

4.2.2.b) Construção do módulo de filtração

O lote de membranas selecionado segundo suas características morfológicas, que correspondem a distribuição de poros ao longo da espessura de membrana, a presença de poros nas superfícies interna e externa da fibra oca, a ausência de deformação do perímetro interno e as dimensões de acordo com o resultado da simulação empregando CFD, tal como diâmetro interno (D_{ini}), número (N) e comprimento das fibras (L), foi empregado para a confecção de módulo de fibras ocas, para ser utilizado na purificação do biofármaco GM-CSF oriundo de suspensões de células da linhagem CHO.

O casco foi construído a partir de dois tubos de ensaio com rosca com adição de duas saídas laterais, tal como pode ser observado na Figura 4.3. As fibras foram introduzidas longitudinalmente no tubo de vidro, com 2 cm de diâmetro interno. As extremidades das membranas foram fixadas ao tubo utilizando-se uma resina epóxi, que serve também como barreira de separação entre as frações de alimentação e permeado.

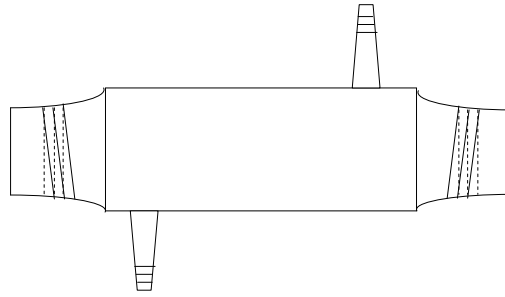


Figura 4.3 – Esquema da carcaça de vidro construída para suportar as membranas.

As membranas contidas no módulo podem ser operadas em diferentes modos: frontal, lavagem interna, espaço do casco e *backflushing* (fluxo inverso do permeado), conforme descrito na Figura 4.4.

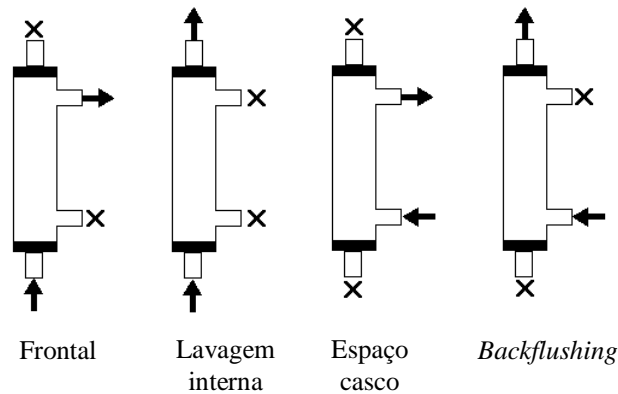


Figura 4.4 – Esquema dos modos de operação das fibras ocas suportadas no módulo de filtração (adaptado de SERPA, 2002).

Neste trabalho a alimentação foi realizada no interior das fibras ocas, em uma das extremidades do módulo e na outra extremidade foi coletado o concentrado (ou retido), enquanto que o permeado foi recolhido no interior da carcaça, a partir das saídas laterais.

Esta operação foi empregada por que, para a filtração a partir do casco, seria necessária a adoção de uma vazão de alimentação maior que a adotada na alimentação interna, a fim de evitar uma possível adesão celular, resultante da deposição de material pela baixa velocidade de arraste das células. Ocorre também que o escoamento do fluido com células em suspensão dentro da fibra oca pode ser mais facilmente controlado que aquele percorrido no exterior, dentro da carcaça. Embora a adoção deste sistema represente uma menor área de filtração (pois corresponde à área superficial interna das membranas), se comparada com a área externa, entende-se como mais adequado para a

filtração tangencial de um fluido contendo células animais, sensíveis à tensão de cisalhamento.

4.2.2.c) Caracterização das fibras ocas

Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV)

Para a caracterização da morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foram preparadas amostras de natureza diferente, de cada condição de fiação: uma fratura sob imersão em N₂ líquido para a visualização da seção transversal da fibra oca e um corte no sentido do comprimento da membrana para a visualização das superfícies interna e externa da membrana. Após tal preparo, as amostras foram metalizadas com ouro, sob atmosfera de argônio (Jeol Ion Sputtering Device, JFC-1500).

Os ensaios de caracterização foram realizados em três locais diferentes: no Laboratório de Microscopia Eletrônica do PEMM-COPPE-UFRJ, no equipamento Jeol JSM-6460 LV; no Laboratório PAM-PEQ-COPPE-UFRJ, no equipamento Jeol JSM-5300; ou ainda no Centro de Tecnologia Mineral-SCT-RJ, no equipamento Leica S440. Como valor de corrente foram empregados 15 kV na análise.

Determinação das características físicas do módulo construído

Para a determinação da área superficial (A) das membranas contidas no módulo foi utilizada a Equação 4.2:

$$A = 2\pi \cdot r_i \cdot L \cdot N \quad (4.2)$$

onde:

r_i: raio interno das membranas (1,459 mm);

L: comprimento das membranas (1 cm);

N: número de fibras (40);

Através da Equação 4.3 foi determinado o volume das membranas (V_m) contidas no módulo:

$$V_m = \pi(r_0^2 - r_i^2) \cdot L \cdot N \quad (4.3)$$

onde:

r_0 : raio externo das membranas (2,015 mm);

r_i : raio interno das membranas (1,459 mm);

L: comprimento das membranas (1 cm);

N: número de fibras (40);

A densidade de empacotamento (m^2/m^3) pode ser obtida dividindo a área superficial da membrana (Equação 4.2) pelo volume cilíndrico do módulo (2 cm de diâmetro interno, volume de 3,1416 cm^3).

O tempo de residência do fluido (t_{R_ads}) na membrana suportada em módulo, disponível para a adsorção do GM-CSF, pode ser obtido através da relação entre volume das membranas (V_m) pela vazão de permeado (Q_P), estabelecido na Equação 4.4.

$$t_{R_ads} = \frac{V_m}{Q_P} \quad (4.4)$$

O tempo de residência do fluido (t_R) no interior das membranas suportadas, que corresponde ao tempo que as células são submetidas ao escoamento no módulo de permeação, pode ser obtido através da relação entre volume interno das membranas (V_{int_m}) pela vazão de alimentação (Q_A), estabelecido na Equação 4.5.

$$t_R = \frac{V_{int_m}}{Q_A} \quad (4.5)$$

A frequência, que corresponde ao número de passagens do fluido pelo módulo, na unidade de tempo, pode ser determinada através da relação entre a vazão de alimentação (Q_A) pelo volume de suspensão celular usado (V_S), estabelecido pela Equação 4.6.

$$t_R = \frac{Q_A}{V_S} \quad (4.6)$$

A relação massa úmida/massa seca das membranas foi determinada para poder correlacionar a massa inicial da membrana seca, com as massas de membranas cortadas empregadas no processo de imobilização de heparina. Este procedimento é realizado com pedaços de dimensões e massa conhecidas de membrana, submersos em água destilada, por 30 min, à temperatura ambiente. Depois deste período de estabilização

remove-se a água superficial e pesa-se a massa de membrana e água (membrana úmida), procedendo três vezes a referida medida, com intervalos de 1 dia entre elas, para garantir a estabilização do sistema.

Permeabilidade hidráulica das membranas suportadas em módulo

As membranas suportadas em módulo foram caracterizadas segundo a permeabilidade hidráulica (característica de transporte), a qual indica o fluxo permeado em função da diferença de pressão entre as superfícies externa e interna da membrana (ΔP_{TM}), após a sua compactação.

O procedimento consiste em submeter inicialmente as membranas à compactação, para deformação da camada porosa da membrana, visando obter fluxos de permeado constantes com o tempo. O sistema empregado pode ser visualizado de forma esquemática na Figura 4.5.

O sistema foi operado à temperatura ambiente (25°C) e máxima pressão (51,49 kPa) fornecida pelo aparato experimental em questão, sendo o mesmo alimentado com água ultrapura. A partir da compactação, a pressão foi sendo variada, entre o mínimo valor observado e o máximo admitido, determinando-se a vazão de água permeada através do sistema e, portanto, o fluxo permeado. Este ensaio foi realizado inicialmente com o módulo contendo membranas sem uso, após a imobilização do ligante e ainda após a filtração de fluido com células animais.

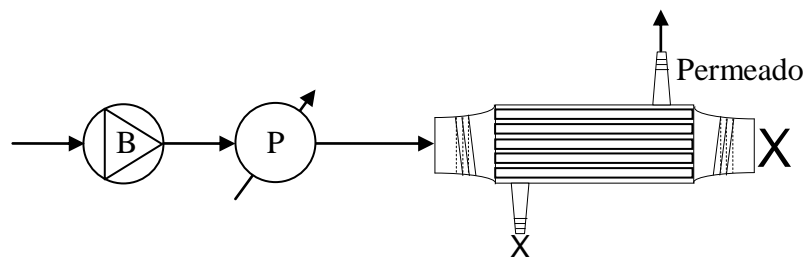


Figura 4.5 – Representação esquemática do aparato experimental empregado para a compactação e caracterização das fibras ocas. Onde (B) bomba peristáltica, (P) manômetro e (X) indica as vias obstruídas do módulo de filtração.

O fluxo permeado, obtido a partir do ensaio de permeabilidade, pode ser representado graficamente, em função da diferença de pressão, estabelecida entre as superfícies interna e externa da membrana. A partir da linearização destes dados, obtém-se na reta um coeficiente angular que corresponde à permeabilidade hidráulica da membrana.

Aplicando as Equações 3.7 e 3.8, descritas no Capítulo 3 e reescritas abaixo, que definem, respectivamente, a Lei de Darcy e a velocidade de escoamento do fluido, a partir dos dados de permeabilidade hidráulica, pode-se obter o coeficiente de permeabilidade do meio poroso (k), que foi empregado para simulação do sistema empregado experimentalmente em CFD.

$$\frac{\Delta P}{\ell} = -\frac{\mu q}{k} \quad (3.7)$$

$$q = \frac{Q}{A} \quad (3.8)$$

4.2.2.d) Imobilização do ligante

Imobilização do ligante heparina em fibras ocas de PEI/PVP cortada em pedaços

Segundo o método descrito por ALBRECHT *et al.* (2006), procedeu-se a imobilização de poli(etilenoimina) (pei) nas fibras ocas de PEI/PVP. A membrana, cortada no sentido axial em pequenos pedaços de 1 a 2 mm, acondicionada em um reator encamisado de 50 mL, pré-tratada com 50 mL de solução aquosa de 1-propanol (1:1, %v/v) por 30 min, foi mantida por 1 hora a 70°C (temperatura obtida pela recirculação de água dentro da camisa do reator - banho termostático, 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator, LKB Bromma), sob agitação magnética (RCT basic safety control, IKA), em uma solução aquosa de 1-propanol (1:1, v/v), contendo 2% de pei (% m/v). A seguir efetuou-se uma lavagem com 50 mL de água deionizada a 4°C (15 min), seguida de uma etapa de equilíbrio (15 min) com 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,5 em temperatura ambiente, e colocou-se as membranas recobertas com pei em contato com 25 mL de uma solução de heparina, na concentração de 10 mg/mL, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,5, por 1 hora, empregando uma adaptação no método sugerido por NGUYEN e colaboradores (2003). Foram separadas alíquotas da solução de heparina, antes e após o ensaio de imobilização, para determinação da quantidade de heparina imobilizada. Após este período efetuaram-se três etapas de lavagem com PBS (solução salina de tampão fosfato: 0,02 M tampão fosfato de sódio; pH 7,4; 0,15 M NaCl), cada uma por 15 min, em volume de 50 mL.

Tal procedimento pode ser visualizado de forma esquemática na Figura 4.6.

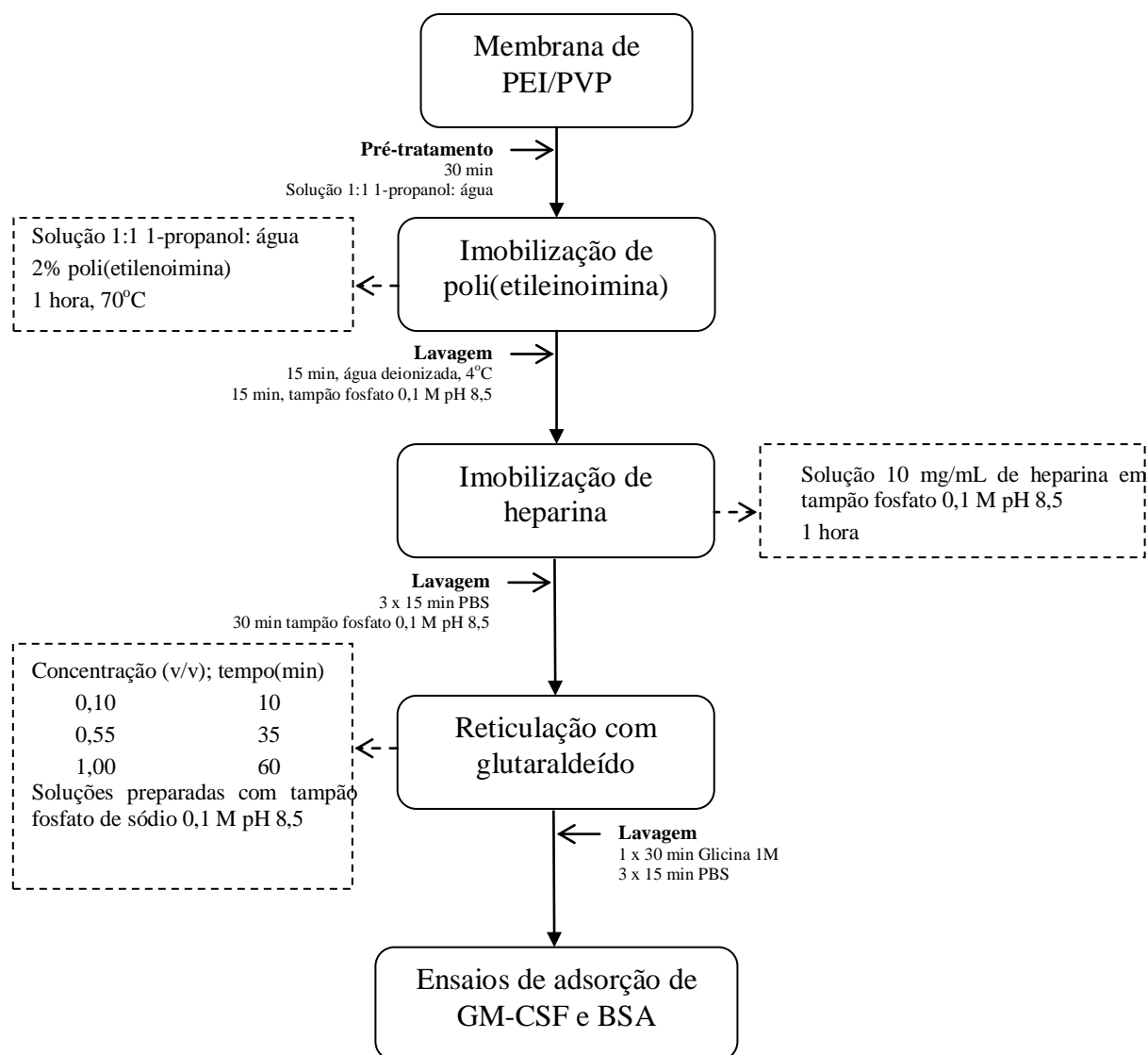


Figura 4.6 – Fluxograma do processo para obtenção das fibras ocas de PEI/PVP, recobertas por poli(etilenoimina), contendo heparina imobilizada e reticulação com glutaraldeído. Onde (PEI) poli(éterimida); (PVP) poli(vinilpirrolidona); (NMP) 2-N-metil-pirrolidona; (tampão fosfato) solução tampão de fosfato de sódio.

Reticulação das fibras ocas de PEI/PVP contendo heparina

A amostra contendo os pedaços de membrana, recobertos com pei e com heparina adsorvida, obtida na etapa anterior, foi fracionada em amostras com massa úmida em torno de 0,15 g, as quais foram acondicionadas em frascos de 2 mL (tubo *ependorf*, Axygen). As frações foram submetidas a condições variadas de concentração de glutaraldeído (0,1 a 1% em volume, em solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,5) e de tempo de reação (10 a 60 minutos), tal como disposto na Tabela 4.3, segundo o conjunto de experimentos exploratórios proposto. Tais ensaios foram realizados para determinar a concentração e o tempo de exposição ao glutaraldeído na

etapa de reticulação da membrana, tendo em vista que os dados da literatura apresentaram-se diversificados para o uso de glutaraldeído como agente reticulante. A diluição de glutaraldeído foi realizada em solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,5.

Tabela 4.3 – Conjunto de experimentos propostos para a determinação da concentração da solução e do tempo da reação de reticulação com glutaraldeído

Experimentos	Concentração (% v/v)	Tempo (min)
1	0,10	10
2	0,10	60
3	0,55	35
4	1,00	10
5	1,00	60

Nos procedimentos envolvendo a membrana em pedaços acondicionada em frascos, as soluções utilizadas foram adicionadas segundo o volume de 1 mL por frasco, os quais foram mantidos sob agitação de 20 rpm, de modo a provocar tombamento da solução sobre os sólidos.

Após decorrido o tempo determinado no planejamento experimental, cada amostra foi lavada com 1 mL de solução aquosa de glicina 1 M (30 min), para bloqueio de radicais aldeído livres, e com 1 mL de PBS por três vezes (15 min cada), sendo armazenada nesta solução tampão.

Ensaio de adsorção de proteínas das fibras ocas contendo heparina imobilizada para a seleção da condição de reticulação adequada

A fim de verificar a adsorção específica e não específica as membranas contendo heparina imobilizada, derivatizadas no item anterior, foram empregadas em ensaios para adsorção de GM-CSF comercial e de BSA, respectivamente, visando fornecer dados para a seleção da condição de reticulação adequada. A amostra para adsorção foi dividida em 2 frações, uma para ensaio de adsorção de BSA e outra para ensaio de adsorção de GM-CSF comercial. As frações foram colocadas em contato com a referida proteína e mantida em agitação, sob 20 rpm, a 25°C, como descrito na etapa de reticulação, por um período de 3 horas. Os mesmos ensaios, de adsorção de BSA e GM-CSF comercial, foram também realizados com membrana sem qualquer modificação (original) e com membrana submetida à derivatização com pei e adsorção de heparina, mas sem a etapa de reticulação com glutaraldeído.

Foram realizadas as etapas de equilíbrio (15 min), adsorção (180 min), lavagem com solução tampão (15 min), 5 etapas de eluição (concentrações de NaCl de 0,3 a 1,5 M em solução tampão, representando etapas de eluição em degrau) (15 min cada), uma segunda etapa de lavagem (15 min) e regeneração com NaOH 10 mM (15 min). Nestes ensaios acetato de sódio foi empregado como solução tampão, com concentração de 20 mM, pH 5,0, selecionado anteriormente pelos ensaios de adsorção/dessorção de GM-CSF em coluna de heparina imobilizada. Foram avaliadas a adsorção de BSA a partir da quantificação de proteínas totais em todas as amostras (sobrenadante recolhido após cada etapa do ensaio) e de GM-CSF por *slot blot* e ELISA competitivo, nas amostras dos ensaios com GM-CSF.

Imobilização de heparina em fibras ocas de PEI/PVP acondicionadas em módulo

A imobilização de heparina nas fibras ocas acondicionadas em módulo foi realizada seguindo os passos da metodologia descrita no item 4.2.2.d, assim como na Figura 4.6, para membranas cortadas, incluindo os intervalos de tempo. No entanto, as soluções foram alimentadas de modo a permear a membrana (operação frontal), com vazão de 2 mL/min. As etapas de equilíbrio e lavagem foram realizadas sem recirculação da solução, enquanto que as etapas de imobilização de pei e de heparina, assim como a etapa de reticulação com glutaraldeído foram realizadas com recirculação das respectivas soluções. As condições da etapa de reticulação com glutaraldeído, ou seja, tempo e concentração da solução de glutaraldeído, foram selecionadas pelos resultados do planejamento descrito na Tabela 4.3, e corresponderam a 60 min e 0,1% de glutaraldeído em solução.

4.2.3. Determinação de Curvas de Saturação

Curvas de ruptura ou saturação foram realizadas com a finalidade de avaliar o desempenho dinâmico da membrana de afinidade desenvolvida. Estes ensaios foram conduzidos através da aplicação de sobrenadante clarificado de cultura de células CHO-GM-CSF a diferentes vazões (1, 2,2 e 3,4 mL/min), tal como descrito na Tabela 4.4, até ultrapassar a saturação dos sítios de adsorção, ou seja, até que a concentração de GM-CSF na saída do módulo fosse igual à sua concentração na alimentação. As frações coletadas foram quantificadas em termos de proteínas totais (método de Bradford) e GM-CSF (ELISA), as frações de permeado também foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

Tabela 4.4 – Condições operacionais dos ensaios para a determinação das curvas de saturação

Cromatografia	Alimentação	Vazão alimentação	Vazão permeado
CR 3,4 mL/min	SBN CC+	3,4 mL/min	1,7 mL/min
CR 2,2 mL/min	SBN CC+	2,2 mL/min	1,1 mL/min
CR 1,0 mL/min	SBN CC+	1,0 mL/min	0,5 mL/min

Onde: (SBN CC+) sobrenadante de cultivo celular com adição de GM-CSF comercial; vazão de permeado corresponde a 50% da vazão de alimentação.

4.2.4. Ensaios Cromatográficos de adsorção em heparina imobilizada em fibras ocas de PEI/PVP

Foram realizados ensaios empregando as membranas de PEI/PVP com heparina imobilizada como suporte para a adsorção de GM-CSF.

Primeiramente, as membranas de afinidade, contidas no módulo, foram equilibradas com solução tampão de acetato de sódio 20 mM, pH 5,0. Foram alimentados 25 mL de sobrenadante de cultivo de células animais produtoras de GM-CSF adicionado de GM-CSF comercial. Depois da alimentação seguiram-se as etapas de lavagem e eluição por aumento da força iônica (gradiente de 0 a 3 M de NaCl adicionado à solução tampão), de modo a desorver o GM-CSF anteriormente adsorvido.

Ao longo dos ensaios, foram coletadas frações nas saídas de permeado e retido, para fins de quantificação de GM-CSF e análise de pureza por eletroforese (SDS-PAGE). Foram realizados ensaios cromatográficos com alimentações de 1, 2,2 e 3,4 mL/min, tal como definido para as curvas de ruptura (Tabela 4.4). Durante a etapa de alimentação foram coletadas as frações de retido e permeado, mantidas com vazão equivalente a 50% da alimentação. A Figura 4.7 apresenta uma descrição esquemática do procedimento correspondente à etapa de alimentação do ensaio cromatográfico empregando as membranas contendo heparina imobilizada, obtidas no presente trabalho.

A etapa de alimentação foi realizada internamente às membranas, de acordo com a Figura 4.8A, sendo o permeado coletado na saída lateral do casco.

Após a alimentação, as etapas de lavagem, eluição e regeneração foram realizadas no sentido inverso da alimentação, de modo a realizar simultaneamente uma retrolavagem, a partir da saída lateral do casco, sendo o permeado coletado no interior das membranas, tal como pode ser observado na Figura 4.8B.

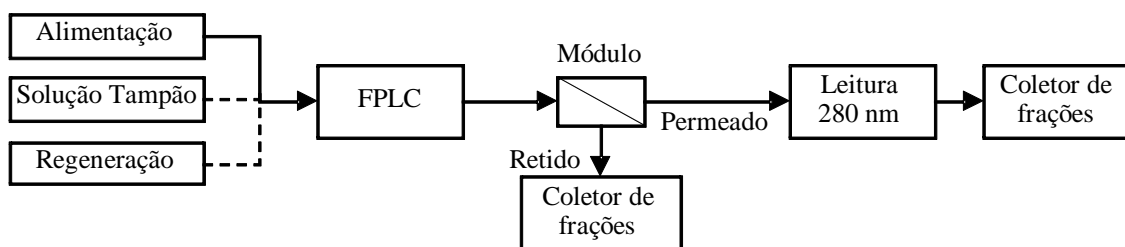


Figura 4.7 – Representação esquemática da etapa de alimentação dos ensaios cromatográficos empregando as membranas contendo heparina imobilizada, obtidas no presente trabalho. Linha tracejada representa fluxo obstruído.

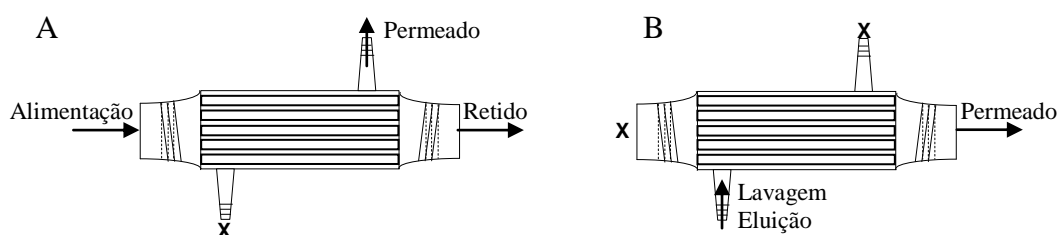


Figura 4.8 – Operação do módulo de membranas nos ensaios cromatográficos. Onde (A) Filtração tangencial: alimentação interna às membranas com coleta de permeado no casco, (B) Filtração frontal: etapas de lavagem, eluição e regeneração realizadas em retrolavagem e (X) indica as vias fechadas do módulo durante o processo.

Nas etapas cromatográficas seguintes à alimentação, a entrada das membranas foi obstruída, para processar uma operação do tipo frontal, como pode ser observado na Figura 4.9, para a dessorção das proteínas adsorvidas.

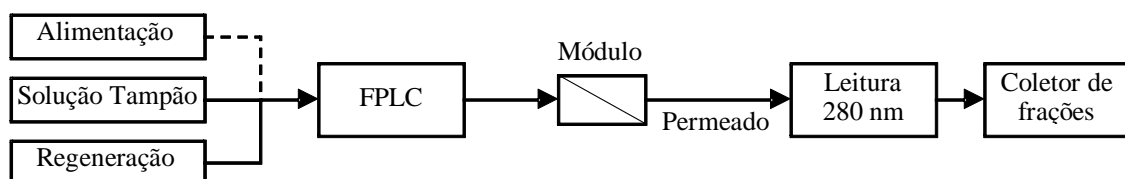


Figura 4.9 – Representação esquemática das etapas de lavagem, eluição e regeneração dos ensaios cromatográficos empregando as membranas contendo heparina imobilizada, obtidas no presente trabalho. Linha tracejada representa fluxo obstruído.

4.2.5. Experimento de filtração em batelada de sobrenadante de cultivo celular contendo células em suspensão

Visando verificar o comportamento do equipamento de retenção celular, ou seja, o módulo com fibras ocas projetado e desenvolvido neste trabalho, frente à incrustação, à manutenção da viabilidade celular e quanto à purificação de GM-CSF de forma simultânea, foi realizado um ensaio de filtração em batelada, de sobrenadante de

cultivo com células em suspensão, contendo GM-CSF. Neste ensaio, após equilíbrio do módulo com solução tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0, foi recirculado por 3 horas o meio de cultivo (255 mL) contendo células em suspensão, com concentração celular de $1,905 \times 10^6$ células/mL e viabilidade de aproximadamente 96%, com uma vazão de alimentação ao módulo de 3,4 mL/min, variando-se a cada 30 minutos o fluxo permeado através da membrana, entre 10 e 90% da fração alimentada, ou seja, 0,34 a 3,06 mL/min, respectivamente. Após as 3 horas de manutenção do sistema em recirculação ampliando a fração de permeado, a vazão de permeado foi reduzida para 40% da alimentação (1,36 mL/min), mantida por 1 hora. Foram empregadas bombas peristálticas (Watson Marlow Alitea) para alimentação e remoção do retido no módulo. O esquema experimental empregado pode ser observado na Figura 4.10.

As células foram mantidas em um frasco agitado (40 rpm) do tipo *spinner* (Techne) de 500 mL em meio 1:1 DMEM+HAM F12, com concentração de 0,2% de SFB, em estufa (Thermo) com 5% de concentração volumétrica de CO₂ e 37°C. Exatamente antes do início do ensaio, foi adicionado ao cultivo Pluronic, em concentração de 0,1% m/v, visando à proteção celular.

O meio de cultivo contendo as células em suspensão foram alimentadas a partir do frasco *spinner* (S) ao módulo de filtração pela bomba B_A, instalada na corrente de alimentação. Entre B_A e o módulo foi colocado um manômetro (P_A). A fração retida da alimentação era reencaminhada ao *spinner* através da corrente de retido (R). Nesta corrente foi colocada uma válvula para coleta de alíquota do retido (R_C). A fração permeada da alimentação era succionada por uma bomba peristáltica (B_P), instalada na corrente de permeado (P), sendo redirecionada ao *spinner* (S). Entre o módulo e a bomba (B_P) foi instalado um vacuômetro (P_P) e entre a bomba (B_P) e o *spinner* foi instalada uma válvula (P_C) para coleta de permeado (verificação da vazão e da ausência de células no permeado).

Foram coletadas a cada 30 min amostras de meio de cultivo com células em suspensão para a determinação da viabilidade celular e do fluxo de permeado respectivamente nos pontos identificados como R_C e P_C na Figura 4.10. A cada intervalo de 20 min foram observadas as pressões na corrente de alimentação (P_A) e na corrente de permeado (P_P), para determinação da ΔP_{TM} .

Foi realizada contagem de células também no permeado, visando confirmar a ausência de permeação de células através da membrana.

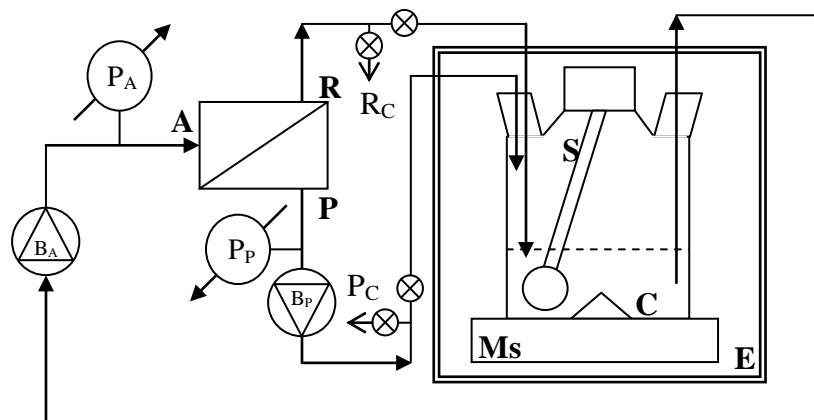


Figura 4.10 – Representação esquemática do aparato experimental empregado em ensaio de filtração em batelada, com variação da pressão através da membrana, para a determinação da viabilidade celular e da permeação de fluido através do módulo de fibras ocas. Onde (A) corrente de alimentação do módulo, (R) retido, (P) permeado, (B_A) bomba de alimentação, (B_P) bomba de permeado, (P_A) manômetro de tubo em U, (P_P) vacuômetro, (R_C) coleta de amostra na corrente R, (P_C) coleta de amostra na corrente P, (E) estufa de CO₂, (S) frasco do tipo *spinner*, (C) meio de cultivo contendo células do tipo CHO-GM-CSF e (Ms) agitador magnético para *spinners*.

Para este experimento um manômetro de tubo em U (P_A) foi construído empregando fluido de transmissão hidráulica (LUBRAX OH-49-TDX, Petrobrás), com densidade de 0,857 g/mL, para a determinação da pressão de alimentação do fluido no módulo.

Após o período de recirculação das células o módulo foi acoplado ao sistema FPLC para realizar a dessorção das proteínas adsorvidas. Considerou-se, portanto, que a fase de recirculação de meio contendo células em suspensão correspondeu à etapa de alimentação, e procedeu-se o ensaio a partir da etapa de lavagem do módulo. As demais etapas foram realizadas tal como descritas nos demais ensaios cromatográficos envolvendo as membranas com heparina imobilizada obtidas no presente trabalho (item 4.2.4).

4.2.6. Técnicas analíticas

4.2.6.a) Determinação da concentração protéica

A concentração de proteínas, tanto das soluções de injeção, quanto das etapas de lavagem, eluição e de regeneração dos ensaios de adsorção foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando BSA como proteína de referência.

4.2.6.b) *Quantificação de heparina*

A quantificação de heparina foi realizada segundo método descrito por FARNDALE *et al.* (1986), o qual consiste em acrescentar solução de metacromasia (16 mg de DMB, 3,04 g de glicina; 2,37 g de NaCl e 95 mL de HCl 0,1 M em 1 L de solução) à amostra contendo heparina, proceder agitação em vórtex e fazer leitura imediata de absorvância a 525 nm. O resultado é obtido correlacionando a absorvância da amostra com uma curva padrão.

4.2.6.c) *Eletroforese SDS-PAGE (eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo dodecilsulfato de sódio)*

As frações obtidas nas etapas de lavagem e eluição das cromatografias, correspondentes a picos de concentração de proteína, assim como a alimentação, foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE realizada no equipamento Mini Protean III (Bio-Rad Laboratories) utilizando gel de poliacrilamida (com concentração de 15% para a fase de separação e 5% para a fase de concentração), sendo as amostras pré-tratadas com tampões contendo SDS (dodecil sulfato de sódio) e mercaptoetanol. A desnaturação das proteínas das amostras foi realizada por aquecimento a 100°C por 5 minutos. Alíquotas de 5 a 20 µL de cada amostra foram aplicadas nos géis e estes submetidos a uma voltagem de 60 V até atravessar a fase de concentração e de 180 V após atingir a fase de separação. A revelação dos géis foi feita com nitrato de prata, conforme descrito por MORRISSEY (1981). O método eletroforético foi executado segundo o manual do fabricante do equipamento.

Algumas das amostras injetadas no gel passaram inicialmente por concentração em membrana com corte de 10 kDa (Centriplus YM-10, Millipore) e liofilização (liofilizador modelo DW 1.0-60e, Heto, do LaBiM – IQ – UFRJ).

4.2.6.d) *Identificação de GM-CSF por Dot ou Slot Blot*

Os ensaios de dot (resultado em forma circular) e *slot blot* (resultado apresentado em formato retangular) foram realizados nos equipamentos Bio-Dot Microfiltration Apparatus e Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus, respectivamente, ambos da Bio-Rad. Estes procedimentos permitem identificar uma proteína de interesse imobilizada previamente em uma membrana de nitrocelulose ou PVDF (por exemplo), através de reconhecimento por um anticorpo. A proteína imobilizada, oriunda da amostra, pode estar ou não previamente purificada.

Em ambos os casos o procedimento foi realizado como sugerido pelo fabricante. As amostras foram adicionadas em volume de 50 μ L por poço. Como soluções de lavagem foram empregadas as soluções tampão TBS (solução salina de tampão Tris-HCl) (2 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM de NaCl) e TTBS (solução salina de tampão Tris-HCl com Tween 20) (0,05% de Tween 20 em TBS), sendo utilizado 5% de leite desnatado em pó em TBS, como solução de bloqueio, por um período mínimo de 12 horas. As soluções de anticorpo primário e secundário foram preparadas a partir de uma solução de 3% de leite desnatado em pó em TBS, sendo que anticorpo primário foi adicionado em concentração de 1:100000 e o anticorpo secundário em concentração de 4:10000, e o período de incubação com cada um dos anticorpos correspondeu a 1 hora.

4.2.6.e) *Western Blot para identificação de GM-CSF*

O ensaio de *Western blot* envolve a transferência das proteínas separadas por eletroforese para um suporte sólido (membranas), possibilitando a identificação de uma proteína de interesse através de reconhecimento por um anticorpo, correlacionando a proteína identificada com sua massa molecular.

Os ensaios de *Western blot* foram realizados em cuba para transferência submersa (Modular Vertical Electroblothing, Gelco) ou placa para a transferência semi-seca (Trans-Blot SD Semi-Dry, Bio-Rad Laboratories). Na transferência submersa empregou-se 150 mA por 60 minutos, e na semi-seca 15 V por 15 min. O gel de poliacrilamida, empregado para a transferência das proteínas, foi realizado tal como descrito no item 4.2.2.6.c, sem a etapa de revelação com prata.

Em ambos os casos o procedimento foi realizado como sugerido pelo fabricante. As soluções de bloqueio, anticorpos primário e secundário foram realizadas tal como descrito para *dot* e *slot blot* (item 4.2.2.6.d).

4.2.6.f) *Quantificação de GM-CSF*

A quantificação de GM-CSF foi realizada através de ensaio ELISA competitivo, tal como descrito por FOGOLÍN *et al.* (2002), tratando-se de um imunensaio específico para GM-CSF presente no meio de cultura ou em frações de processos cromatográficos, mediante a comparação das amostras com uma concentração conhecida de GM-CSF padrão.

O procedimento consiste na sensibilização de placas de 96 poços com GM-CSF humano recombinante (Leucocitum, Blausiegel) (100 μ L por poço da solução de

GM-CSF padrão, em concentração de 0,165 µg/mL, diluído em solução tampão de carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6, por 1 hora, 37°C, seguido de um período *overnight* a 4°C), seguindo-se uma etapa de lavagem (solução de PBS contendo 0,05% de TWEEN 20) e bloqueio dos sítios de ligação inespecífica com 200 µL/poço de PBS com 5% SFB (%v/v), por 1 hora a 37°C. Realiza-se então a etapa de competição, incubando as placas por 2 horas a 37°C com 100 µL da proteína competidora contida nos padrões ou amostra e 100 µL do anticorpo primário (M7E10 anti-GM-CSF) diluído 1:10⁵ em PBS contendo 5% SFB (%v/v). Após este período repete-se a etapa de lavagem e adiciona-se 100 µL/poço da solução de anticorpo secundário conjugado com peroxidase (diluído 1:1000), incubando 1 hora, a 37°C. Lava-se as placas novamente e adiciona-se 100 µL/poço do substrato da reação, contido em solução de 0,5 ng/mL de OPD e H₂O₂ em solução tampão de fosfato/citrato de sódio, 50 mM, pH 5,3. A reação é interrompida por adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2 N. Procede-se a leitura de absorbância a 492 nm em leitor de micro placas (PowerWave XS, Biotek Instruments Inc.).

4.2.7. Técnicas relativas ao cultivo celular

4.2.7.a) Determinação da concentração celular

A concentração de células totais foi determinada por meio da coloração de núcleos com cristal violeta e contagem dos mesmos em câmara de Neubauer (Optik Labor, Boeco) em microscópio óptico invertido (Eclipse TS100, Nikon), segundo o método descrito por SANFORD e colaboradores (1951). Neste procedimento são corados os núcleos celulares, depois de rompidas as células por choque osmótico e ação de detergente. Emprega-se uma alíquota de 1 mL de suspensão celular recém coletada, a qual é centrifugada (250 g por 3 minutos), ressuspensa em 0,5 mL de solução de cristal violeta e agitada vigorosamente por 1 min em agitador tipo vórtex (MS2 Mini Shaker, IKA).

4.2.7.b) Determinação da viabilidade celular

As células mortas apresentam a membrana plasmática comprometida, de forma que, ao ser adicionado ao meio, o corante azul de trypan penetra no interior da célula, tornando-as azuis quando observadas ao microscópio óptico (KUCHLER, 2000). A contagem de células mortas em câmara de Neubauer e sua correlação com a população

total determinada anteriormente determina a viabilidade celular. O percentual de viabilidade é dado pela razão entre células viáveis (não coradas) e células totais observadas. Tal procedimento consiste em adicionar 40 µL da solução de azul de trypan a um volume de 160 µL de suspensão de células recém coletadas, procedendo-se a seguir a contagem em câmara de Neubauer.

4.2.7.c) Cultivo celular em suspensão e adaptação a meio de cultivo com SFB reduzido

As células foram mantidas em meio de cultivo constituído de DMEM + HAM F'12, na proporção 1:1, contendo 4,5 g/L de glicose, suplementado com SFB. Células originalmente cultivadas em suspensão em frascos agitados, sob 5% de SFB, foram adaptadas a concentrações decrescentes de SFB (2,5, 1, 0,5 e 0,2%), permitindo assim a construção de um banco de células CHO-GM-CSF adaptadas a diferentes concentrações de SFB. Para a adaptação a concentração reduzida de SFB as células foram mantidas em frascos do tipo *spinner* (Techne), sob agitação de 40 rpm, a 37°C, em atmosfera úmida e com 5% v/v de CO₂.

A necessidade de desenvolver cultivos celulares resistentes a baixa concentração de SFB advém em primeiro lugar, do elevado teor protéico que é adicionado ao meio, dificultando a purificação da proteína de interesse, mas também pelo incentivo das agências regulatórias em eliminar matérias primas de origem animal dos cultivos para produção de biofármacos, tendo em vista representarem potencial fonte de contaminação.

As culturas em suspensão foram iniciadas inoculando-se 1×10^5 células/mL no volume de trabalho do *spinner* com meio DMEM+HAM F'12 (1:1) suplementado com SFB na concentração de trabalho. Foram observadas a concentração total e a viabilidade celular diariamente, pelos métodos de coloração de núcleos e exclusão do azul de trypan, respectivamente. Quando a concentração celular alcançou 1 a 2×10^6 cél/mL (início da fase estacionária celular), parte da cultura foi aliquoteada para um novo frasco, reestabelecendo-se a concentração de 1×10^5 células/mL, através da centrifugação (250 g, 4 min, 4°C) de fração da cultura e ressuspensão do precipitado (*pellet*) na quantidade necessária de meio de cultivo para se iniciar um novo *spinner*. A passagem das células para uma concentração menor de SFB foi feita quando a viabilidade celular, acima de 95%, manteve-se por três passagens seguidas, indicando a adaptação ao meio de cultivo.

As células adaptadas foram divididas em duas partes, uma direcionada à redução a um nível inferior de concentração de SFB e outra para a criopreservação em nitrogênio

líquido, com meio de cultivo constituído do meio de cultivo das células, DMSO e SFB.

4.2.7.d) Congelamento das células

As células destinadas à criopreservação foram centrifugadas (250 g, 4 min, 4°C) e ressuspensas no meio de congelamento na concentração de 2 a 4×10^6 cél/mL, sendo distribuído 1 mL da solução com células por criotubo. Os criotubos foram mantidos sob -80°C por 1 a 2 horas em recipiente com imersão em isopropanol (Cryo 1°C Freezing Container, NALGENE), para estabelecer velocidade de congelamento de 1°C/min, seguindo para o armazenamento em nitrogênio líquido (-196° C). Como teste de esterilidade e de viabilidade celular um dos criotubos foi descongelado após uma semana do procedimento.

4.2.7.e) Descongelamento das células

Após a retirada do nitrogênio líquido, as células foram rapidamente submetidas a temperatura de 37°C, sendo descongeladas em período de 2 min. Ressuspendeu-se o conteúdo em 20 mL de meio de cultivo, centrifugou-se (250 g, 4 min, 4°C), removeu-se o sobrenadante e realizou-se outra lavagem, com 20 mL de meio de cultivo, com nova centrifugação. Ressuspendeu-se o precipitado em meio de cultivo definido pela condição da manutenção das células antes do congelamento, ou seja, meio e suplementação com SFB conforme descrito na passagem que deu origem ao congelamento.

5. *Resultados e Discussão*

Este capítulo apresenta os resultados obtidos, assim como a discussão das ações realizadas ao longo do presente trabalho.

5.1. *Fluidodinâmica computacional*

Através do planejamento das simulações, realizado com o auxílio de CFD, buscou-se estudar configurações de módulo de membrana de fibra oca, sendo a densidade de fibras (N), o diâmetro das fibras (D_{int}) e o comprimento do módulo (L) as variáveis avaliadas. Os resultados da simulação foram obtidos através da confecção sequencial da geometria, da malha, da implementação das condições de contorno, condições de processamento (*solver*) e de armazenamento dos resultados (*output control*).

Nas fatias de 36° do casco, foram inseridas 1, 7 ou 13 membranas, que na configuração global, ou seja, no módulo inteiro, representaram respectivamente 10, 70 e 130 membranas.

A maior dificuldade com relação à geometria tratou-se da diferença entre as grandezas empregadas, visto que, enquanto o casco apresentava um comprimento de 80 mm (ponto máximo), a membrana apresentou um raio interno de 0,175 mm, com espessura de parede de 0,125 mm. Esta dificuldade é observada não na geometria em si, mas na confecção da malha, que a toma como base. Diante desta situação os elementos para formação da malha necessitaram de um controle muito detalhado, visto que poderia ocorrer tanto o refinamento excessivo quanto a falta de um número de elementos mínimo que garantisse a interpretação correta do fenômeno em determinada região.

Assim, as malhas foram feitas de modo a garantir um mínimo de 5 elementos entre cada superfície (interna e externa) da membrana. Como o interesse recai sobre o fenômeno na membrana em si, foram elaboradas áreas de refinamento, em ambas as superfícies externa e interna, assim como na interface com o casco.

Com o mesmo objetivo que o refinamento no entorno da membrana foram criadas outras regiões com refinamento de malha, mas baseadas em linhas de controle. Estas linhas refinaram a malha localmente, de modo a melhor definir as regiões em que são inseridas. Estes refinamentos, no presente trabalho, estão localizados na região de saída de fluido pelo casco e nas laterais das superfícies identificadas como simetria

(superfícies que dividem o módulo em 10 partes). Um exemplo, para melhor visualização, é apresentado na Figura 5.1, onde são apresentadas a linha na saída do casco (Figura 5.1A) e uma linha na lateral (Figura 5.1B). A adição destas linhas laterais foi necessária porque as membranas não estavam apresentando o refinamento apropriado, devido ao pequeno espaço existente entre a superfície externa da fibra e a região de simetria. A inserção de tais linhas resolveu o problema de refino inadequado na superfície, sendo empregada em todas as simulações.

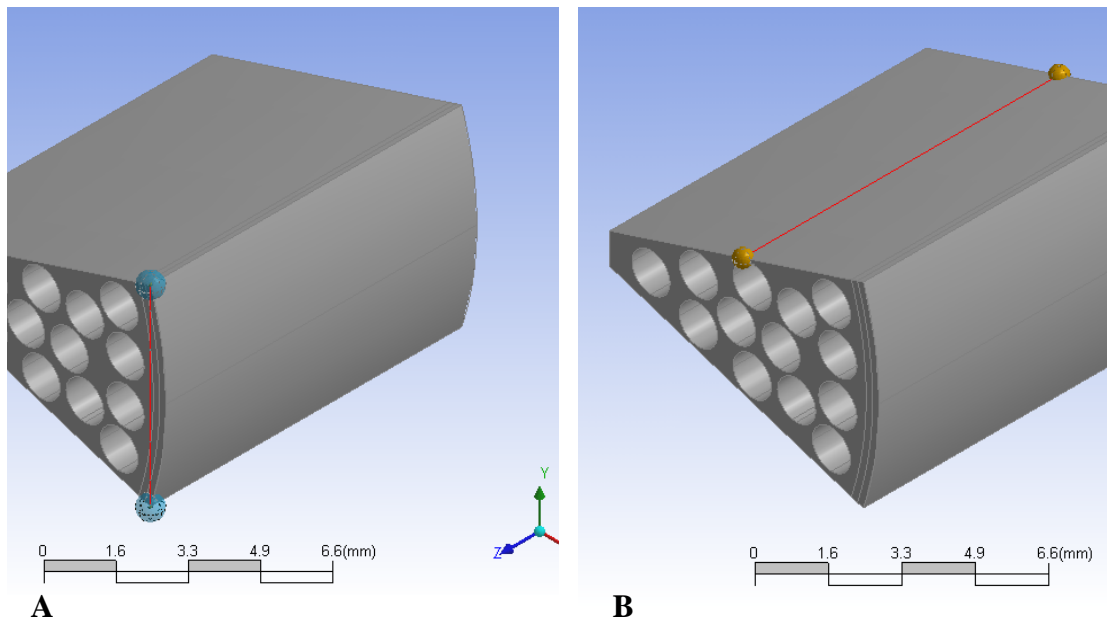


Figura 5.1 – Exemplo de linha de controle empregada para elaboração de regiões com refinamento de malha (A) na saída do casco e (B) na região de simetria. Módulo com 1 cm de comprimento em fatia de 36° , com corte central e 13 membranas com raio de 0,475 mm.

A geração da malha apresentava ainda outro problema: o refinamento central desnecessário, devido ao ângulo de contato entre as duas superfícies do corte lateral (simetria), o qual pode ser observado na Figura 5.2. É recomendável, nestes casos, realizar um corte ao longo do eixo central, com o intuito de remover a linha de contato entre as duas superfícies de simetria. Assim, adotou-se um corte acentuado e reto, a 1,5 cm do centro (Figura 5.1A). Esta geometria e o resultado de uma simulação empregando o corte central podem ser visualizados na Figura 5.3A. Na Figura 5.3B é apresentado o resultado de uma simulação na qual foram empregados o corte central e o refinamento na saída do casco, visando melhor descrição do fenômeno.

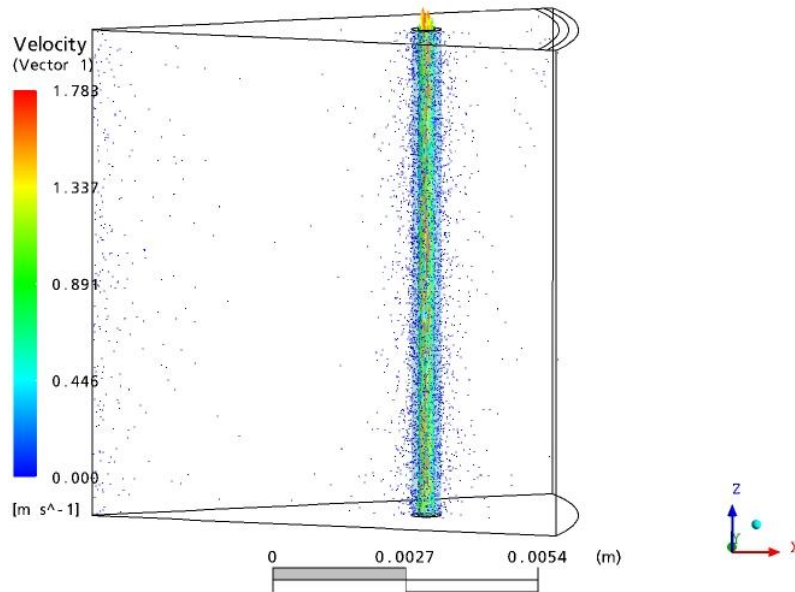


Figura 5.2 – Ponto 7 do planejamento de simulações. Geometria em fatia de 36° com centro em ângulo, sem corte, e refinamento no entorno da membrana. Os pontilhados são vetores que representam a velocidade do fluido.

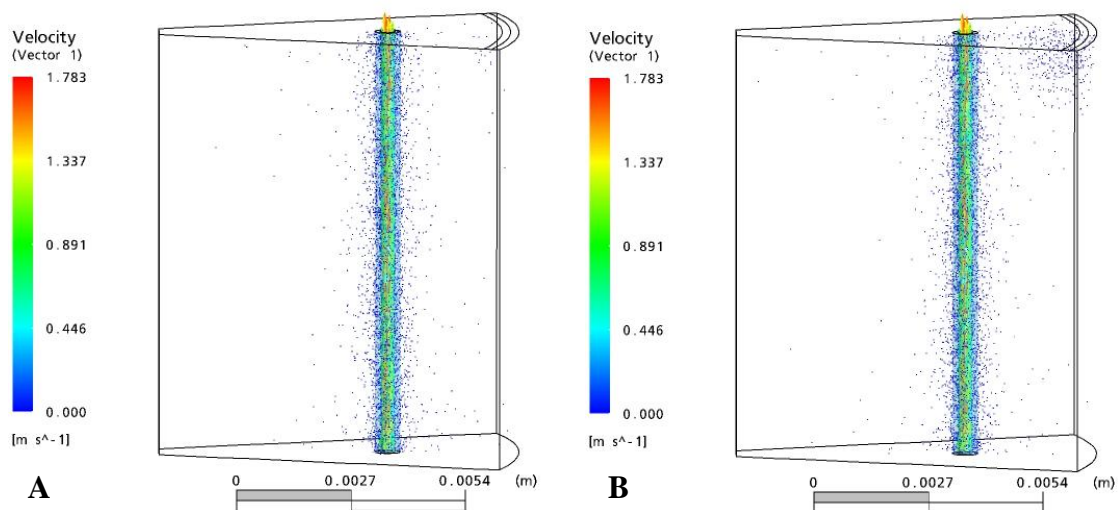


Figura 5.3 – Resultado da simulação do Ponto 7 do planejamento de simulações, com diferentes refinamentos. Geometria em fatia de 36° com corte central reto a 1,5 do centro do módulo. (A) Refinamento somente na membrana e (B) Refinamento na membrana e na saída do casco. Os pontilhados são vetores que representam a velocidade do fluido.

Diversas tentativas foram realizadas na busca de uma malha adequada. Construíram-se, inicialmente, malhas tetraédricas. Muitas destas malhas, entretanto, ultrapassavam a capacidade computacional disponível, mesmo com a realização da simulação com até 10 computadores em paralelo. Além disso, para alguns casos (pontos 6, 10 e 1, por exemplo), a confecção da malha não era possível.

As Figuras 5.4 e 5.5 mostram a malha tetraédrica obtida para o ponto 7 do planejamento das simulações (uma membrana na fatia, logo 10 membranas no casco). Na Figura 5.5 é possível observar-se o refinamento excessivo ao longo do comprimento da membrana, refinamento este, porém, necessário para obter-se um mínimo de refinamento na espessura e no interior da membrana. Como já especificado na metodologia, o interior da membrana, para as simulações, é representado por um corpo, e que, em função da necessidade de observar fenômenos na interface do fluido com a membrana, requer um refinamento da malha adequado para uma observação correta da transferência de massa e das tensões na superfície.

As malhas tetraédricas foram construídas com o Design Modeler 9.0, da Ansys. Em julho de 2005, foi liberada uma nova versão deste *software*, o Design Modeler 10.0, que apresentou a possibilidade de realizar a extrusão da malha. Esta é uma forma alternativa para confeccionar malhas que necessitem de grande refino na direção radial, mas não na axial.

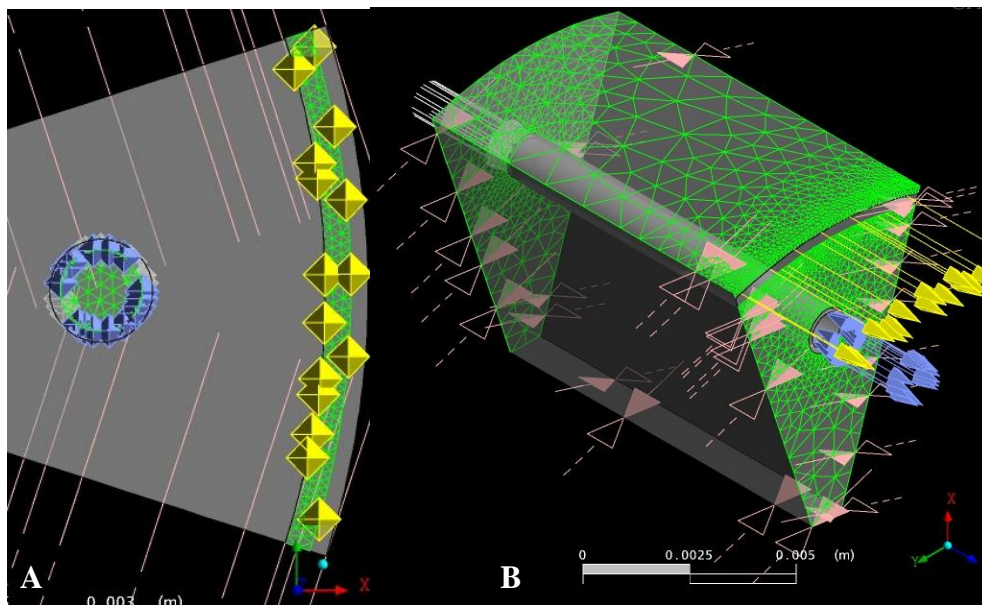


Figura 5.4 – Malha tetraédrica do casco do Ponto 7 do planejamento de simulações. As letras (A) e (B) representam respectivamente as vistas superior e em perspectiva da saída do casco e da saída da membrana.

Na malha extrusada, faz-se uma malha-base bidimensional que é extrusada ao longo de um comprimento definido, segundo um número pré-estabelecido de divisões. Esta nova versão do *software* permitiu a execução do planejamento experimental com menor esforço computacional.

Assim, o planejamento das simulações foi realizado com este tipo de malha (Figuras 5.6 e 5.7), com refino no entorno da membrana, na saída do casco e nas laterais da simetria, quando necessário.

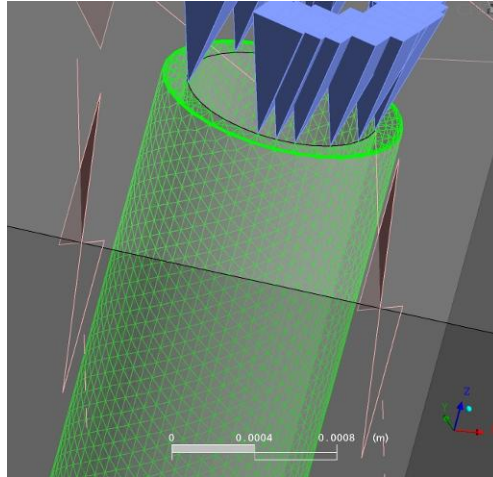


Figura 5.5 – Detalhe da malha tetraédrica da membrana referente ao Ponto 7 do planejamento de simulações.

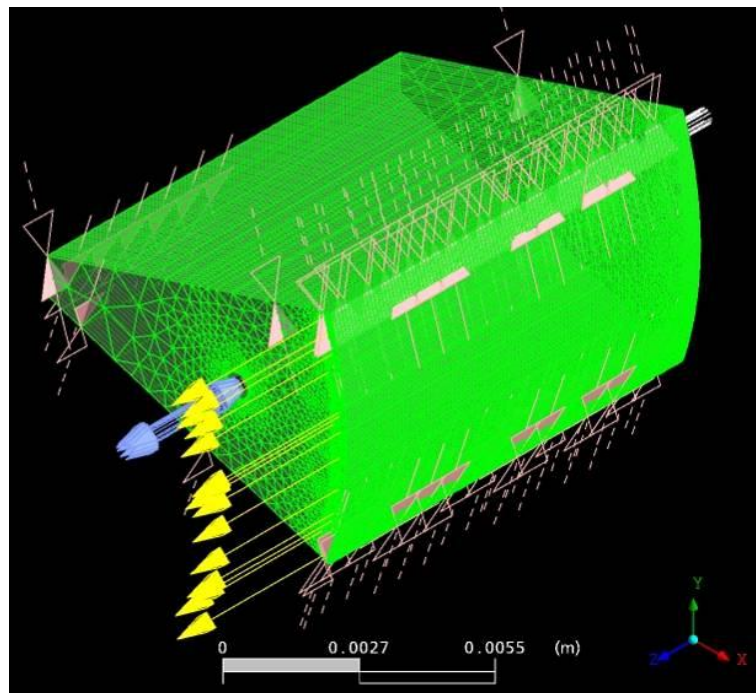


Figura 5.6 – Malha tetraédrica do casco do Ponto 7 do planejamento de simulações, permitindo visão da malha extrusada na região de simetria.

A Tabela 5.1 apresenta os pontos do planejamento das simulações com os respectivos números de nós e elementos que constituíram a malha. As condições de contorno foram as mesmas para todos os dez pontos do planejamento de simulações.

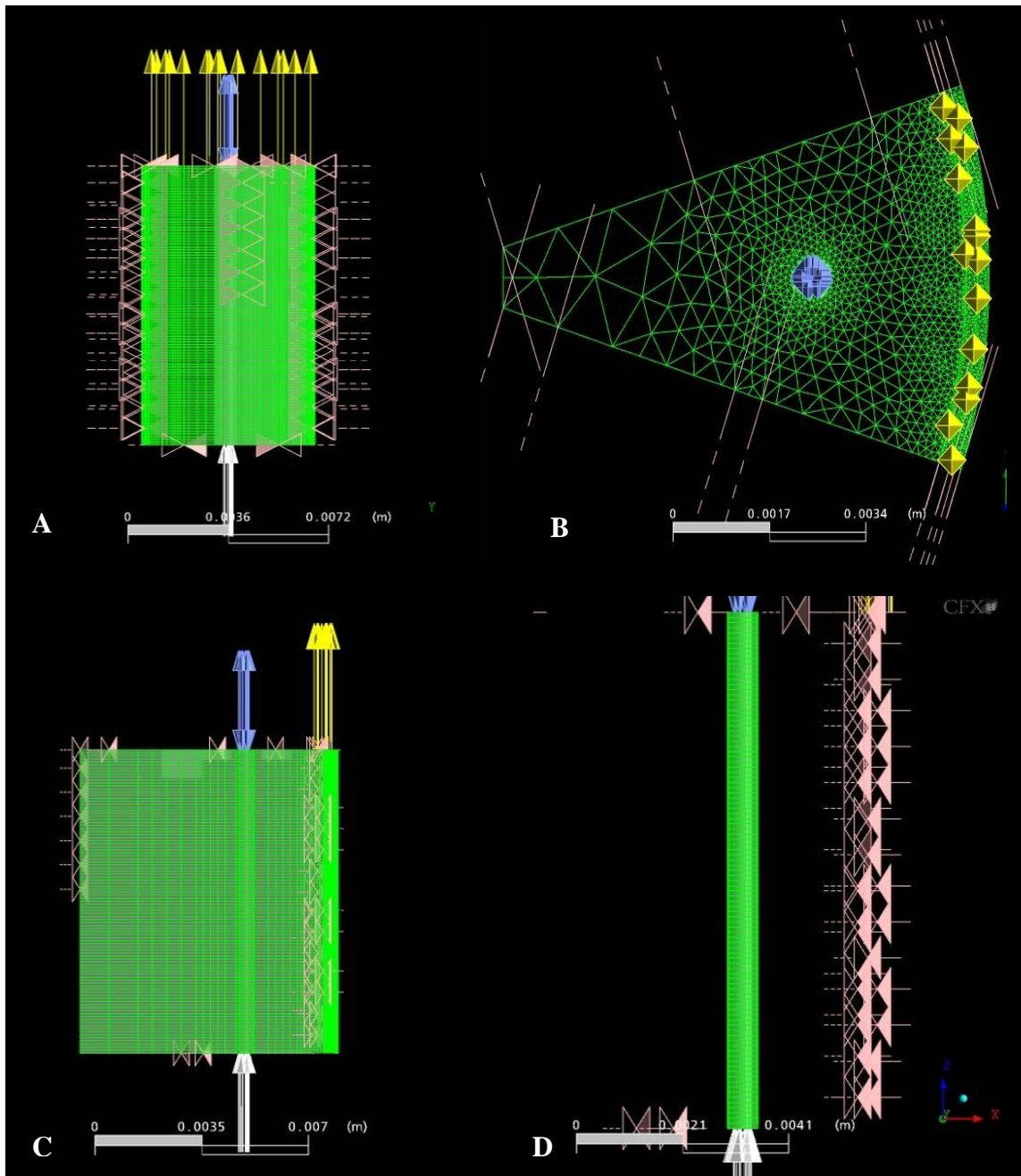


Figura 5.7 – Malha tetraédrica do casco do Ponto 7 do planejamento de simulações, permitindo visão da malha extrusada na direção axial. Onde (A) Vista da coordenada X+. (B) Vista da coordenada Z+. (C) e (D) Vistas da coordenada Y+ do casco e da membrana, respectivamente. As condições de contorno são dadas pelos vetores, onde representam as cores: amarela a saída, branca a entrada, azul as regiões abertas (admite tanto fluxo de saída quanto de entrada) e salmão a condição de simetria.

Foi adotada, inicialmente, para todas as simulações, a condição de escoamento laminar. Esta condição foi confirmada após convergência das simulações, através dos números de Reynolds obtidos, tanto dentro quanto fora da membrana. Maiores detalhes acerca das condições de contorno adotadas nas simulações podem ser encontrados no Anexo I.

Tabela 5.1 – Matriz empregada para o desenvolvimento das simulações empregando fluidodinâmica computacional. Variáveis testadas são o diâmetro da fibra (D_{int}), número de fibras (N) e o comprimento (L).

S	Variáveis independentes			Matriz codificada			Dados do módulo			Dados da malha		Respostas	
	L (mm)	N	D_{int} (mm)	H	N	D_{int}	D_{ext} (mm)	A transv (mm^2)	A transv x N (mm^2)	nós	elementos	Tensão (Pa)	$\Delta(\Delta P_{TM})$ (Pa)
1	80	130	0,95	+	+	+	1,2	0,7088	92,1468	624729	833560	10,22	2414,2
2	80	10	0,95	+	-	+	1,2	0,7088	7,0882	191889	318960	18,63	2505,3
3	45	70	0,65	0	0	0	0,9	0,3318	23,2282	381189	512940	19,40	2738,1
4	10	130	0,35	-	+	-	0,6	0,0962	12,5075	394666	556680	39,57	2394,9
5	45	70	0,65	0	0	0	0,9	0,3318	23,2282	381189	512940	19,40	2739,6
6	10	130	0,95	-	+	+	1,2	0,7088	92,1468	631113	894480	23,13	498,5
7	10	10	0,35	-	-	-	0,6	0,0962	0,9621	122754	212200	39,58	2429,0
8	10	10	0,95	-	-	+	1,2	0,7088	7,0882	99855	156940	26,40	516,0
9	80	10	0,35	+	-	-	0,6	0,0962	0,9621	206631	348080	19,43	6677,5
10	80	130	0,35	+	+	-	0,6	0,0962	12,5075	620136	935600	9,54	5689,0

Onde: S corresponde ao número da simulação, N é dado em unidades de fibras por módulo, Diâmetro do casco: 20 mm; Espessura da parede ($E_{membranas}$: 0,125 mm; D_{ext} : diâmetro externo das membranas de fibra oca; Atransv: área de seção transversal de cada unidade de membrana de fibra oca e Atransv x N corresponde à área da seção transversal total de fibras (ou seja, área total de alimentação do módulo). A malha é constituída de prismas com bases quadriláteras e triangulares.

A Figura 5.8 apresenta os perfis de pressão na entrada e na saída do módulo para as simulações de número 2, 4 e 6, como exemplo, ao longo da direção axial das fibras ocas, assim como a queda de pressão através da membrana, para as simulações observadas. Pode-se observar uma queda menos acentuada da pressão na Figura 5.8 C, concordando com a Figura 5.9, apresentada na próxima página.

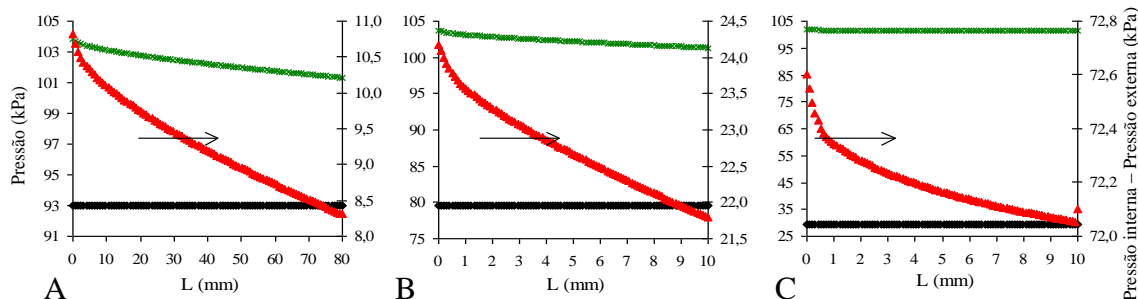


Figura 5.8 – Variação da pressão ao longo do comprimento (L) na fibra oca, onde (A) é a simulação 2; (B) é a simulação 4; (C) é a simulação 6; (\blacklozenge) é a pressão externa; (\times) é a pressão interna; (\blacktriangle) diferença de pressão através da membrana; (L) é o comprimento do módulo (mm).

Com base nos dados de pressão interna e externa da membrana, foi calculada a variação na queda de pressão através da membrana entre o início da fibra e seu final [$\Delta(\Delta P_{TM}) = \Delta P_{TM\text{entrada}} - \Delta P_{TM\text{saída}}$]. Esses dados, assim como a tensão de cisalhamento máxima em cada um dos módulos simulados, são mostrados na Tabela 5.1 e nas Figuras 5.9 e 5.10, respectivamente.

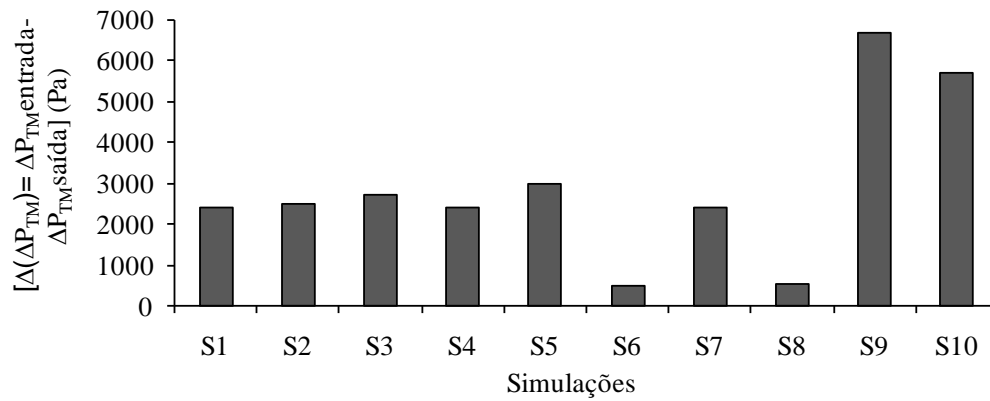


Figura 5.9 – Variação da queda de pressão através da membrana entre a entrada e a saída do módulo, para todas as simulações realizadas.

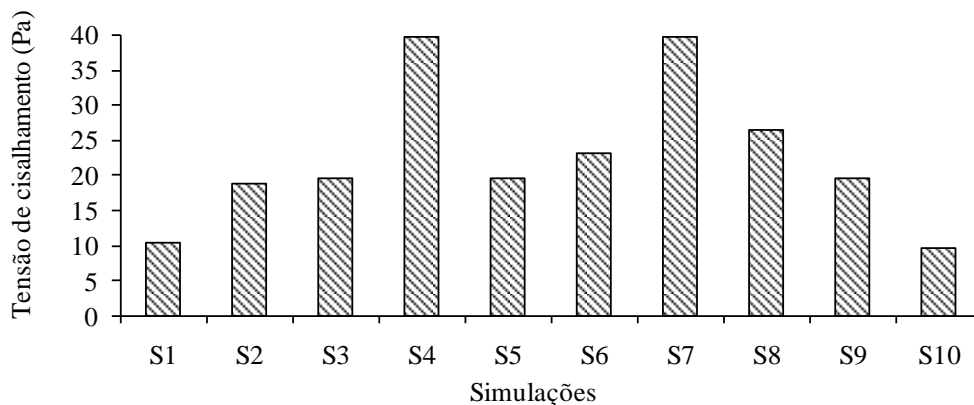


Figura 5.10 – Tensão de cisalhamento máxima observada nos módulos de fibras ocas simulados.

Verifica-se que as tensões de cisalhamento máximas (Figura 5.10) obtidas para os diferentes módulos encontram-se todas abaixo de 40 Pa. Em testes realizados com linhagens de células CHO e BHK, CASTILHO e ANSPACH (2003) consideraram que tensões de cisalhamento abaixo de 50 Pa não acarretariam danos às células e queda de viabilidade celular. Assim, em função dos valores obtidos no presente trabalho estarem todos abaixo deste limite, considerou-se que, em termos da tensão cisalhante máxima a

que as células seriam submetidas nos módulos ora simulados, qualquer um deles seria adequado para uso como equipamento de retenção celular.

Sendo assim, realizou-se uma análise estatística dos resultados, com o auxílio do *software* EER (STEPPAN *et al.*, 1998). Uma vez que os valores da tensão de cisalhamento permaneceram, em todas as condições simuladas, em valores que não comprometem a viabilidade celular, considerou-se como resposta de interesse apenas a variação na queda de pressão através da membrana entre o início e o final das fibras [$\Delta(\Delta P_{TM})$].

Como o planejamento das simulações consistiu de um plano fatorial completo (3^2), o modelo proposto para o ajuste através de regressão linear múltipla pode conter os efeitos das variáveis individualmente, assim como das interações entre as mesmas (Equação 1). Cabe ressaltar que os valores de L, N e D_{int} utilizados neste modelo são os valores normalizados (codificados), que variam de -1 a +1.

$$\Delta(\Delta P_{TM}) = b_0 + b_1 \cdot L + b_2 \cdot N + b_3 \cdot D_{int} + b_4 \cdot L \cdot N + b_5 \cdot L \cdot D_{int} + b_6 \cdot N \cdot D_{int} \quad (5.1)$$

O resultado da análise estatística dos dados simulados forneceu os resultados mostrados na Tabela 5.2. Observa-se que os termos relativos ao número de fibras (N) e às suas interações com L e D_{int} apresentaram valor *p* superior a 0,10, indicando insignificância estatística dos mesmos. Os demais termos mostraram-se estatisticamente significativos, com valor *p* inferior a 0,10.

Tabela 5.2 – Análise dos resultados do planejamento estatístico, com base no modelo completo (Equação 1). O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,998, R_{adj} foi de 0,994 e R_{pred} foi de 0,930.

Parâmetro	Valor ajustado	Significância (valor p)	Desvio padrão	-95%	95%	t
b0	2860,2	2,802e-05	66,78	2647,7	3072,7	42,83
b1	1430,9	0,000310	74,66	1193,3	1668,6	19,17
b2	-141,40	0,155	74,66	-379,01	96,22	-1,894
b3	-1407,0	0,000326	74,66	-1644,7	-1169,4	-18,84
b4	-128,50	0,184	74,66	-366,11	109,12	-1,721
b5	-454,70	0,00889	74,66	-692,31	-217,08	-6,090
b6	114,25	0,223	74,66	-123,37	351,86	1,530

Com base nestes resultados, efetuou-se nova regressão linear múltipla, excluindo-se os termos envolvendo o número de fibras N, resultando no modelo da Equação 5.2. Assim como no caso do modelo completo (Equação 5.1), os valores de L

e D_{int} utilizados neste modelo são os valores normalizados (codificados), que variam de -1 a +1.

$$\Delta(\Delta P_{TM}) = B_0 + B_1 \cdot L + B_2 \cdot D_{int} + B_3 \cdot L \cdot D_{int} \quad (5.2)$$

Os resultados da análise estatística referente ao modelo reduzido são mostrados na Tabela 5.3. Observa-se que todos os termos do modelo apresentaram clara significância estatística. Em função disto e de os valores de R, R_{adj} e R_{pred} obtidos terem sido altos e muito próximos, considerou-se o modelo descrito pela Equação 5.2 com os parâmetros ajustados segundo a Tabela 5.3 como adequado para representar a variação axial na queda de pressão através da membrana [$\Delta(\Delta P_{TM})$].

Tabela 5.3 – Análise dos resultados do planejamento estatístico, com base no modelo da Equação 5.2. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,992, R_{adj} foi de 0,988 e R_{pred} foi de 0,973.

Parâmetro	Valor ajustado	Significância (valor p)	Desvio padrão	-95%	95%	t
B0	2860,2	8,367e-08	94,01	2630,2	3090,2	30,42
B1	1430,9	9,749e-06	105,11	1173,8	1688,1	13,61
B2	-1407,0	1,076e-05	105,11	-1664,2	-1149,9	-13,39
B3	-454,70	0,00495	105,11	-711,88	-197,52	-4,326

Conforme pode ser observado na Figura 5.11, o modelo da Equação 5.2 (modelo reduzido), utilizado com os valores ajustados dos parâmetros (Tabela 5.3), apresenta alta concordância entre os valores de [$\Delta(\Delta P_{TM})$] preditos e os valores simulados, dentro das faixas das variáveis estudadas nas simulações.

De acordo com os parâmetros B1 e B2 ajustados para o modelo reduzido (Equação 5.2 e Tabela 5.3), observa-se que, para a minimização da resposta de interesse [$\Delta(\Delta P_{TM})$], é recomendável usar um comprimento do módulo (L) reduzido e um diâmetro interno das fibras (D_{int}) elevado. Dado que o número de fibras (N) não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre $\Delta(\Delta P_{TM})$, pode-se escolher um alto valor de N, visando obter uma maior densidade de empacotamento das membranas, ou seja, uma maior área de permeação e mais elevada capacidade adsortiva total por volume de equipamento.

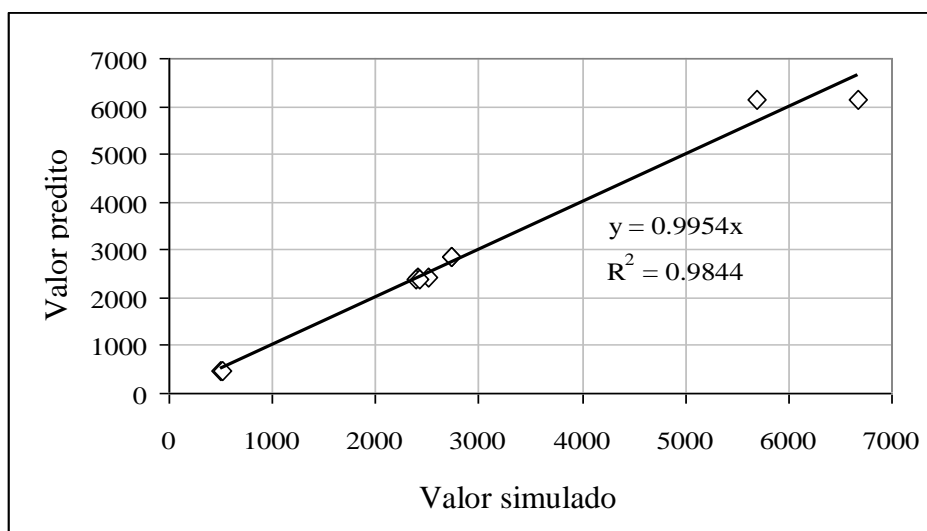


Figura 5.11 – Comparação dos valores simulados e preditos pelo modelo da Equação 5.2 para a variação da queda de pressão através da membrana entre a entrada e a saída [$\Delta(\Delta P_{TM})$] dos módulos simulados.

Dada a boa adequação do modelo reduzido (Equação 5.2) com os valores dos parâmetros ajustados (Tabela 5.3), foi realizada, utilizando-se o *software* EER, a minimização da resposta de interesse [$\Delta(\Delta P_{TM})$] em função das variáveis comprimento do módulo (L), diâmetro interno das fibras (D_{int}) e número de fibras (N). O valor destas variáveis e o valor predito para $\Delta(\Delta P_{TM})$ nestas condições estão mostrados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Valores das variáveis L, D_{int} e N que minimizam $\Delta(\Delta P_{TM})$.

Variável ou resposta	Valor normalizado	Valor absoluto
Comprimento do módulo (L)	-1	1 cm
Diâmetro interno das fibras (D_{int})	+1	0,95 mm
Número de fibras (N)	+1	130
Valor predito para $\Delta(\Delta P_{TM})$	--	172,4 Pa

Os resultados das simulações de módulos de membranas, empregando CFD, demonstraram que, para emprego em processos integrados de perfusão/purificação, fibras ocas curtas e de maior diâmetro interno são mais adequadas, por apresentarem fluxo de permeado mais homogêneo ao longo de toda a área de membrana. Isto contribuiria para evitar uma ruptura prematura do bioproduto em decorrência de uma rápida saturação local dos sítios adsortivos próximos à região da alimentação. Os valores de tensão cisalhante encontrados foram muito baixos, portanto sem risco de comprometer a viabilidade das células animais a serem separadas nos módulos. Sendo

assim, a análise dos resultados obtidos a partir das simulações indicou a construção de módulos de pequeno comprimento (1 cm), elevado empacotamento (130 membranas fibras por módulo) e maior diâmetro interno das membranas (950 μm), tal como aquele observado nas simulações mostradas na Figura 5.12.

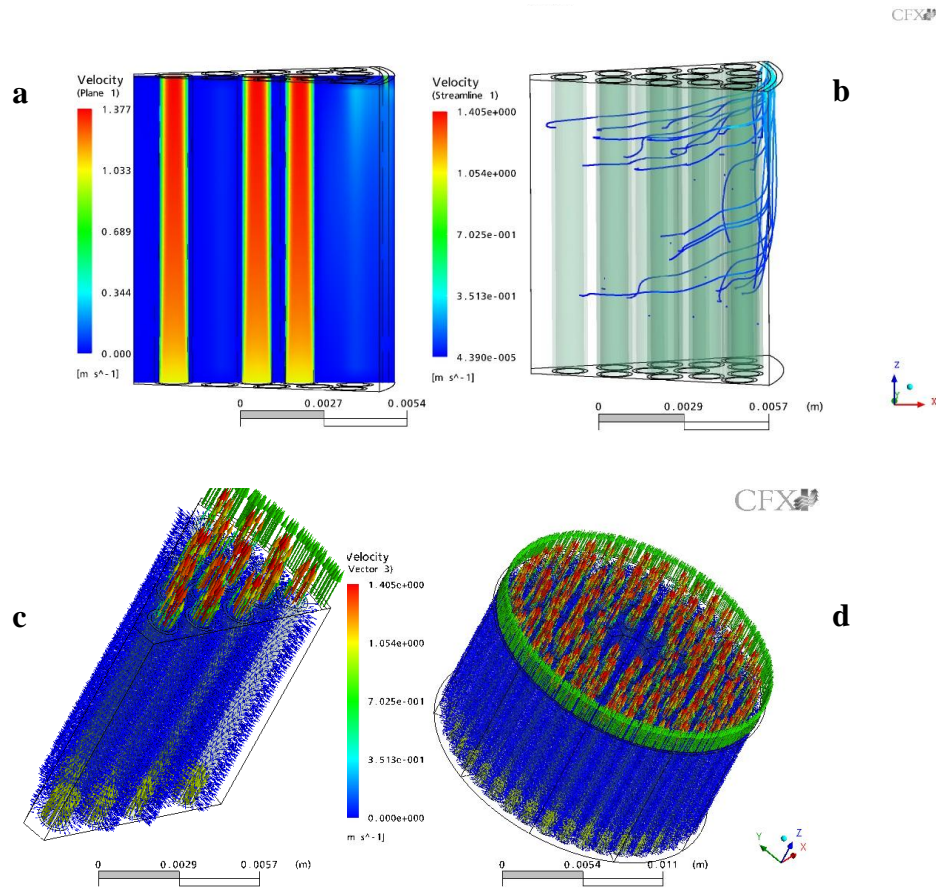


Figura 5.12 – Simulação por CFD de módulo com comprimento de 1 cm, contendo 130 membranas de 950 μm de diâmetro interno, simulado como fatia de 36°. (a) perfil de velocidade local em um plano no sentido axial, (b) linhas de corrente, (c) e (d) vetores velocidade da fatia e do módulo formado por 10 fatias.

5.1.1. Simulação do sistema empregado experimentalmente

O módulo de permeação, obtido experimentalmente, foi caracterizado em termos de permeabilidade hidráulica e das dimensões da membrana. Foram empacotadas 40 fibras ocas, com diâmetro interno de 1,459 mm, 278 μm de espessura de parede (valores apresentados na Figura 5.24 e Tabela 5.9), e 1 cm de comprimento. Como coeficiente de permeabilidade, empregado como condição de contorno para a simulação, foi empregado o valor de $3,73 \times 10^{-16} \text{ m}^2$ (Tabela 5.12), referente à permeação da membrana de PEI/PVP, contendo heparina imobilizada e reticulada. Os resultados da simulação podem ser visualizados na Figura 5.13.

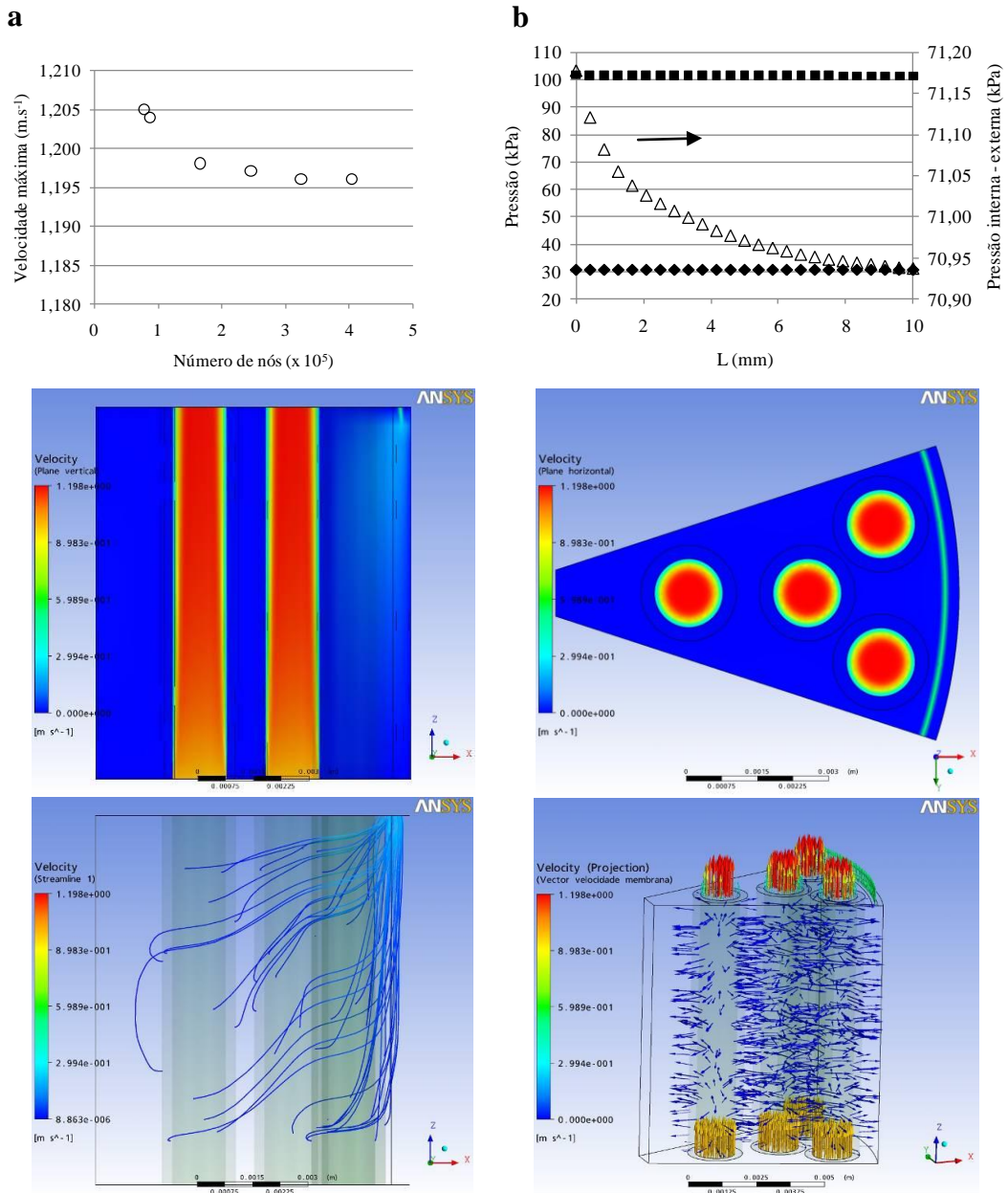


Figura 5.13 – Resultados obtidos para a simulação por CFD do módulo obtido experimentalmente, comprimento de 1 cm, contendo 40 membranas de 1459 μm de diâmetro interno, simulado como fatia de 36° . (a) Estudo para definição da malha. (b) Variação da pressão no sentido longitudinal, onde (◆) é a pressão externa; (■) é a pressão interna; (Δ) corresponde à diferença de pressão através da membrana e (L) é o comprimento do módulo (mm). (c) e (d) perfis de velocidade local em um plano no sentido axial e radial ($z = 9,9 \text{ mm}$), respectivamente. (e) linhas de corrente. (f) vetores velocidade.

Um estudo para definição do número de nós foi realizado, visando definir o número mínimo de nós necessário para obtenção de um resultado consistente e concordante com um refinamento bem detalhado. O estudo de malha pode ser visualizado na Figura 5.13a. Foram confeccionadas malhas com número crescente até o máximo de $4,03 \times 10^5$ nós. É possível observar na referida Figura que a partir de $1,66 \times$

10^5 nós obtem-se praticamente a mesma velocidade. Sendo assim, a malha com aproximadamente $1,66 \times 10^5$ nós foi empregada para a simulação do módulo obtido experimentalmente, tendo em vista que, com este número de nós foi possível obter uma velocidade máxima bastante aproximada daquelas obtidas com malhas de 2,45, 3,24 e $4,03 \times 10^5$ nós, que correspondem em tamanho a aproximadamente 1,5, 2,0 e 2,4 vezes o tamanho da malha adotada. A velocidade máxima foi o resultado empregado como parâmetro de comparação, no entanto, esta verificação poderia ser feita com outro resultado verificado, tal como o balanço de massa, por exemplo.

Foi observada uma tensão de cisalhamento máxima de 17,04 Pa, e uma diferença de pressão através da membrana ($\Delta(\Delta P_{TM})$) calculada 241 Pa (ou 0,241 kPa), a partir da definição da condição de contorno velocidade de entrada no módulo de 1 m/s, tal como simulado originalmente. Os perfis de pressão interna, externa e a diferença entre elas podem ser observada na Figura 5.13b. A diferença de pressão entre as superfícies interna e externa da membrana na entrada e na saída apresenta valor menor que o anteriormente simulado para a configuração selecionada (Simulação 6, Tabela 5.1).

Na Figura 5.13c a f são apresentados resultados de velocidade, em planos, linhas de corrente e na forma de vetores. A velocidade máxima observada corresponde a $1,98 \text{ m.s}^{-1}$.

Pode-se observar na Figura 5.13d baixa influência da malha, visto que o resultado se apresenta homogêneo no sentido radial do módulo, o qual tem a malha constituída pelas faces triangulares dos prismas.

Os resultados observados concordam com aqueles obtidos na simulação original, de modo a sugerir que o módulo obtido é adequado à operação de filtração de meio de cultivo contendo células animais, tendo em vista a reduzida tensão de cisalhamento observada. Além disso, pela suave queda de pressão observada a partir de CFD, o módulo demonstra ser apropriado para uso na recuperação do bioproduto, ampliando o ciclo de operação e a utilização dos ligantes imobilizados.

5.2. Seleção do ligante de afinidade

Visando à seleção de ligantes de afinidade para adsorção de GM-CSF, foram testados os ligantes heparina e azul de Cibacron, ambos apresentados na Figura 5.14. O emprego de heparina para a purificação de GM-CSF foi sugerido por SEBOLLELA *et al.* (2005), enquanto que o uso de azul de Cibacron advém de resultados de um trabalho exploratório, realizado em nosso grupo, cujos dados não foram publicados.

O azul de Cibacron 3G-A é um corante derivado de monoclorotriazina e contém 3 grupos sulfonatos ácidos e 4 grupamentos básicos, primários e secundários, podendo interagir especificamente com proteínas através destes grupamentos. É bastante empregado na cromatografia de afinidade com corantes, por sua eficiência e seletividade.

Segundo a literatura o azul de Cibacron é um bom exemplo de um ligante biomimético, pois a sua modelagem molecular de ligação com proteínas sugere o mimetismo com o NAD⁺ e, portanto, a seletividade de ligação às enzimas que necessitam deste cofator (como a álcool desidrogenase, por exemplo), mas outras moléculas podem estabelecer ligação com este corante, tal como albumina do soro humano (HSA), BSA, concanavalina A, lisozima de ovo (BEESKOW *et al.*, 1997), bilirrubina (BAYRAMOGLU *et al.*, 2005) e oxiredutase (ARICA *et al.*, 1997). Este corante pode ser imobilizado por reação nucleofílica (através do cloro do anel triazina) em suportes com grupamentos amino ou hidroxila.

Heparina é um glicosaminoglicano sulfatado, com elevada densidade de carga negativa, corriqueiramente usado para fins biomédicos devido as suas propriedades anticoagulante e antitrombogênica, pois age catalisando a reação entre trombina e/ou Fator Xa e ATIII (JOSHI *et al.*, 2006). É constituída de uma extensão heterogênea de unidades de sacarídeos repetidos, com MM entre 3000 e 30000 e uma média de 15000. Muito conhecida por suas propriedades anticoagulantes, tem sido estudada como um potencial modificador de superfícies, para ampliar a tromboresistência dos materiais.

Além disso, heparina tem sido empregada em várias matrizes (na forma de microcápsulas, fibras, "grafts" e géis, pois é conhecida sua capacidade de ligação e estabilização de fatores de crescimento, sendo capaz de potencializar sua atividade. De modo particular a heparina mostra uma proteção dos fatores de crescimento à inativação, ampliação de afinidade a receptores, aumento de eficiência dos fatores de crescimento nos veículos para liberação controlada, e a sustentação da liberação dos

fatores de crescimento por períodos de tempo maiores. As características diversificadas da heparina permitem a ligação de mais de 50 fatores de crescimento, tanto quanto a mediação por heparina e sulfato de heparan de importantes processos biológicos, incluindo trombose, adesão celular, metabolismo de lipídeos, regulação de enzimas, e ação citocina (SEBOLLELA *et al.*, 2005).

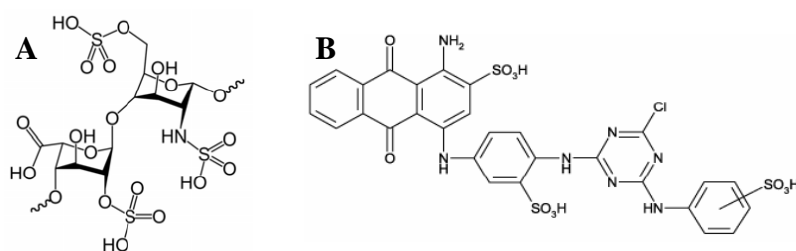


Figura 5.14 – Estruturas dos ligantes de afinidade heparina (A) e azul de cibacron F3G-A (B), estudados para a adsorção de GM-CSFrh.

Os ligantes azul de Cibacron e heparina foram utilizados em suportes comerciais, na forma de membrana plana (Sartobind blue – Sartorius) e em gel (HiTrap H – GE) respectivamente. Os ensaios foram executados tal como descritos no item 4.2.2.1, empregando os sistemas tamponantes da Tabela 5.5. As estruturas dos sais das soluções tampões indicam que o fosfato tem duas cargas negativas, o acetato tem uma carga negativa, o Tris-HCl uma carga positiva e o citrato-fosfato apresenta cinco cargas negativas (três do citrato + duas do fosfato).

Tabela 5.5 – Sistemas tamponantes empregados nos ensaios cromatográficos para a seleção de ligante para a purificação de GM-CSF

Ligante	Solução de equilíbrio	pH	Gradiente de eluição	Faixa de tamponamento	pKa
Azul de cibacron	Fosfato	7,5	NaCl (0 a 2 M)	5,8 a 8,0	7,2
	Tris-HCl	7,5	NaCl (0 a 2 M)	7,0 a 9,0	8,3
	Citrato-fosfato	7,5	NaCl (0 a 2 M) e pH (7,5-3)	2,2 a 8,0	7,2; 6,4
Heparina	Fosfato	7,5	NaCl (0 a 3 M)	5,8 a 8,0	7,2
	Acetato	5,0	NaCl (0 a 3 M)	3,7 a 5,6	4,75

Os perfis cromatográficos dos ensaios empregando azul de Cibacron como ligante podem ser observados nas Figuras 5.15, 5.16 e 5.17.

Como pode ser visualizado na Figura 5.15, onde é apresentado o perfil cromatográfico do ensaio cromatográfico empregando azul de cibacron utilizando solução tampão fosfato como solução de equilíbrio, durante a etapa de eluição são

observados picos de proteína, no entorno de 0,6 M de NaCl e outro quando a concentração salina encontra-se entre 1,2 e 1,8 M. Também pode ser observado neste mesmo ensaio um pico significativo nas frações coletadas da etapa de regeneração.

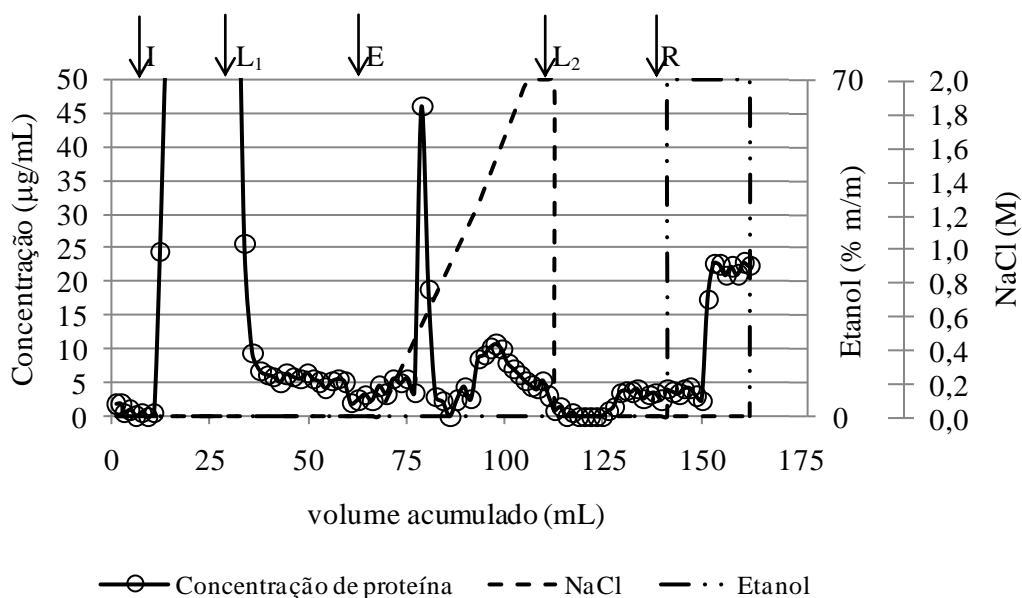


Figura 5.15 – Ensaio cromatográfico empregando azul de cibacron como ligante imobilizado em membrana comercial, com injeção de GM-CSF (comercial + sobrenadante). Tampão fosfato pH 7,5 (20 mM), com eluição em gradiente salino (0 a 2 M de NaCl) e concentração dada em termos de proteínas totais. Onde (I) injeção, (L₁ e L₂) lavagem (tampão fosfato pH 7,5, 20 mM), (E) eluição com gradiente salino e (R) regeneração (etanol 70% (% m/m)).

A Figura 5.16 apresenta o perfil do sistema azul de cibacron como ligante e solução tampão de fosfato como solução de equilíbrio. No entanto neste ensaio realizou-se a eluição através de dois degraus salinos (1,2 e 1,9 M de NaCl), enquanto que na Figura 5.15 demonstra-se uma eluição em gradiente. Observa-se melhor definição dos picos de eluição e de regeneração, se comparado ao ensaio demonstrado na Figura 5.15.

No entanto, embora as Figuras 5.15 e 5.16 apresentem picos de eluição protéica, os ensaios de *dot blot* realizados não permitiram identificar GM-CSF em qualquer das frações eluídas nestes ensaios cromatográficos, indicando a adsorção de outras proteínas no suporte preferencialmente ao GM-CSF.

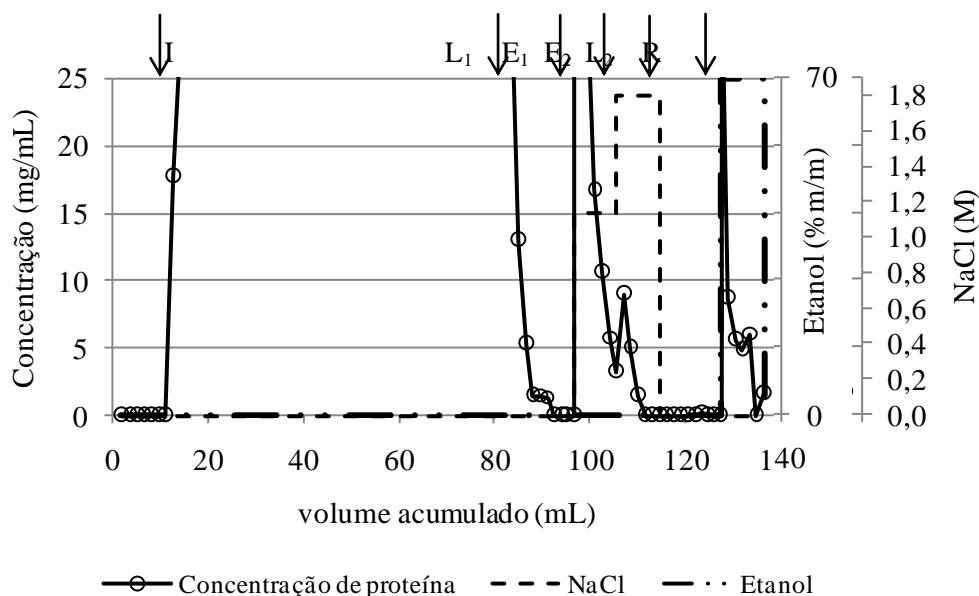


Figura 5.16 – Ensaio cromatográfico empregando azul de cibacron como ligante imobilizado em membrana comercial, com injeção de GM-CSF (comercial + sobrenadante). Tampão fosfato pH 7,5 (20 mM), com eluição em degrau de NaCl, concentração dada em termos de proteínas totais. Onde (I) injeção, (L_1 e L_2) lavagem (tampão fosfato pH 7,5, 20 mM), (E_1 e E_2) eluição com degrau de 1,2 e 1,9 M, respectivamente, e (R) regeneração (etanol 70% (% m/m)).

Também foi realizado um ensaio de adsorção em ligante azul de cibacron, imobilizado em membrana comercial, empregando solução tampão citrato-fosfato 20 mM pH 7,5. O tampão citrato-fosfato foi empregado como sistema de adsorção devido à sua ampla faixa de tamponamento (pH 2,2 a 8,0), que permite eluição por gradiente de pH. Assim, sobrenadante de cultivo celular concentrado foi alimentado à membrana e foi realizada uma eluição por aumento de força iônica (0 a 2 M de NaCl) e por decréscimo de pH (7,5 a 3,0), entretanto, não foi observada a dessorção de proteína na etapa de eluição, e tão somente na regeneração. Ainda assim, foi realizado o ensaio de *dot blot*, também com resposta negativa para GM-CSF. A elevada carga negativa do tampão (cinco cargas) pode justificar esta baixa adsorção de proteínas, incluindo BSA.

A Figura 5.17 A exibe o perfil cromatográfico do ensaio empregando azul de Cibacron como ligante e solução tampão Tris-HCl como solução de equilíbrio. Observa-se um pico de proteína em toda a etapa de eluição, embora mais proeminente entre 0,6 e 1,4 M de NaCl, e um outro pico nas frações coletadas da etapa de regeneração. Uma eletroforese SDS-PAGE (Figura 5.17 B) foi realizada com as frações eluídas, identificadas pelos números 1 a 8 no ensaio cromatográfico. As frações 5, 6 e 7 apresentam bandas entre a massa molar de 15 e 37 kDa, massa molar correlata ao GM-

CSF, glicosilado ou não. Há também bandas sempre presentes, em maior ou menor intensidade, entre os marcadores de 50 e 75 kDA, sugerindo a presença de BSA nas frações eluídas.

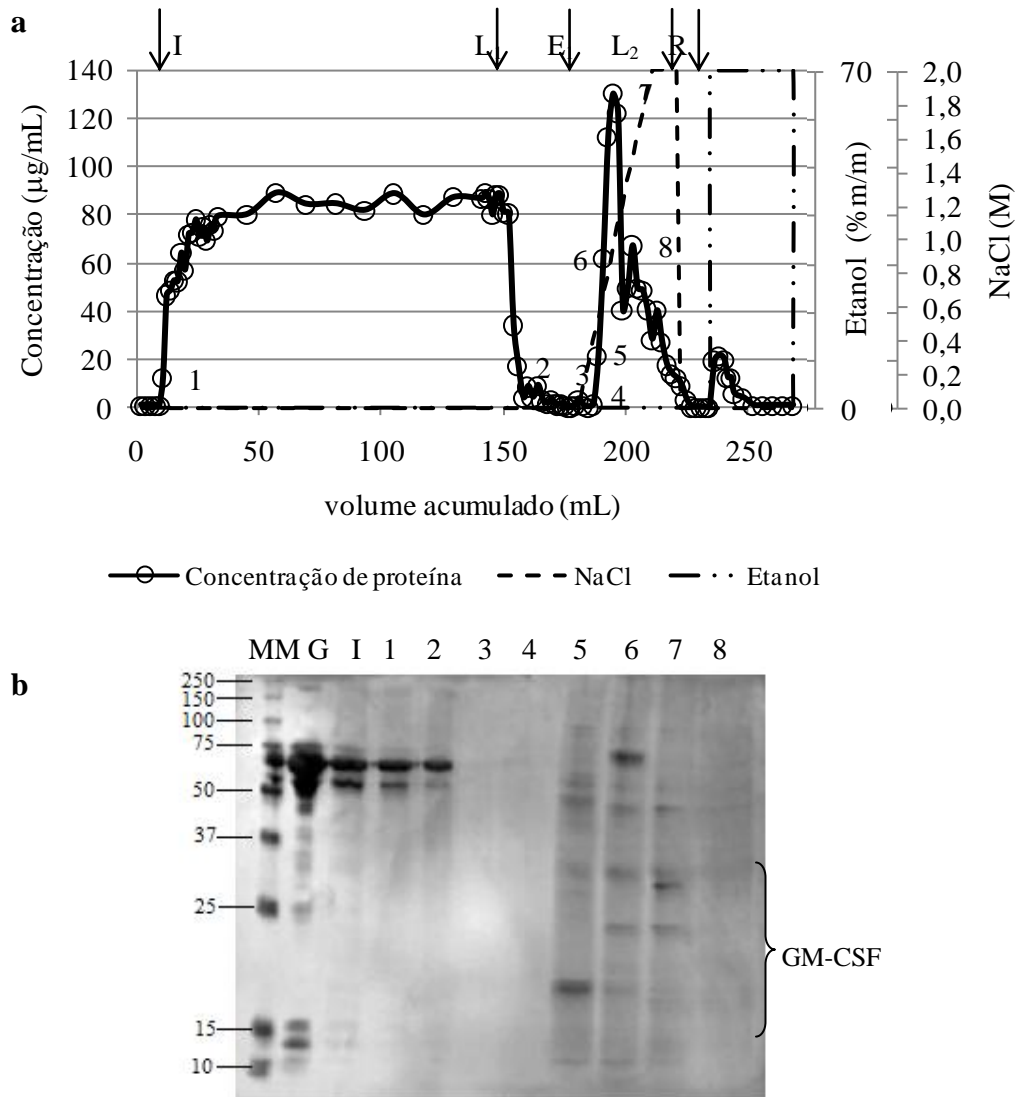


Figura 5.17 – Ensaio cromatográfico empregando azul de cibacron como ligante imobilizado em membrana comercial, com injeção de GM-CSF (comercial + sobrenadante). Tampão Tris-HCl pH 7,5 (20 mM), com eluição em gradiente de NaCl, concentração dada em termos de proteínas totais. (a) Perfil do ensaio cromatográfico, onde (I) injeção, (L1 e L2) lavagem (tampão Tris-HCl pH 7,5, 20 mM), (E1) eluição com gradiente de 0 a 2 M, e (R) regeneração (etanol 70% (% m/m)). (b) Eletroforese das frações de permeado recolhidas, onde (MM) marcadores de massa molecular, (G) GM-CSF comercial, (I) injeção e (1-8) frações coletadas.

Ocorre que BSA é adicionada ao GM-CSF comercial para estabilizá-lo. No sobrenadante de cultivo a BSA é oriunda do SFB, que apresenta tal proteína na constituição. Como azul de Cibacron interage com BSA, entende-se que uma adsorção

de BSA também está ocorrendo. No sistema empregando tampão fosfato como solução de equilíbrio esta interação parecer ainda maior, impedindo a adsorção de GM-CSF em níveis detectáveis pelo anticorpo em imunoenensaio realizado, tendo em vista que o resultado foi negativo e, portanto, não reproduzido aqui como figura.

Além disso, os pIs de ambas as proteínas (BSA e GM-CSF) se sobrepõem, dificultando ainda mais a separação por alteração da força iônica. Segundo CLARK-LEWIS e SCHRADER (1982) o pI do GM-CSF está entre 3,5 e 5,7, com pico de atividade em 4,7, exatamente o pI da BSA.

As frações eluídas neste ensaio cromatográfico (Figura 5.17) foram analisadas por imunoenensaio (*dot blot*), sendo observada a presença de GM-CSF nas frações eluídas e na regeneração, de modo que constitui o melhor resultado, empregando o ligante azul de Cibacron. Este resultado é apresentado na Figura 5.20 à frente, para comparação com o melhor ensaio empregando heparina como ligante.

Como indicado na Tabela 5.5, heparina foi avaliada com as soluções tampão fosfato e acetato, tal como indicado por SEBOLLELA *et al.* (2005). O perfil cromatográfico do ensaio de purificação de GM-CSF (proteína comercial adicionada a sobrenadante de células CHO) em coluna de heparina pode ser visualizado nas Figuras 5.18 e 5.19. A verificação qualitativa da presença da proteína de interesse nas frações coletadas ao longo do ensaio foi efetuada por análise de *dot blot*, a qual se baseia no reconhecimento por anticorpos seletivos anti-GM-CSF.

O ensaio empregando heparina e solução tampão fosfato de sódio, Figura 5.18, tal como observado para o ligante azul de Cibacron, embora tenha apresentado uma elevada retenção protéica, tanto na etapa de eluição quanto de regeneração, não apresentou resposta positiva para GM-CSF no ensaio *dot blot*, de modo que não houve adsorção de GM-CSF ou ele não pode ser reconhecido pelos anticorpos.

Já o ensaio empregando acetato como solução tampão, mostrado na Figura 5.19 A, permite observar uma pequena quantidade de proteína eluída, se comparado aos outros ensaios apresentados anteriormente. No entanto, GM-CSF pode ser identificado segundo a técnica de *dot blot*, demonstrando que tal proteína foi desorvida da coluna contendo heparina imobilizada (Figura 5.19 B), especialmente nas frações numeradas de 1 a 6 no cromatograma (Figura 5.19 A) e que correspondem às frações 39 a 44 da etapa de eluição da Figura 5.19 B, ou seja, na fração inicial desta, onde a concentração de NaCl encontra-se inferior a 1,5 M.

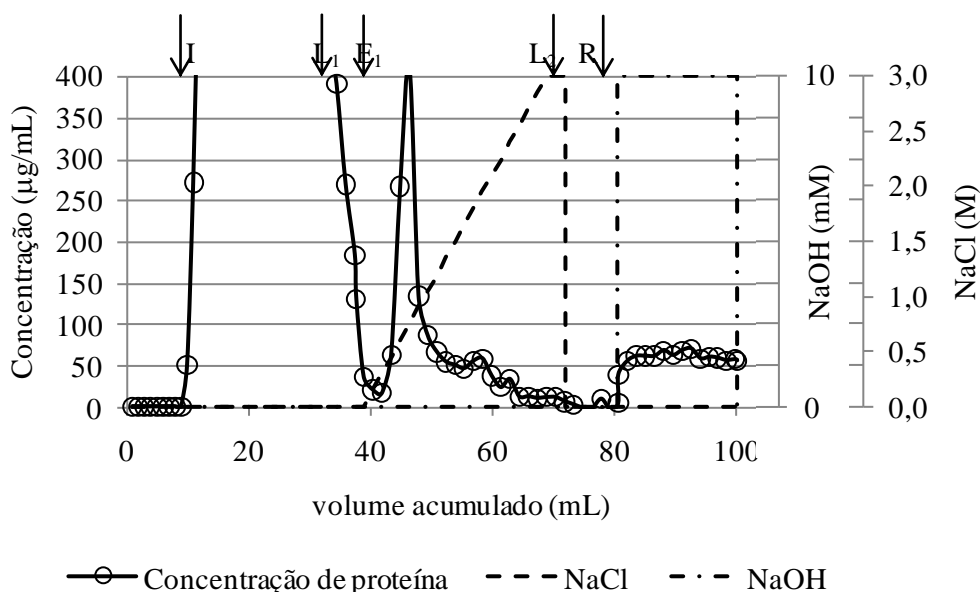


Figura 5.18 – Ensaio cromatográfico empregando heparina como ligante imobilizado em gel comercial, com injeção de GM-CSF (comercial + sobrenadante). Tampão fosfato de sódio pH 7,5 (20 mM), com eluição em gradiente de NaCl, concentração dada em termos de proteínas totais. Onde (I) injeção, (L₁ e L₂) lavagem (tampão fosfato de sódio pH 7,5, 20 mM), (E₁) eluição com gradiente de 0 a 2 M, e (R) regeneração (NaOH 10 mM).

As frações indicadas no cromatograma da Figura 5.19 com numeração 1 a 6 foram aplicadas em um gel de eletroforese SDS-PAGE, depois de dializadas, liofilizadas e tratadas com uréia 3 M. A injeção no gel de eletroforese foi realizada com um fator de concentração de 10 vezes. Foi observado nos ensaios eletroforéticos realizados que as amostras com este pré-tratamento (liofilização + uréia) tendem a deformar a migração das proteínas no gel de eletroforese, tal como pode ser observado na Figura 5.19 C. A adição de uréia nas amostras foi realizada para eliminar a formação de dímeros do GM-CSF com outras proteínas presentes no sobrenadante, ou no GM-CSF comercial, que contém somente BSA como proteína aditiva da formulação. Tendo em vista que foram realizados ensaios de *Western blot* (não apresentados) em que proteínas com massa molar maior que 37 kDa e 100 kDa foram reconhecidas pelos anticorpos.

Na Figura 5.19 C, em todas as frações eluídas, pode ser observada a presença de BSA (banda entre 50 e 75 kDa), no entanto em intensidade bem inferior à alimentação e ao GM-CSF padrão. Nas colunas 1 a 6 da eletroforese podem ser verificadas bandas, com maior ou menor intensidade, que correspondem à massa molar do GM-CSF (14 a 32 kDa). Pode ser observado também que a coluna 4 da eletroforese,

correspondente à amostra 43 do *dot blot* (Figura 5.19 b), apresenta uma banda muito tênue, entre os marcadores de massa molecular de 10 e 15 kDa (indicada pela seta), mas corresponde a uma elevada intensidade verificada no ensaio de *dot blot*. Embora todas as frações analisadas por eletroforese tenham uma resposta positiva no imunoenensaio, a fração 42 demonstra um maior reconhecimento em termos de anticorpo.

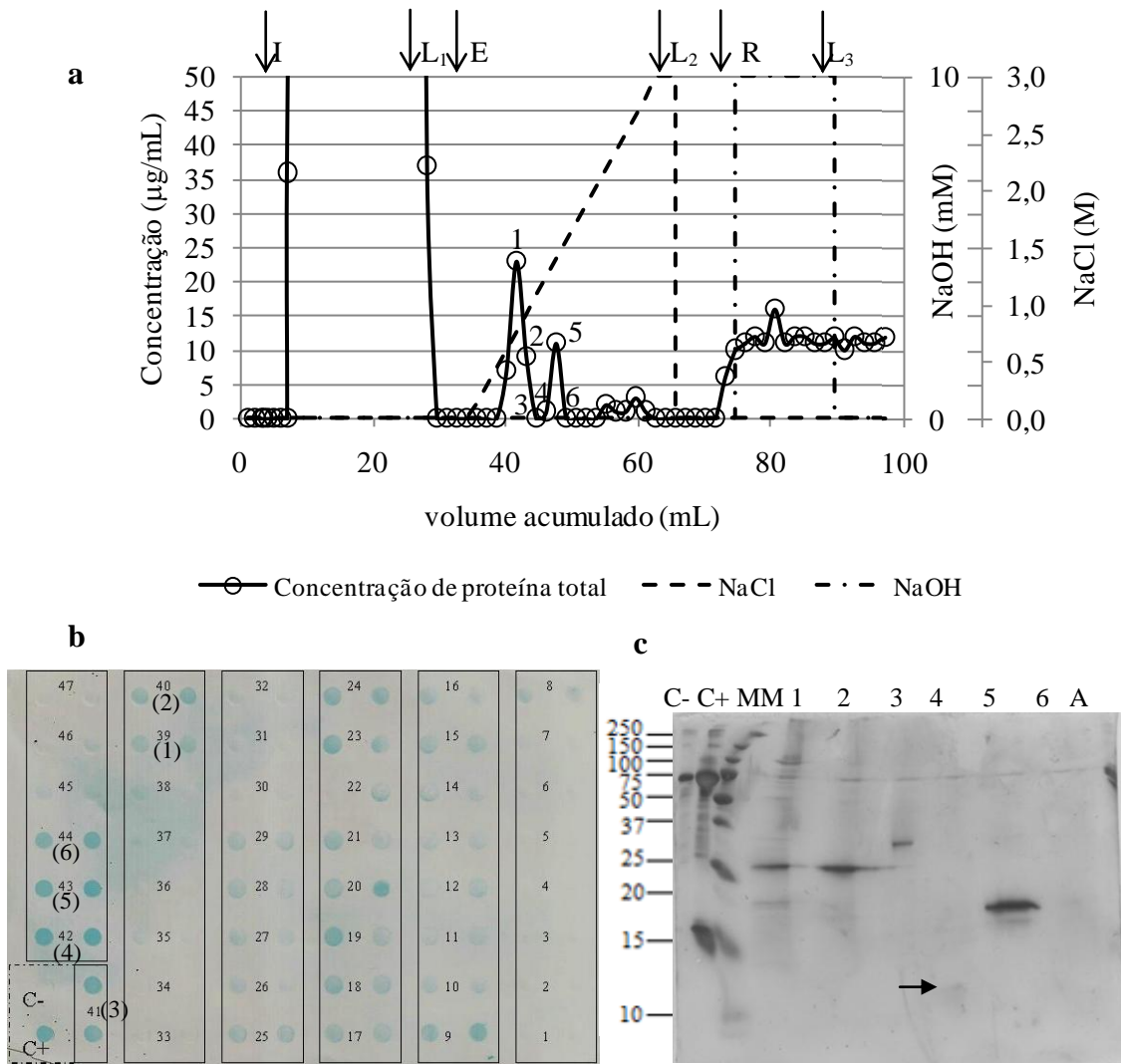


Figura 5.19 – Ensaio cromatográfico empregando heparina como ligante imobilizado em gel comercial, com injeção de GM-CSF (comercial + sobrenadante). Tampão acetato pH 5,0 (20 mM), com eluição em gradiente salino (0 a 3 M de NaCl) e concentração dada em termos de proteínas totais. (a) Perfil de um ensaio cromatográfico, onde (I) injeção, (L₁, L₂ e L₃) lavagem (tampão acetato pH 5, 20 mM), (E) eluição com gradiente salino e (R) regeneração (NaOH 0,01M). (b) *Dot blot* das frações 1 a 47 do ensaio cromatográfico apresentado em (a), onde (C-) é o controle negativo (BSA), (C+) é o controle positivo (GM-CSFrh comercial), frações de 1 até 29 referem-se à etapa de injeção e a partir da fração 35 são apresentadas as frações da eluição, e valores entre parênteses correspondem aos picos indicado em (a). (c) Eletroforese do ensaio cromatográfico (a).

É possível ainda concluir que existem distintas intensidades de forças de interação entre o suporte contendo heparina imobilizada e as diferentes moléculas de GM-CSF, que se distinguem pelo grau de glicosilação. Observa-se que a adsorção das moléculas de GM-CSF está sendo influenciada pela glicosilação, mas não de forma proporcional, ou seja, não se pode concluir somente que o aumento da glicosilação aumenta ou diminui a interação entre o ligante e as diferentes isoformas do GM-CSF. Tomando a coluna 5 como exemplo, com duas bandas de proteína na eletroforese, sendo mais intensa aquela próxima aos 20 kDa, demonstra ter maior interação com o ligante, visto que foi necessário o emprego de maior força iônica para dessorvê-lo da matriz, do que a coluna 4, onde verifica-se uma banda bastante clara, próxima aos 15 kDa.

Esta observação sugere que os aminoácidos, de interesse na interação proteína-ligante da cadeia protéica, podem estar mais acessíveis em determinada isoforma, ainda que contenha maior quantidade de açúcares na estrutura terciária.

Como demonstrado, foram realizados vários ensaios cromatográficos preliminares, empregando os ligantes heparina e azul de Cibacron. Os resultados mais promissores indicaram o ligante heparina com solução de equilíbrio tampão acetato e o azul de Cibacron empregando o tampão Tris-HCl, tal como pode ser verificado na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Melhores resultados obtidos nos ensaios de adsorção de GM-CSF

Ligantes	Heparina	Azul de Cibacron
Suporte	Agarose ⁽¹⁾	Celulose ⁽²⁾
Equilíbrio	Tampão Acetato 20 mM, pH 5,0	Tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5
Lavagem	Tampão Acetato 20 mM, pH 5,0	Tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5
Eluição	Gradiente de NaCl 2 M	Gradiente de NaCl 2 M
Regeneração	NaOH 0,01M	Etanol 70%

Onde: (1) coluna Hi-Trap 1 mL, GE Healthcare; (2) membrana Sartobind Blue 75, Sartorius.

A fim de comparar os ligantes heparina e azul de Cibacron suportados em matrizes comerciais, foram realizados ensaios de adsorção de GM-CSF_{rh} comercial, empregando os sistemas tamponantes descritos na Tabela 5.6. Foram injetados 250 µL de solução de GM-CSF com concentração correspondente a 150 µg/mL. As alíquotas

módulo de filtração do tipo casco-tubo e submetidas à imobilização de heparina, ligante selecionado nos ensaios cromatográficos exploratórios para purificação de GM-CSF.

5.3.1. Obtenção das fibras ocas de PEI-PVP

As fibras ocas de PEI/PVP, com configuração compatível com os resultados das simulações em CFD, foram preparadas pelo processo de inversão de fases, utilizando-se poli(éter imida) (PEI) como polímero base, poli(vinil pirrolidona) (PVP) para modificar a viscosidade da solução e diminuir a hidrofobicidade da membrana e N-metil-2-pirrolidona (NMP) como solvente, segundo descrito no item 4.2.2 (Metodologia). As estruturas dos referidos polímeros são dispostas na Figura 5.21.

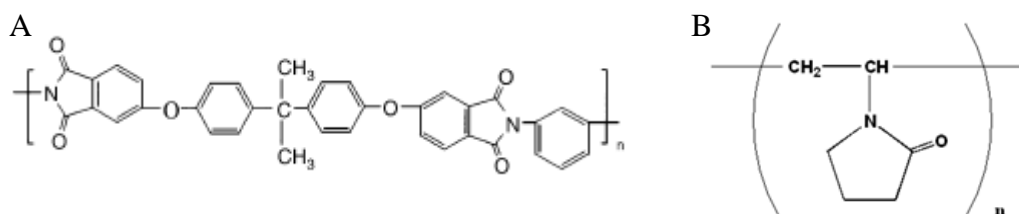


Figura 5.21 – Estrutura dos polímeros empregados para obtenção das fibras ocas: (A) PEI e (B) PVP.

Em tal método foram empregadas diferentes condições de fiação (C1 a C8), tal como distância extrusora banho de precipitação (L_{E-Ba}), vazão ($vazão_{LI}$) e composição do líquido interno, cujos valores são apresentados na Tabela 5.7. Os experimentos foram identificados segundo ensaios de fiação (F1 a F4), visto que, em um mesmo ensaio, foi empregada uma única composição de solução interna de precipitação e diferentes condições experimentais.

Como pode ser observado na Tabela 5.7, foram realizados 18 experimentos a fim de se obter uma membrana de microfiltração com características correspondentes às aquelas indicadas por CFD como adequada à filtração de células animais. Assim, era necessário obter uma membrana sem pele nas superfícies interna e externa, mas com diâmetro de poro na superfície interna inferior a 10 μm e com diâmetro do lúmen de no mínimo 950 μm , medidas estas obtidas por Microscopia de Varredura Eletrônica.

Tabela 5.7 – Condições experimentais manipuladas para a obtenção das fibras ocas de PEI/PVP (15/10 %m/m)

Fiação	Ensaio	Condição	Vazão _{LI} (mL/min)	Composição do Líquido Interno	L _{E-Ba} (cm)
1	F1C1	1	3,7	70% NMP; 30% água	7
1	F1C2	2	3,7	70% NMP; 30% água	18
1	F1C3	3	1,3	70% NMP; 30% água	18
1	F1C4	4	2,3	70% NMP; 30% água	18
1	F1C5	5	2,3	70% NMP; 30% água	29
1	F1C6	6	2,8	70% NMP; 30% água	29
2	F2C1	1	2,5	76,4% NMP; 13,6% água; 10% PVP	1
3	F3C1	1	3,1	63% NMP; 27% água; 10% PVP	4
3	F3C2	2	2,5	63% NMP; 27% água; 10% PVP	16
3	F3C3	3	3,1	63% NMP; 27% água; 10% PVP	23
4	F4C1	1	2,3	60,5% NMP; 30,7% água; 8,8% PVP	28
4	F4C2	2	2,3	60,5% NMP; 30,7% água; 8,8% PVP	14
4	F4C3	3	1,8	60,5% NMP; 30,7% água; 8,8% PVP	6
4	F4C4	4	1,8	60,5% NMP; 30,7% água; 8,8% PVP	11
4	F4C5	5	1,8	60,5% NMP; 30,7% água; 8,8% PVP	16
4	F4C6	6	1,8	60,5% NMP; 30,7% água; 8,8% PVP	21
4	F4C7	7	3,2	60,5% NMP; 30,7% água; 8,8% PVP	21
4	F4C8	8	4,3	60,5% NMP; 30,7% água; 8,8% PVP	21

Onde: (Vazão_{LI}) vazão do líquido interno; (L_{E-Ba}) distância da saída da extrusora ao banho de precipitação.

O primeiro ensaio de obtenção das fibras ocas (chamada de Fiação 1), cuja composição (em massa) do líquido interno correspondia a 70% NMP e 30% água, resultou em membranas com deformação do perímetro interno, fenômeno que ocorre devido à precipitação instantânea da solução polimérica na superfície da membrana e à expansão visco-elástica da solução na saída da extrusora. Segundo MAYER *et al.* (1997) este fenômeno resulta da velocidade distribuída de forma não homogênea ao longo da seção de escoamento, zero na parede (tensão de cisalhamento) e elevada no centro (perfil parabólico).

Algumas das fotomicrografias das membranas obtidas na Fiação 1 são apresentadas na Figura 5.22.

Além da deformação do perímetro interno, as superfícies internas das membranas obtidas no primeiro ensaio de fiação apresentaram-se compactas, sem a presença de poros.

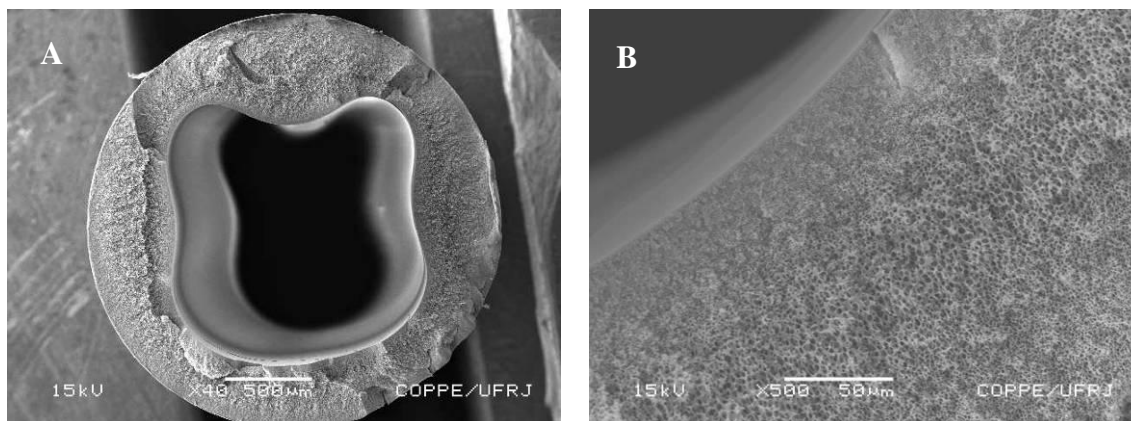


Figura 5.22 – Fotomicrografias da seção transversal da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C1 (líquido interno: 70% NMP/30% H₂O (% m/m); vazão_{LI}: 3,7 mL/min; L_{E-Ba}: 7 cm). (A) Seção transversal da membrana. (B) Ampliação da seção transversal próxima à superfície interna. Barras correspondem a 500 e 50 µm, respectivamente.

Para permitir uma melhor acomodação das tensões visco-elásticas dos fluidos extrusados (solução polimérica e líquido interno) foi adicionado PVP à solução de líquido interno, visando à ampliação da sua viscosidade, resultando em menor diferença de viscosidade entre as soluções e, portanto, em menor deformação da superfície interna da membrana.

Visando aumentar o tempo de precipitação da solução polimérica, foi ampliada a proporção de solvente da solução polimérica (NMP) no líquido interno. Deste modo é possível reduzir o fluxo de solvente da fase polimérica para o líquido interno, resultando em uma precipitação mais lenta, com obtenção de poros maiores. Além disso, quando a precipitação é mais lenta, há uma melhor acomodação das tensões, o que reduz o efeito de deformação do perímetro interno (LIANG e NESS, 1998).

Deste modo, no segundo ensaio de fiação, a composição da solução polimérica foi mantida constante e o líquido interno foi empregado segundo uma composição de 76,4% de NMP, 13,6% de água deionizada e 10% de PVP, em massa. No entanto, a manutenção do processo de obtenção das membranas (fiação) só foi alcançada mediante um L_{E-Ba} muito pequeno (1 cm). Maiores distâncias entre a saída da extrusora e a superfície do banho de precipitação causaram rompimento na membrana ou geração de membrana com diâmetro interno muito pequeno ou inexistente, observando-se ainda uma dissolução da solução polimérica na interface com o líquido interno, indicando excesso de solvente no líquido interno.

A amostra obtida não foi visualizada no MEV, pois macroscopicamente não se enquadrava nas características desejadas, por apresentar um reduzido diâmetro interno.

A partir do primeiro ensaio de fiação das membranas, optou-se por observar ao microscópio somente as membranas potencialmente viáveis para o emprego no presente trabalho.

A partir do resultado do segundo ensaio de fiação optou-se pela redução da concentração de solvente no líquido interno, mas ainda com a adição de PVP, visando à redução da deformação do perímetro interno.

Sendo assim, o terceiro ensaio de obtenção das membranas foi realizado com a mesma composição da solução polimérica (10% de PVP, 15% de PEI, 75% de NMP) e com líquido interno com composição mássica de 63% NMP, 27% de água deionizada e 10% de PVP. Pode ser observada uma viscosidade mais elevada do líquido interno, dificultando a extrusão das membranas e a posterior troca de solventes, tendo em vista que as membranas apresentaram-se úmidas e amareladas (cor da solução polimérica sem precipitação), mesmo seguindo o mesmo protocolo de troca de solventes que as outras amostras, indicando uma dificuldade na transferência de massa entre as fases.

Com o resultado acima, decidiu-se pela redução da massa de PVP, reduzindo assim a viscosidade do líquido interno, sem ampliar a proporção de solvente (NMP). Assim, realizou-se a quarta fiação com a mesma composição de solução polimérica e com uma solução de líquido interno cuja composição em massa era de 60,5% de NMP, 30,7% de água deionizada e 8,8% de PVP, cujas membranas resultantes, com perímetro interno mais regular, foram selecionadas para a caracterização por MEV.

Neste quarto ensaio de fiação foi obtida uma membrana (Fiação 4, condição 8 – F4C8) cuja seção transversal apresentou-se bastante uniforme (Figura 5.23 A) e que, em termos de estrutura, mostrou-se estável e bastante porosa (Figura 5.23 B e C). Foram observados poros distribuídos uniformemente, maiores que 0,5 μm na superfície interna e poros com diâmetros entre 2 e 3 μm na superfície externa (Figura 5.23 D). Fotomicrografias de outras membranas, obtidas a partir de condições dos ensaios de fiação executados, podem ser visualizadas no ANEXO IV.

A seleção da membrana foi baseada nas simulações, pois foi observada uma melhoria da resposta de interesse significativa (ΔP_{TM}) no sentido do aumento do diâmetro da membrana, ou seja, que membranas com diâmetros maiores são mais apropriadas para uso como suporte cromatográfico neste trabalho.

Deste modo, a membrana obtida no ensaio F4C8 foi selecionada para a continuidade dos experimentos, tendo em vista a presença de poros externos e internos, e por apresentar uma seção transversal sem a presença de deformação, ainda que o

diâmetro interno desta membrana tenha sido maior que o desejado (resultado das simulações em CFD), tal como pode ser observado na Tabela 5.8.

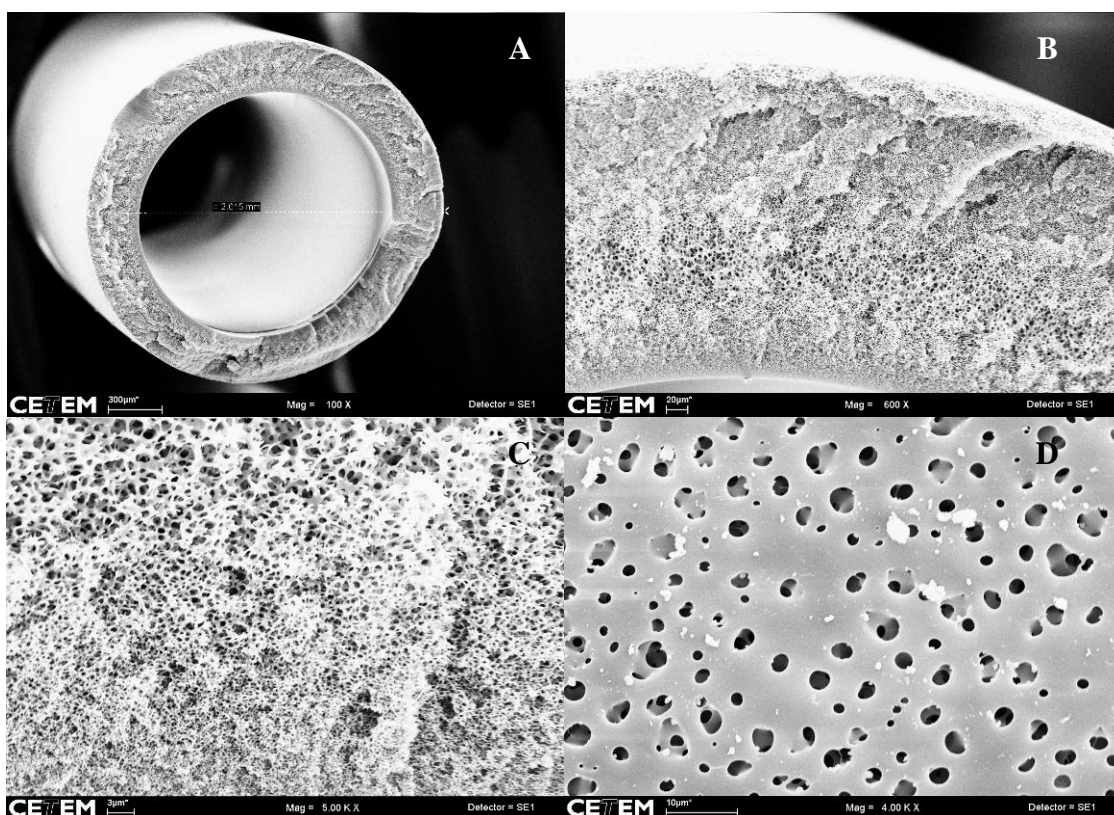


Figura 5.23 – Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F4C8 (líquido interno: 60,5% NMP/30,7% H₂O/8,8% PVP (%m/m); vazão_{LI}: 4,3 ml/min; L_{E-Ba}: 21 cm. (A) Seção transversal com medida do diâmetro externo (linha pontilhada) (2015 μ m). (B) Ampliação da seção transversal. (C) Ampliação da região central da espessura da membrana. (D) Superfície externa. Barras correspondem a 300, 20, 3 e 10 μ m, respectivamente.

Tabela 5.8 – Características da membrana de fibra oca simulada inicialmente e obtida experimentalmente

Características	Membrana Obtida	Membrana Simulada
Diâmetro interno (D_{int})	1,459 mm	0,950 mm
Diâmetro externo	2,015 mm	1,200 mm
Espessura da parede	278 μ m	125 μ m

As membranas foram então acondicionadas em uma carcaça de vidro, empregando um total de 40 membranas para obtenção do módulo de permeação, que pode ser visualizado na Figura 5.24, cujas características físicas são apresentadas na Tabela 5.9.

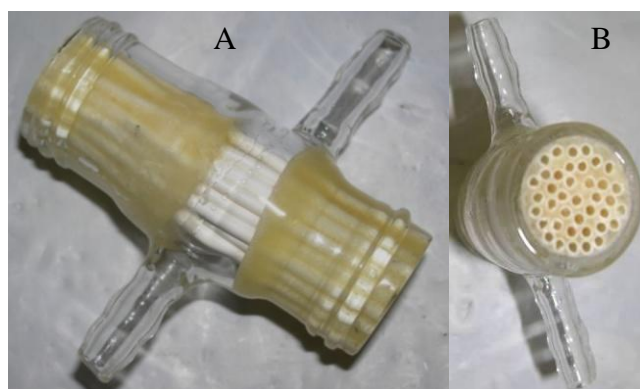


Figura 5.24 – Módulo de permeação com carcaça de vidro e membrana de PEI/PVP sem uso (A) e extremidade mostrando o arranjo das fibras empacotadas (B).

Tabela 5.9 – Características do módulo de permeação obtido

Número de fibras	40
Área de permeação	18,34 cm ²
Massa seca de membrana	0,1893 g
Volume de membrana	0,6068 mL
Densidade de empacotamento	5,84 x 10 ⁻² m ² /m ³

Depois do empacotamento das membranas em um módulo, este foi testado em termos da permeabilidade hidráulica. Como o meio de cultivo é alimentado ao módulo através do interior das fibras ocas, foi considerado o perímetro interno para a determinação da área de permeação. A permeabilidade hidráulica, que indica o fluxo permeado em função da diferença de pressão entre as superfícies externa e interna das membranas (ΔP_{TM}), foi de 771,95 L.h⁻¹ m⁻² bar⁻¹ (0,214 x 10⁻⁵ m.s⁻¹.kPa⁻¹), a 24°C, confirmando a obtenção de uma membrana com características típicas para utilização no processo de microfiltração.

5.3.2. Imobilização de Heparina em Membrana de PEI/PVP

Visando à imobilização de heparina nas membranas obtidas, foram realizados ensaios para a adequação de métodos descritos na literatura.

Com base no trabalho de ALBRECHT *et al.* (2006), realizou-se a derivatização, através de substituição nucleofílica, com a imobilização de poli(etileno imina) (pei), composto rico em radicais amino, no grupamento imida do polímero poli(éter imida) (PEI), composto estrutural das membranas. A reação sugerida por ALBRECHT *et al.* (2006) pode ser visualizada na Figura 5.25.

Segundo a técnica desenvolvida por ALBRECHT *et al.* (2006), o material poroso de PEI é totalmente recoberto por pei em uma camada de 7 nm de espessura,

estabelecendo uma ligação covalente, permitindo assim a preparação de membranas compósitas com material que se ligue covalentemente à pei. Além disso, as cadeias de poli(etileno imina) ligadas covalentemente contêm grupamentos amina disponíveis para variadas reações, tal como formação de bases de Schiff com aldeídos.

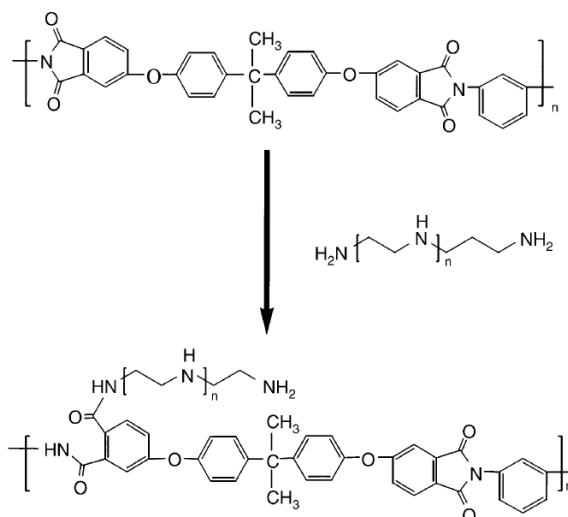


Figura 5.25 – Esquema de reação de poli(éter imida) com poliaminas (adaptado de ALBRECHT *et al.*, 2006).

Subseqüentemente, foi promovida a imobilização de heparina, adotando o método sugerido por NGUYEN *et al.* (2003) com modificações. No referido trabalho os pesquisadores obtêm membranas de heparina e de GOx (glicose oxidase), a partir da imobilização em poli(etileno imina), com base na forte atração eletrostática entre dois componentes com carga oposta, estabelecido entre as biomoléculas e pei.

Na imobilização de GOx os autores descrevem uma reticulação com glutaraldeído, mas não a fazem quando da imobilização de heparina, observando uma baixa adsorção de trombina (proteína com afinidade por heparina) à heparina imobilizada.

Modificações de materiais apresentadas na literatura, para imobilização de heparina, em geral são destinadas à obtenção de materiais biocompatíveis, que previnam a agregação plaquetária e formação de trombos (KEUREN *et al.*, 2003; NGUYEN *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2005; ALBRECHT *et al.*, 2006; JOSHI *et al.*, 2006). A ação da heparina, neste caso, se dá pela ligação da anti-trombina proveniente da circulação sangüínea, minimizando a adsorção de fibrinogênio. Em outros casos, a imobilização de heparina, ainda baseada em cargas elétricas opostas, é feita para evitar a

adesão celular e de outras proteínas, que não a anti-trombina, como agente anti-inscrustação, tal como no desenvolvimento de biosensores e em dispositivo microfluídico (HASHIMOTO *et al.*, 2008). Mas em ambas finalidades o material final não fica exposto a variações de pH ou de força iônica. Para atuar como um suporte cromatográfico, no entanto, é necessária uma estabilidade química frente a estes fatores, tendo em vista que a maioria dos processos de adsorção para fins de purificação envolve variação de pH ou de concentração salina seletiva para adsorver/dessorver moléculas.

Segundo HERMANSON *et al.* (1992), a heparina imobilizada pode ser usada para purificar várias proteínas, particularmente certos fatores de coagulação, proteínas anti-heparina, proteínas de membrana, enzimas e lectinas, sendo assim, a heparina é uma poderosa proposta geral para elaboração de um suporte de afinidade, permitindo a purificação de várias proteínas, através de eluição diferencial, com gradiente salino. No entanto, o método convencional para imobilizar heparina em suportes utiliza CNBr, agente altamente tóxico, que gera suporte com perda pequena mas constante do ligante.

Sendo assim, adotou-se, no presente trabalho, uma modificação do método de imobilização de heparina, empregando-se uma etapa posterior, não usada por NGUYEN *et al.* (2003), de reação com glutaraldeído, reconhecido como agente reticulante capaz de, sob condições adequadas, estabelecer ligações covalentes com compostos de terminação amino disponível, tal como pei, de modo a entrelaçar as unidade de heparina. Após a etapa de reação com glutaraldeído, foi realizada uma etapa de lavagem com glicina, conforme indicado por WANG *et al.* (2006), visando ao bloqueio dos grupamentos aldeído livres que porventura possam estar presentes ainda sobre a membrana, podendo interagir com as proteínas da alimentação no processo cromatográfico. O método de imobilização encontra-se descrito no item 4.2.2.

As alíquotas coletadas das soluções contendo heparina, antes e após o período de imobilização, assim como a primeira solução de PBS empregada para lavagem das membranas, foram quantificadas em termos de heparina, tanto no ensaio empregando membranas cortadas, quanto no ensaio de imobilização em membranas suportadas no módulo de permeação, visando determinar a massa de heparina imobilizada. Estes dados podem ser observados na Tabela 5.10.

A capacidade de imobilização de heparina (massa de heparina por massa de membrana seca) obtida foi aproximadamente igual para as membranas suportadas em módulo (0,3492 g de heparina/g membrana) e as membranas finamente cortadas (0,3194

g de heparina/g membrana), representando um aumento de 9,3% na quantidade de ligante imobilizado por massa de membrana.

Tabela 5.10 – Dados experimentais obtidos nos ensaios de imobilização de heparina em membrana cortada e no módulo de permeação

	Membrana Cortada	Módulo
Massa de heparina na solução inicial (mg)	247,14	247,47
Massa de heparina não adsorvida (mg)	111,52	181,81
Massa de heparina adsorvida (mg)	135,63	65,66
Volume de solução empregada (mL)	24,50	25,00
Concentração solução inicial (mg/mL)	10,09	9,90
Massa de membrana seca para imobilização (g)	0,4246	0,1880 ⁽¹⁾
Massa de heparina imobilizada/massa de membrana seca	0,3194	0,3492
Massa de heparina adsorvida/Área de permeação (mg/cm ²) ⁽²⁾	3,29	3,60 ⁽³⁾
Heparina adsorvida na membrana (%)	54,88%	26,53%

Onde: (1) relação massa de membrana (g)/comprimento linear (cm): 0,0047 g/cm; (2) relação massa de membrana (g)/área de permeação (cm²): 0,0103 g/cm²; (3) a relação massa de heparina/área de permeação (mg/cm²) foi determinada pela relação descrita em (2), mas pode ser confirmada pela relação da massa de heparina imobilizada/área de permeação calculada do módulo (18,34 cm²): 3,58 mg/cm².

Este aumento da capacidade, embora pequeno, possivelmente se deve a ativação mais eficiente das membranas contidas no módulo, devido ao procedimento utilizado, tendo em vista que, na imobilização no módulo de permeação, as soluções foram alimentadas através de uma bomba peristáltica ao módulo de filtração, em modo tangencial, forçando a passagem da fase móvel pelo interior dos poros da membrana. No entanto, pela pequena diferença de capacidade, não se observa impedimento significativo na membrana em termos de transferência de massa, que pode ser justificado pela característica de membrana de microfiltração. Deve ser observado também que a quantificação de heparina está sendo feita com base na diferença das massas de heparina.

CHEN e colaboradores (2005) imobilizaram 0,68 µg de heparina/cm² de superfície de silicone através do espaçador PEG (poli(etileno glicol)), para uso como superfície antitrombogênica. A quantificação foi feita pelo método de azul de toluidina. Já a coluna de heparina comercial (HiTrap H, GE Healthcare), empregada nos ensaios exploratórios para a purificação de GM-CSF, apresenta uma capacidade de aproximadamente 10 mg de heparina/mL de gel de agarose (método de quantificação não indicado). Pode-se concluir que a capacidade de imobilização de heparina na

membrana (3,6 mg de heparina/cm² de membrana ou 5,93 mg de heparina/mL de leito de membrana) apresenta um valor intermediário adequado, tendo em vista que o trabalho de CHEN e colaboradores (2005) refere-se a superfície de silicone, material não poroso, e a coluna comercial contém gel de agarose, com elevada área superficial.

Como não havia na literatura a descrição de um método de reticulação com glutaraldeído após imobilização de heparina em poli(etileno imina), foi realizado um experimento exploratório, visando obter informações a respeito da concentração de solução de glutaraldeído e do tempo de contato, sendo o resultado observado em termos de adsorção específica de GM-CSF e adsorção não específica, na qual empregou-se BSA. Observaram-se valores da literatura, empregados na reticulação com glutaraldeído de ligantes para adsorção. Verificou-se que a concentração de glutaraldeído não poderia ser alta, pois resultaria em reticulação excessiva, dificultando o acesso ao sítio de interação entre a molécula de interesse e ligante de afinidade, ou ainda causando modificações conformacionais no ligante, de modo a reduzir ou eliminar a interação entre este a molécula de interesse. Assim, foram realizados os experimentos descritos na Tabela 4.3, obtendo como resposta a adsorção de GM-CSF e de BSA (Figuras 5.26, 5.27, 5.28 e 5.29).

O imunoenensaio do tipo *slot blot* realizado para identificar GM-CSF nas frações (Figura 5.26) demonstrou que ocorre adsorção de GM-CSF em todas as membranas derivatizadas, evidenciando que há uma modificação no comportamento de adsorção frente às membranas original (MO) e contendo heparina imobilizada (MHep). Em todos os experimentos com membrana reticulada por glutaraldeído houve adsorção de GM-CSF desorvido principalmente nas etapas de eluição E1 a E3 (0,3, 0,6 e 0,9 M de NaCl, respectivamente), concordando com os resultados de desorção de GM-CSF da coluna de heparina empregada nos ensaios exploratórios. Pode-se observar ainda que a membrana cujas condições de reticulação foram 1% de glutaraldeído e 10 minutos de reação (coluna 3, Figura 5.26) apresentou perda significativa de GM-CSF na etapa lavagem L1, indicando que parte do glutaraldeído possa não ter sido ligado em ambas as extremidades à matriz recoberta com PEI, gerando adsorção não específica. Esta suposição é corroborada pela maior quantidade relativa de BSA desorvida justamente nos ensaios utilizando esta membrana (Figura 5.27).

A membrana de PEI/PVP sem qualquer derivatização não adsorveu GM-CSF (MO - coluna 1, Figura 5.26), visto que ambos os imunoenaios (*slot blot* e ELISA) não permitiram observar GM-CSF nas etapas de eluição.

Membrana Original (MO)	MO+pei+heparina (MHep)	1% Glutaraldeído, 10 min	0,1% Glutaraldeído, 60 min	0,55% Glutaraldeído, 35 min		1% Glutaraldeído, 60 min	0,55% Glutaraldeído, 35 min	0,1% Glutaraldeído, 10 min	
<u>S_{MO}</u>	<u>S_{MHep}</u>	<u>S_{1;10}</u>	<u>S_{0,1;60}</u>	<u>S_{0,5;35}</u>	<u>R_{MO}</u>	<u>S_{1;60}</u>	<u>S_{0,5;35}</u>	<u>S_{0,1;10}</u>	<u>R_{1;60}</u>
L1	L1	L1	L1	L1	<u>R_{MHep}</u>	L1	L1	L1	<u>R_{0,5;35}</u>
E1	<u>E1</u>	E1	<u>E1</u>	E1	<u>R_{1;10}</u>	<u>E1</u>	E1	<u>E1</u>	<u>R_{0,1;10}</u>
E2	E2	<u>E2</u>	<u>E2</u>	<u>E2</u>	<u>R_{0,1;60}</u>	<u>E2</u>	<u>E2</u>	<u>E2</u>	<u>C+</u>
E3	E3	E3	E3	E3	<u>R_{0,5;35}</u>	<u>E3</u>	E3	E3	<u>C-</u>
E4	E4	E4	E4	E4	<u>A</u>	E4	E4	E4	<u>A</u>
E5	E5	E5	E5	E5	<u>C-</u>	E4	E4	E4	
L2	L2	L2	L2	L2	<u>C+</u>	L2	L2	L2	

Figura 5.26 – Imunoensaio do tipo *slot blot*, realizado com amostras das etapas dos ensaios de adsorção em membrana PEI/PVP cortada em pedaços. Onde: (MO) membrana sem modificações; (MHep) membrana com heparina imobilizada sem reticulação; demais colunas: membrana com heparina imobilizada e diferentes condições de reticulação; S corresponde à solução remanescente da etapa de adsorção (sobrenadante); L₁ e L₂ indicam lavagem com tampão acetato; E₁ a E₅ eluição com concentrações salinas de 0,3, 0,6, 0,9, 1,2 e 1,5 M; R regeneração; A é a solução de GM-CSF comercial alimentada a todas as membranas, C+ controle positivo (GM-CSF) e C- controle negativo (BSA).

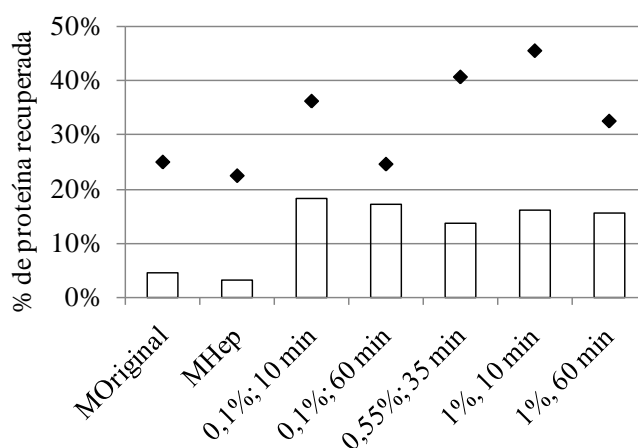


Figura 5.27 – Proteína recuperada nas etapas de eluição dos ensaios de adsorção em membrana PEI/PVP cortada em pedaços. Onde: (MO) membrana sem modificações; (MHep) membrana contendo heparina sem reticulação; (X%; Y min) membranas reticuladas sob diferentes condições de concentração de glutaraldeído e tempo de reação; (Colunas) representam proteína total e (Pontos) somente BSA.

Podem ser observados também que as etapas cromatográficas de eluição com concentrações de NaCl superiores a 1,2 M e a segunda lavagem não permitiram a detecção de GM-CSF, por *slot blot*, e a regeneração apresentou valores reduzidos, em todos os ensaios.

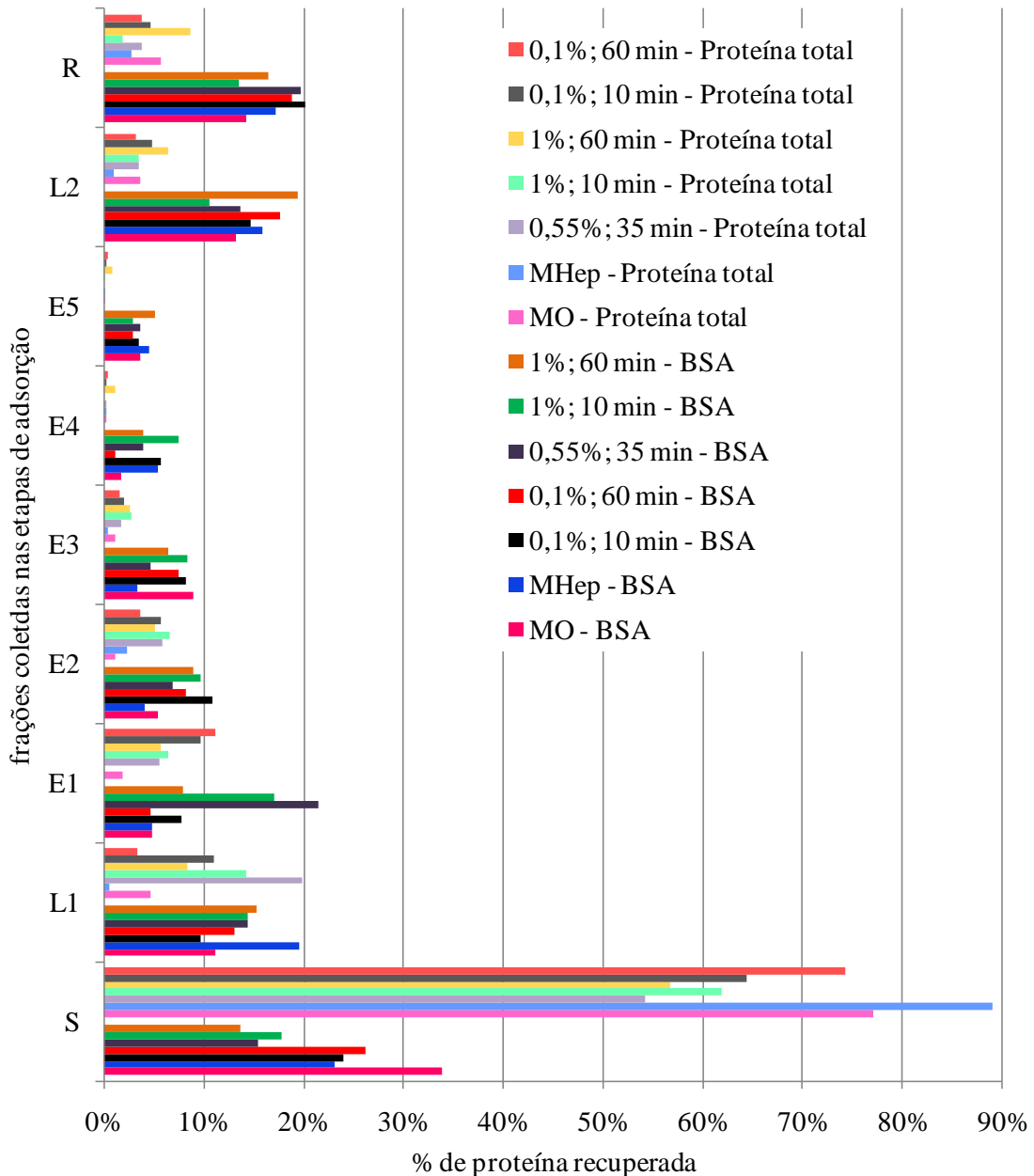


Figura 5.28 – Proteína recuperada nas etapas dos ensaios de adsorção em membrana PEI/PVP cortada em pedaços. Onde: (S) solução remanescente da etapa de adsorção (sobrenadante); (L₁) e (L₂) lavagem com tampão acetato; (E₁ a E₅) eluição com concentrações salinas de 0,3, 0,6, 0,9, 1,2 e 1,5 M; (R) regeneração; (MO) membrana original; (MHep) membrana com heparina imobilizada sem reticulação, (X%; Y min) membranas reticuladas sob diferentes condições de concentração de glutaraldeído e tempo de reação.

A comparação entre os percentuais de recuperação em termos de proteína total e de BSA em uma dada membrana, apresentados na Figura 5.28, revela que a presença de outras proteínas, que não só BSA, reduz a quantidade de proteína total adsorvida (visto que a concentração de proteína remanescente na solução usada para adsorção tende a ser maior percentualmente quando observa-se os ensaios de proteína total) e desorvida nas etapas de eluição. Esse é um indicativo de que as membranas na presença de GM-CSF o adsorvem seletivamente.

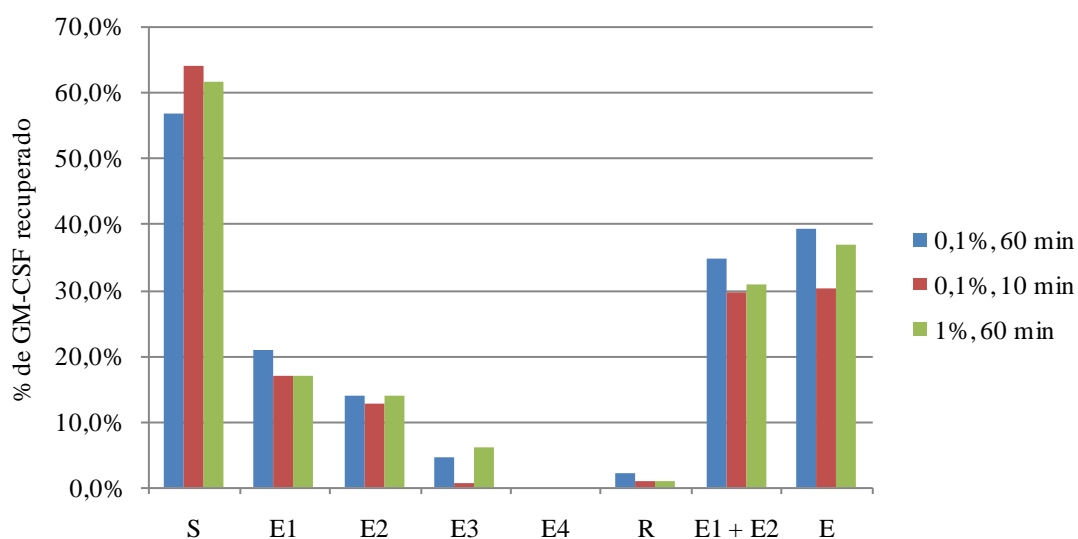


Figura 5.29 – GM-CSF recuperado nas etapas de eluição e regeneração dos ensaios de adsorção em membrana PEI/PVP cortada em pedaços. Onde: (S) corresponde à solução remanescente da etapa de adsorção (sobrenadante); (E₁ a E₄) eluição com concentrações salinas de 0,3, 0,6, 0,9 e 1,2 M; (E1+E2) corresponde ao somatório das eluições 1 e 2; (E) corresponde ao somatório das eluições E1 a E4; (R) regeneração; (X%; Y min) correspondem às membranas reticuladas sob diferentes condições de concentração de glutaraldeído e tempo de reação.

As quantidades de GM-CSF recuperadas nas etapas de eluição utilizando as membranas reticuladas por 60 min com 0,1% e 1% de glutaraldeído foram semelhantes, mas um pouco maior com 0,1% (Figura 5.29, E). A membrana com concentração e tempo intermediários (0,55% de glutaraldeído, 0,35 min), apresentou uma desorção elevada de GM-CSF em uma só etapa de eluição (E2) (acompanhada de desorção de BSA na mesma etapa), mas ainda inferior ao somatório das etapas de eluição E1 e E2 das membranas reticuladas por 60 min. Esta diferença pode ser resultado de uma seletividade entre isoformas do GM-CSF, visto que sua MM é definida entre 18 e 32

kDa, ou ainda de uma maior interação das moléculas com o suporte, necessitando de maior força iônica para dessorvê-las da matriz.

A massa de GM-CSF recuperada nas etapas de eluição do ensaio de adsorção na membrana cujas condições de reticulação remontam a 0,1% de glutaraldeído e 10 min de reação correspondeu a 6,75 µg, valor inferior ao das membranas com 60 min de reação, reticuladas por 0,1% (8,77 µg de GM-CSF) ou 1% de glutaraldeído (8,22 µg de GM-CSF). Também se observou uma maior concentração de BSA dessorvido neste ensaio, que aliado ao resultado da membrana cuja reticulação igualmente foi realizada por 10 min, mas com 1% de glutaraldeído, permitem concluir que o intervalo de 10 min não é apropriado para a reticulação da membrana de interesse, por ampliarem as interações não específicas do suporte obtido.

Como os resultados observados foram bastante semelhantes nos experimentos com tempo de reação de uma hora, tanto nas concentrações de 0,1% quanto 1%, adotou-se a menor concentração para a reticulação da heparina imobilizada em pei, de modo que a etapa de reticulação do processo de imobilização de heparina no módulo de permeação foi realizada empregando tal condição.

5.4. Determinação das Curvas de Saturação

A fim de determinar as curvas de ruptura para a cromatografia em membranas de heparina imobilizada e reticulada, visando à purificação de GM-CSF a partir de sobrenadante de cultivo de células CHO-GM-CSF, foram realizados experimentos de filtração em modo tangencial, utilizando um módulo de permeação obtido no presente trabalho, tal como descrito no item 4.2.3.

A razão entre a vazão de permeado e a vazão de alimentação (Q_P/Q_A) foi mantida constante em 0,5 através de uma bomba peristáltica instalada na linha do filtrado, enquanto a linha do retido permaneceu aberta (Tabela 5.11).

Tabela 5.11 – Condições operacionais dos ensaios para a determinação das curvas de saturação

Cromatografia	Vazão alimentação (Q_A) [mL/min]	Vazão permeado (Q_P) [mL/min]	Tempo de residência (s)
CR 3,4 mL/min	3,4	1,7	21,42
CR 2,2 mL/min	2,2	1,1	33,10
CR 1,0 mL/min	1,0	0,5	72,82

Onde: vazão de permeado corresponde a 50% da vazão de alimentação.

A fim de determinar o ponto onde iniciou a saída de GM-CSF do módulo, ou seja, o ponto em que houve a perda da proteína, foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas de cada ensaio.

As Figuras 5.30, 5.31 e 5.32 apresentam as curvas de ruptura e as eletroforeses obtidas em cada ensaio. A curva de ruptura para a linha de retido atinge o patamar de saturação quase que imediatamente após o início da alimentação, enquanto que a curva obtida para a linha de permeado sobe mais lentamente, alcançando o patamar de saturação após algum tempo, o qual varia em função da vazão de alimentação empregada.

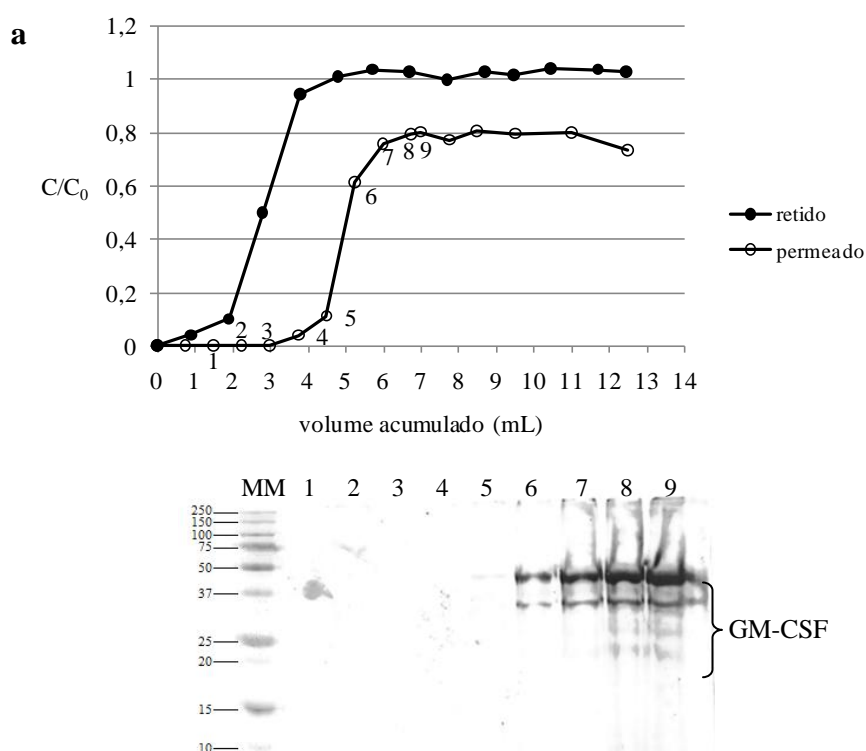


Figura 5.30 – Ensaio de adsorção de GM-CSF comercial em módulo de permeação contendo heparina imobilizada, $Q_P = 1,0$ mL/min, concentração em termos de proteína total. (a) Curva de ruptura obtida para as linhas de permeado e retido. (b) Eletroforese das frações de permeado recolhidas, onde: (MM) marcadores de massa molecular e (1-9) pontos da curva de ruptura.

O GM-CSF é uma proteína que tem entre 18 e 32 kDa quando glicosilada e corresponde a uma MM de 14 kDa quando não glicosilada (FORNO *et al.*, 2004). Segundo a Figura 5.30 o GM-CSF começa a sair do módulo de filtração a partir do ponto 6 da curva, ou seja, após a passagem de 5,25 mL de sobrenadante (faixa 6 da eletroforese), correspondendo a 5,25 minutos de alimentação e sua presença nas frações

de saída aumenta a cada ponto (faixas 7 a 9 da eletroforese) analisado. Assim, o ponto de ruptura para o GM-CSF, a uma vazão de permeado de 1,0 mL/min, ocorre após a passagem de 5,25 mL do sobrenadante de cultivo de células CHO-GM-CSF pelo módulo de filtração contendo heparina imobilizada.

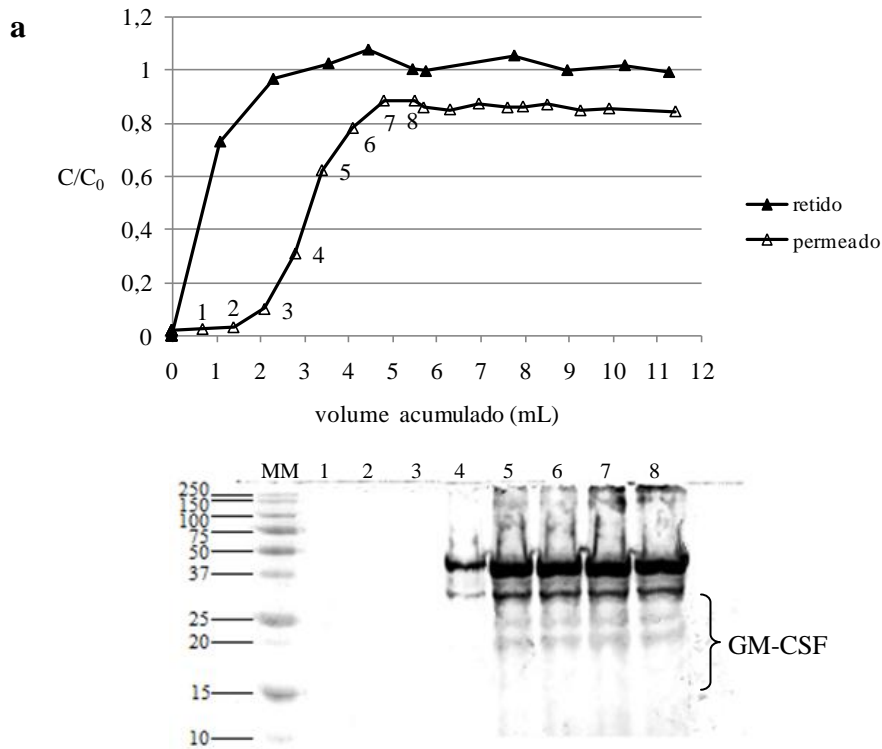


Figura 5.31 – Ensaio de adsorção de GM-CSF comercial em módulo de permeação contendo heparina imobilizada, $Q_P = 2,2$ mL/min, concentração em termos de proteína total. (a) Curva de ruptura obtida para as linhas de permeado e retido. (b) Eletroforese das frações de permeado recolhidas, onde: (MM) marcadores de massa molecular e (1-8) pontos da curva de ruptura.

No ensaio utilizando uma vazão de permeado (Q_P) igual a 2,2 mL/min (Figura 5.31) o GM-CSF sai da coluna após a passagem de 2,8 mL de sobrenadante de cultivo celular (faixa 4), caracterizando o ponto de ruptura para o GM-CSF em 1,3 minutos de alimentação.

Nos resultados obtidos com o experimento com Q_P igual a 3,4 mL/min, pode-se observar, segundo a faixa 3 da eletroforese (Figura 5.32 B), que o ponto de ruptura do GM-CSF ocorre após decorridos 0,7 minutos de alimentação, cujo volume permeado equivale a 2,4 mL de sobrenadante de cultivo celular.

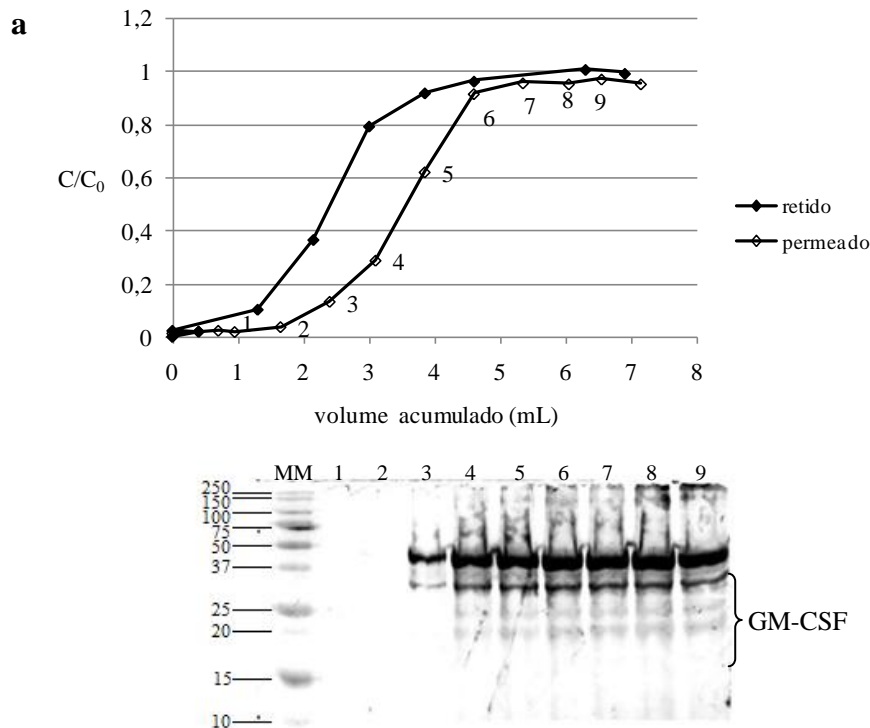


Figura 5.32 – Ensaio de adsorção de GM-CSF comercial em módulo de permeação contendo heparina imobilizada, $Q_P = 3,4$ mL/min, concentração em termos de proteína total. (a) Curva de ruptura obtida para as linhas de permeado e retido. (b) Eletroforese das frações de permeado recolhidas, onde: (MM) marcadores de massa molecular e (1-9) pontos da curva de ruptura.

As três curvas de ruptura para proteína total obtidas podem ser observadas na Figura 5.33, onde se observa que não se diferenciam muito com a variação da vazão de filtrado. Porém a análise das eletroforeses demonstra que o ponto de ruptura para o GM-CSF variou em cada experimento.

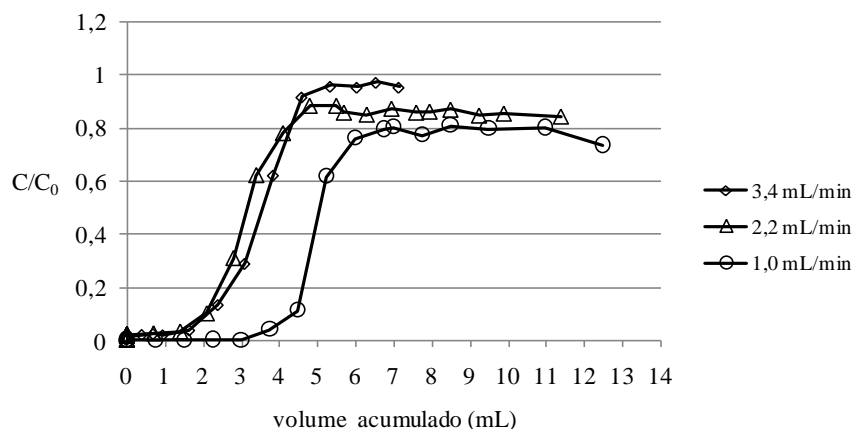


Figura 5.33 – Curvas de ruptura em termos de proteína total obtidas para as linhas de permeado, nas diferentes vazões estudadas.

Tendo em vista os pontos de ruptura para o GM-CSF, observado nas diferentes vazões, pode-se concluir que a utilização de uma menor vazão permite uma maior capacidade dinâmica do sistema de filtração/adsorção avaliado, evitando a ruptura precoce da proteína de interesse.

Após os ensaios de obtenção das curvas de ruptura, o processo de dessorção das proteínas adsorvidas foi realizado, tal como um ensaio cromatográfico. O perfil cromatográfico típico, dentre os três realizados, acompanhado do ensaio de *slot blot*, correspondente às frações eluídas, estão apresentados na Figura 5.34.

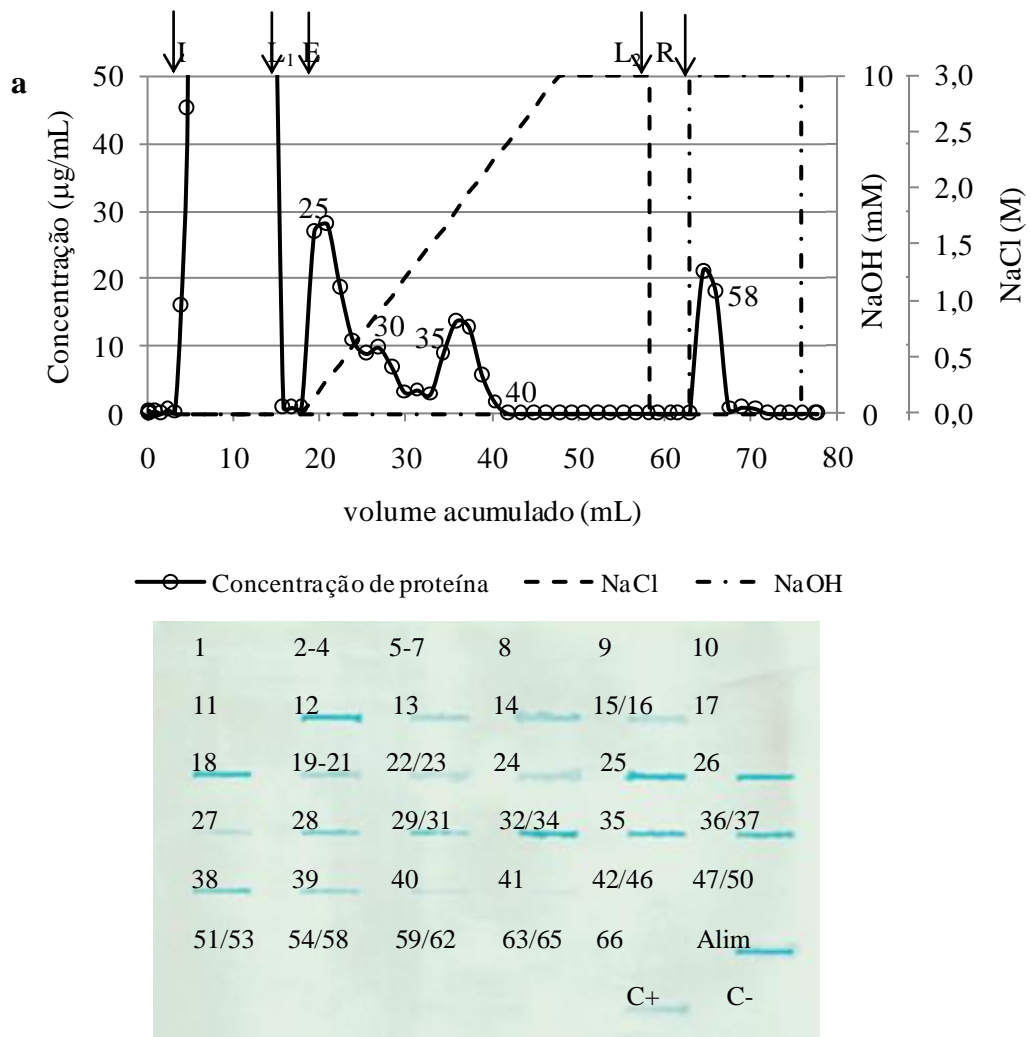


Figura 5.34 – Perfil cromatográfico típico dos ensaios realizados após a obtenção das curvas de ruptura de GM-CSF, empregando heparina como ligante imobilizado na membrana de PEI/PVP obtida no presente trabalho, com injeção de GM-CSF (comercial + sobrenadante). Tampão acetato pH 5,0 (20 mM), com eluição em gradiente salino (0 a 3 M de NaCl) e concentração dada em termos de proteínas totais. (a) Perfil de um ensaio cromatográfico onde (I) injeção, (L₁ e L₂) lavagem (tampão acetato pH 5, 20 mM), (E) eluição com gradiente salino e (R) regeneração (NaOH 0,01M). (b) *Dot blot* de todas as frações do ensaio cromatográfico apresentado em (A). Onde (C-) é o controle negativo (BSA), (C+) é o controle positivo (GM-CSFrh comercial).

Observa-se um perfil bastante semelhante àquele observado na Figura 5.19 A, com dois picos de eluição, o primeiro pouco antes de 1 M de NaCl e ou segundo em aproximadamente 1,5 M. Embora tenha sido observado um pico na regeneração em termos de proteína total, que corresponde às frações 57 e 58, no imunoenensaio não houve detecção de GM-CSF nestas frações.

5.5. Ensaios de separação de células CHO

Foi realizado um ensaio de filtração em batelada, no qual foi recirculado por 4 horas o meio de cultivo contendo células em suspensão, com uma alimentação de 3,4 mL/min, variando-se a cada 30 minutos o fluxo permeado através do módulo de permeação, tal como descrito no item 4.2.5 da Metodologia. As células foram mantidas em um frasco agitado do tipo *spinner* a 40 rpm. Os dados observados para viabilidade celular e fluxo permeado correlacionado com ΔP_{TM} e viabilidade celular podem ser observados nas Figuras 5.35 e 5.36, respectivamente.

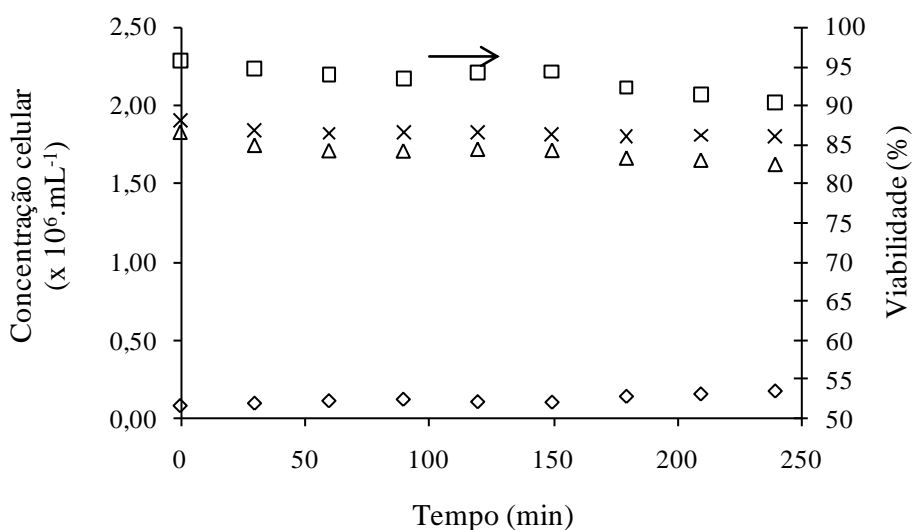


Figura 5.35 – Acompanhamento da viabilidade celular ao longo do experimento de filtração em batelada de meio de cultivo contendo células em suspensão. Onde: (Δ) células vivas, (\times) células totais, (\diamond) células mortas e (\square) viabilidade.

A viabilidade das células recirculadas foi mantida acima de 90% de viabilidade reduzindo durante o ensaio de aproximadamente 96% para 90,5%. Esta redução pode ser resultante não só da recirculação no equipamento, mas também pela desagregação de grumos pelo escoamento tangencial, tal como observado por CASTILHO (2001),

expondo células mortas ao meio de cultivo. No entanto, como o ensaio foi executado em poucas horas, não foi possível confirmar tal informação.

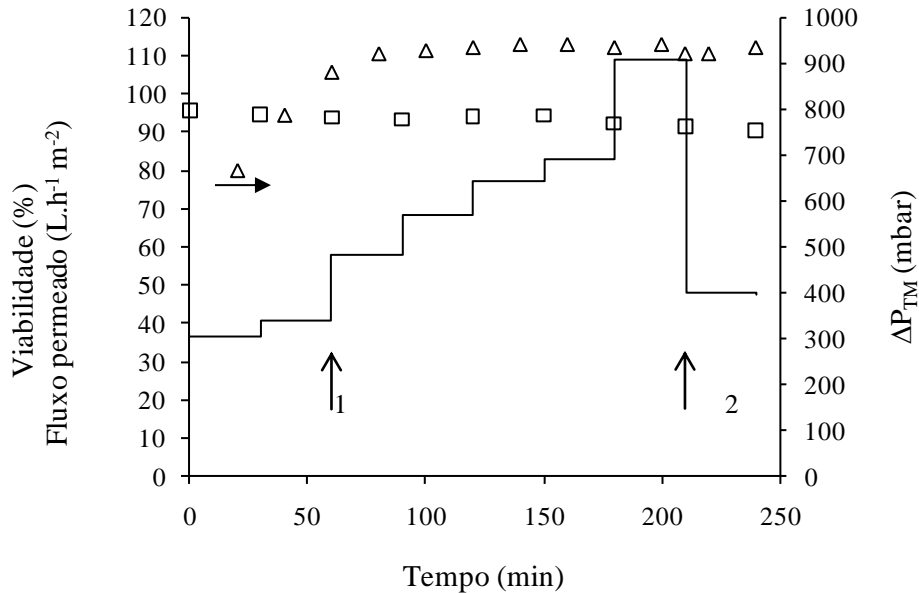


Figura 5.36 – Ensaio de filtração em batelada de meio de cultivo contendo células em suspensão. Alimentação interna das membranas com vazão de 3,4 mL/min, frequência de 0,013 min⁻¹, tempo de residência de 0,197 min, temperatura ambiente de 19±1°C, meio de cultivo mantido a 37°C, sob agitação de 40 rpm e atmosfera de CO₂. Onde: (Δ)ΔP_{TM}, (□) fluxo permeado, (□) viabilidade, (1) fluxo permeado corresponde a 40% do fluxo alimentado, (2) tentativa em restabelecer o fluxo permeado correspondente a 40% do fluxo alimentado.

Há um aumento no fluxo de permeado em patamares com menor amplitude ao longo do tempo (com exceção do fluxo observado entre 180 e 210 min), mesmo que a ΔP_{TM} seja mantida aproximadamente constante. O maior fluxo observado, referente ao intervalo de tempo 180-210 min exprime esta observação de forma mais categórica: há um aumento do fluxo permeado a uma mesma ΔP_{TM} observada. Segundo a Lei de Darcy, para escoamento em meios porosos, para ampliar o fluxo permeado, desde que mantidas constantes a ΔP_{TM}, a viscosidade cinemática e a vazão, seria necessário variar a área e a espessura do leito de permeação, de modo que os resultados obtidos sugerem uma deformação física da membrana, em relação à membrana original.

Foi verificada uma expansão do leito de permeação durante o experimento, disponível para comparação com a membrana original na Figura 5.37, fato não observado durante os ensaios cromatográficos, nem durante a determinação da permeabilidade hidráulica. Esta expansão pode ser resultado de uma baixa resistência

mecânica (espessura de parede fina em relação ao diâmetro) ocasionando estiramento do polímero com abertura dos poros, aumento do diâmetro interno e redução da espessura da parede, refletindo em ampliação do fluxo, ainda que a ΔP_{TM} seja a mesma.

Depois de 210 min de recirculação do meio de cultivo, houve uma tentativa em restabelecer o fluxo de permeado correspondente a 40% do fluxo alimentado (Ponto 1, na Figura 5.37). No entanto, o fluxo de permeado apresentou uma redução de aproximadamente 68,3 para cerca de 47,8 $L.h^{-1}.m^{-2}$, ainda que a ΔP_{TM} esteja um pouco maior do que aquela empregada quando se expôs a membrana a 40% do fluxo de alimentação (1).

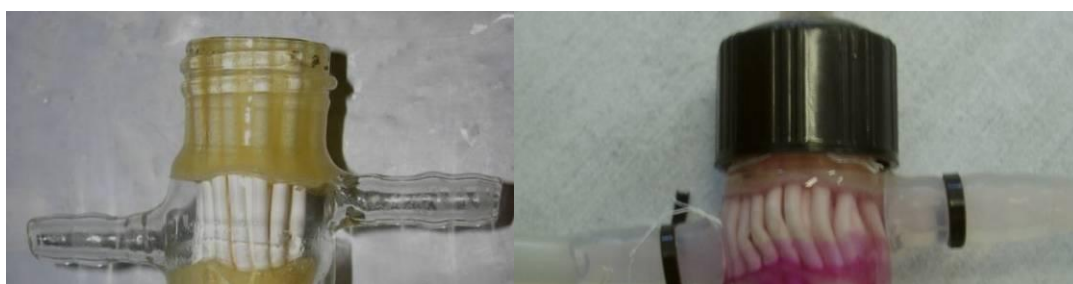


Figura 5.37 – Módulo de permeação original e após o ensaio de filtração de meio de cultivo contendo células animais em suspensão, apresentando deformação das fibras.

Desta redução no fluxo permeado observada entre os pontos 1 e 2 da Figura 5.36, que corresponde a aproximadamente 30%, pode-se concluir que a membrana está sendo bloqueada durante o experimento, por que o escoamento tangencial não foi suficiente para arrastar os sólidos depositados ou ainda devido à incrustação das membranas.

Depois de realizada a etapa de imobilização de heparina com reticulação por glutaraldeído no módulo de permeação e o ensaio de filtração de meio de cultivo contendo células animais, foram executados ensaios de determinação da permeabilidade hidráulica. A Figura 5.38 foi obtida a partir da representação do fluxo permeado ($L.h^{-1}.m^{-2}$) em função da diferença de pressão (bar) utilizada. A permeabilidade hidráulica da membrana, expressa em $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$, é descrita pelo coeficiente angular da curva linearizada.

Na Figura 5.38 pode ser observada uma redução seqüencial na permeabilidade hidráulica do módulo de permeação, desde o ensaio em que continha somente a

membrana original até o ensaio final, onde a membrana contendo heparina imobilizada e reticulada foi empregada para a filtração de meio de cultivo contendo células animais.

Esta redução do fluxo permeado corresponde a uma redução progressiva do tamanho de poro, ocasionada inicialmente pelo processo de imobilização, através das etapas de recobrimento da membrana de PEI/PVP com pei para a imobilização do ligante heparina, propriamente dito, e da etapa de reticulação com glutaraldeído, seguindo-se então uma redução do fluxo permeado pelo bloqueio do meio filtrante na etapa de filtração de células em suspensão. Experimentalmente foi verificada uma redução de 29,8% da permeabilidade hidráulica inicial com a etapa de imobilização da heparina. A etapa de filtração de meio de cultivo contendo células em suspensão reduziu ainda mais a permeabilidade da membrana, apesar de ter sido realizada uma retrolavagem do sistema após o experimento (lavagem do ensaio cromatográfico). Esta redução correspondeu a 50,5% da permeabilidade hidráulica determinada após a etapa de imobilização da heparina, e a 65,3% da permeabilidade hidráulica da membrana original. E concorda com a redução do fluxo observada na Figura 5.36.

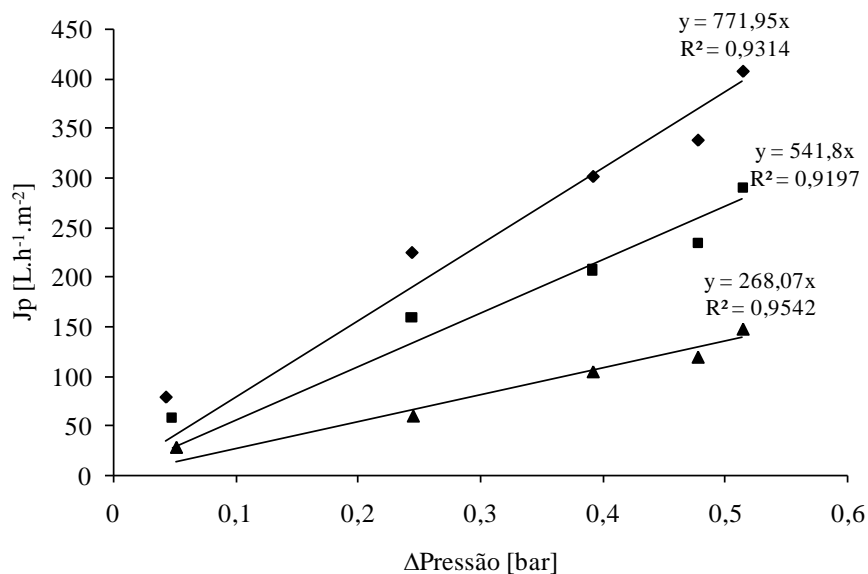


Figura 5.38 – Permeabilidade hidráulica do módulo contendo membrana de PEI/PVP, determinada com a membrana original (◆) e após os ensaios de imobilização do ligante heparina (■) e de filtração de meio de cultivo com células CHO-GM-CSF em suspensão (▲).

Para realizar a simulação em CFD do módulo obtido experimentalmente, determinou-se o coeficiente de permeabilidade (k), a partir do coeficiente angular das equações das retas obtidas na Figura 5.38, apresentados na Tabela 5.12.

Como é de interesse verificar a tensão de cisalhamento e a queda de pressão através da membrana, tal como realizado inicialmente para o planejamento de simulações em CFD, no processo simultâneo de separação de células e de purificação de GM-CSF, adotou-se o coeficiente de permeabilidade da membrana de PEI/PVP com heparina imobilizada para as simulações.

Tabela 5.12 – Coeficiente de permeabilidade do módulo de permeação, obtidos a partir da equações das retas da Figura 5.38.

Membrana	Coeficiente de permeabilidade
k_{MO}	$5,35 \times 10^{-16} \text{ m}^2$
k_{MHep}	$3,73 \times 10^{-16} \text{ m}^2$

5.6. Ensaio cromatográfico para adsorção de GM-CSF no módulo de permeação contendo heparina imobilizada

O ensaio de filtração em batelada serviu também como etapa de alimentação do meio de cultivo contendo GM-CSF, tal como descrito no item 4.2.5 (Metodologia), caracterizando assim uma operação simultânea de retenção celular e purificação de GM-CSF, através da adsorção no módulo de permeação contendo heparina imobilizada. A Figura 5.39 apresenta o perfil do ensaio cromatográfico, em termos de concentração protéica, das frações recolhidas ao longo do experimento.

Pode ser observado que foi mantido o perfil contendo dois picos na eluição salina, embora o segundo pico obtido no ensaio da Figura 5.39 seja bastante amplo em relação aquele observado nas Figuras 5.19 a e 5.34 a. É possível observar ainda, a partir da eletroforese SDS-PAGE (Figura 5.39 b), que houve um enriquecimento das bandas entre 30 e 40 kDa, em relação à alimentação, sugerindo aumento de GM-CSF em relação às outras proteínas.

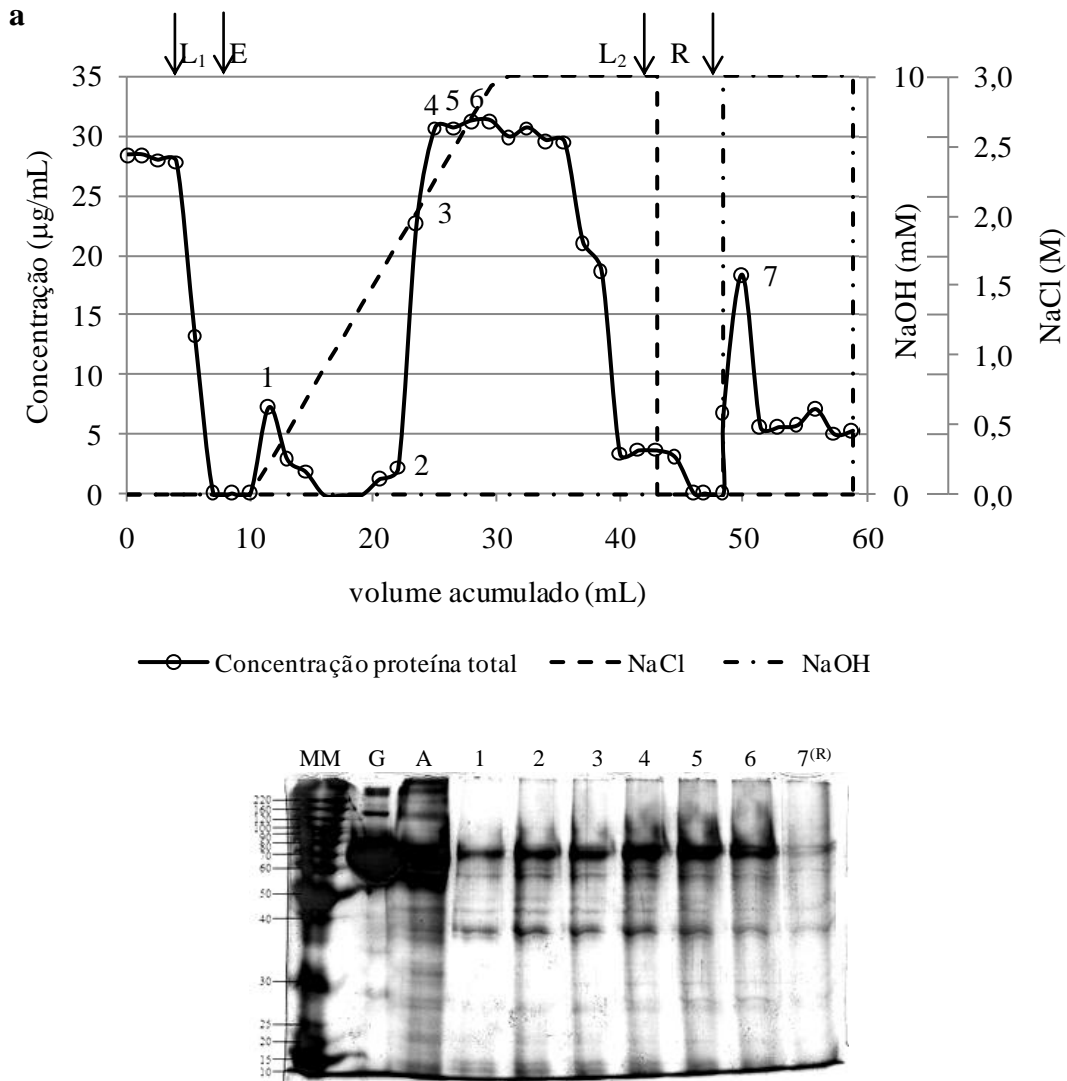


Figura 5.39 – Ensaio cromatográfico de adsorção de GM-CSF no módulo de permeação contendo heparina imobilizada, com alimentação concomitante com o ensaio de filtração em batelada de sobrenadante com células animais. Tampão acetato pH 5,0 (20 mM), com eluição em gradiente salino (0 a 3 M de NaCl) e concentração dada em termos de proteínas totais. (a) Perfil cromatográfico, onde: (L1 e L2) lavagem com solução tampão de equilíbrio, (E) variação da concentração salina de 0 a 3 M de NaCl em solução tampão de equilíbrio e (R) regeneração com NaOH 10 mM. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações 1 a 7, identificadas em (a), onde (MM) marcador de massa molecular, (G) GM-CSF comercial, (A) alimentação, (1 a 6) frações obtidas na eluição e (7(R)) fração da regeneração.

6. *Conclusões e Perspectivas futuras*

Através do emprego de CFD, foi possível simular módulos de membranas de fibras ocas de diferentes configurações. Observou-se que, para todos os diferentes módulos simulados, a tensão de cisalhamento máxima atingida no interior das fibras situou-se na faixa de 9,5 a 40 Pa, o que, segundo a literatura, não causa danos às células animais. Pode-se inferir, portanto, que, do ponto de vista do possível *stress* hidrodinâmico imposto às células, os módulos desenvolvidos são adequados à separação de células animais.

Segundo as simulações realizadas, as quedas de pressão através da membrana, entre a entrada e a saída do módulo, apresentaram-se na faixa de 500 a 6700 Pa. Com base em uma análise estatística dos resultados, foi possível determinar-se uma geometria que minimiza a variação desta queda de pressão através da membrana. O módulo mais adequado ao processo estudado tem fibras com comprimento de 1 cm e diâmetro interno de 950 μm . A análise estatística mostrou, também, que o número de fibras não apresentou significância estatística. Desta forma, decidiu-se utilizar o número máximo de fibras possível, ou seja, 130. Este módulo foi então construído, a partir das membranas de PEI/PVP obtidas no presente trabalho, e empregado na retenção celular associada à purificação do GM-CSF. Experimentalmente foi observada uma diferença de pressão através da membrana de 67 kPa. Este resultado, empregado para a validação experimental das simulações, apresentou-se muito próximo do valor observado nas simulações por CFD, onde os valores observados de diferença de pressão através da membrana foi de 71 kPa.

Os resultados experimentais dos ensaios cromatográficos mostraram que a heparina foi mais efetiva que o azul de cibacron na purificação de GM-CSF. Sendo assim, foi desenvolvida uma técnica para a imobilização de heparina no presente trabalho, que consiste na reticulação da heparina após a adsorção em poli(etileno imina), a qual mostrou-se altamente eficiente.

O equipamento de retenção celular obtido foi utilizado em processo de filtração em batelada de meio de cultivo celular contendo células em suspensão com simultânea purificação de GM-CSF, obtendo-se fatores de recuperação maiores que 3 para o GM-CSF, tendo em vista o enriquecimento do GM-CSF nas frações eluídas, mas foi

observada deformação das membranas e uma queda no fluxo permeado, indicando entupimento da mesma.

Como proposta para trabalhos futuros sugere-se a otimização do processo de obtenção da membrana; o emprego do sistema obtido por longos períodos de tempo acoplado a um biorreator; verificação da estabilidade do módulo contendo heparina imobilizada, não somente quanto à preservação das características para a cromatografia, mas também quanto à manutenção do fluxo; realização de isothermas de adsorção e otimização do processo cromatográfico visando ampliar a concentração das frações eluídas.

Referências Bibliográficas

- ALBRECHT, W.; SCHAUER, J.; WEIGEL, TH.; LENDLEIN, A. Preparation of novel composite membranes: reactive coating on microporous poly(ether imide) support membranes. *Journal Membrane Science*, v. 269, pp. 49-59, 2006.
- AL-RUBEAI, M., SINGH, R.P., EMERY, A.N. Cell cycle and cell size dependence of susceptibility to hydrodynamic forces. *Biotechnology and Bioengineering.*, v. 46, p. 88-92, 1995.
- ALTAMIRANO, C.; PAREDES, C.; CAIRÓ, J.J.; GÒDIA, F. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology Progress*, v. 16, pp. 69-75, 2000.
- ANDERSEN, D.C.; KRUMMEN, L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, pp. 117-123, 2002.
- ARICA, M.Y.; DENIZLI, A.; SALIH, B.; PISKIN, E.; HASIRCI, V. Catalase adsorption onto cibacron blue F3GA and Fe(III)- derivatized poly(hydroxyethyl methacrylate) membranes and application to a continuous system. *Journal of Membrane Science*, 129, 65-76, 1997.
- AUGUSTO, E.F.P.; OLIVEIRA, M.S. In: *Processo com células animais. Biotecnologia Industrial – volume 3, Capítulo 24*, pp. 547-582. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001, 593 p.
- BATT, B.C.; DAVIS, R.H.; KOMPALA D.S. Inclined sedimentation for selective retention of viable hybridomas in a continuous suspension bioreactor. *Biotechnology Progress*, v. 6, pp. 458-464, 1990.
- BAYRAMOGLU, G.; YALÇIN, E.; ARICA, M.Y. Characterization of polyethylenimine grafted and cibacron blue F3G4 immobilized poly(hydroxyethylmethacrylate-co-glycidylmethacrylate) membranes ad application to bilirubin removal from human serum. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 264, 195-202, 2005.
- BEEKSOW, T.; KRONER, K.H.; ANSPACH, F.B. Nylon-based affinity membranes: impacts of surface modification on protein adsorption. *Journal of Colloid and*

- Interface Science*, 196, 278-291, 1997.
- BIRCH, J.R.; ARATHOON, R. Suspension culture of mammalian cells. *Bioprocess Technology*, v. 10, pp. 251-270, 1990.
- BORN, C.; ZHANG, Z.; AL-RUBEAI, M.; THOMAS, C.R. Estimation of disruption of animal cells by laminar shear stress. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 40, pp. 1004-1010, 1992.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, pp. 248-254, 1976.
- BRANDT, S.; GOFFE, R.A.; KESSLER, S.B.; O'CONNOR, J.L.; ZALE, S.E. Membrane-based affinity technology for commercial scale separations. *Bio/Technology*, v. 6, pp. 779-782, 1988.
- BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 68, pp. 283-291, 2005.
- CASTILHO, L.R. *Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells*. Ph.D. dissertation, Série Fortschritt-Berichte - Reihe 1,7 VDI, Düsseldorf: VDI Verlag, Alemanha, 2001.
- CASTILHO, L.R.; ANSPACH, F.B. CFD-aided design of a dynamic filter for mammalian cell separation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 83, pp. 514-519, 2003.
- CASTILHO, L.R.; ANSPACH, F.B.; DECKWER, W.-D. An integrated process for mammalian cell perfusion cultivation and product purification using a dynamic filter. *Biotechnology Progress*, v. 18, pp. 776-781, 2002a.
- CASTILHO, L.R.; ANSPACH, F.B.; DECKWER, W.-D. Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins. *Journal of Membrane Science*, v. 207, pp. 253-259, 2002b.
- CASTILHO, L.R.; MEDRONHO, R.A. Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 74,

pp. 129-169, 2002.

CHARCOSSET, C.; SU, Z.; KAROOR, S.; DAUN, G.; COLTON, C. K. Protein A immunoaffinity hollow fiber membranes for immunoglobulin G purification: experimental characterization. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 48, pp. 415-427, 1995.

CHEN, H.; CHEN, Y.; SHEARDOWN, H.; BROOK, M.A. Immobilization of heparin on a silicone surface through a heterobifunctional PEG spacer. *Biomaterials*, v. 26, pp. 7418–7424, 2005.

CHU, L.; ROBINSON, D.K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, pp. 180-187, 2001.

CLARK-LEWIS, I.; SCHRADER, J.W. Biochemical characterization of regulatory factors derived from T cell hybridomas and spleen cells. II. Evidence for glycosylation of T cell growth factor, T cell replacing factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Immunology*, v. 128, pp. 168-174, 1982.

CUNHA, M.T.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. *Extraction for Rapid Protein Isolation*, In: Hatti-Kaul R, Mattiasson B (Eds.), *Isolation and Purification of Proteins*, Marcel Dekker, Nova York, p. 321-372, 2003.

DOBLHOFF-DIER, O.; GAIDA, T.; KATINGER, H. A novel ultrasonic resonance field device for the retention of animal-cells. *Biotechnology Progress*, v. 10, pp. 428–432, 1994.

DORR, R.T. Clinical properties of yeast-derived versus *Escherichia coli* - derived granulocyte macrophage colonystimulating factor. *Clinical Therapeutics*, v. 15, pp. 19-29, 1993.

FOGOLÍN, M.B. EBERHARDT, M.O.; KRATJE, R.; ETCHEVERRIGARAY, M. Choice of the adequate quantification method for recombinant human GM-CSF produced in different host systems. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.5, pp. 243-250, 2002.

FONTES, C.E.; SILVA, L.F.L.R.; LAGE, P.L.C.; R.C. RODRIGUES. Escola Piloto em Engenharia Química: *Introdução à fluidodinâmica computacional*. PEQ/

- COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005.
- FORNO, G.; FOGOLÍN, M.B., OGGERO, M.; KRATJE, R.; ETCHEVERRIGARAY, M.; CONRADT, H.S.; NIMTZ, M. N- and O-linked carbohydrates and glycosylation site occupancy in recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secreted by a Chinese hamster ovary cell line. *European Journal Biochemistry*, v. 271, pp. 907–919, 2004.
- FARNDALE, R.W.; BUTTLE, D.J.; BARRETT, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 883, pp. 173-177, 1986.
- FRANÇA NETA, LUZIA SERGINA DE. *Clarificação de bebidas fermentadas utilizando o processo de microfiltração*. Rio de Janeiro: PEQ/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2005. 88 p. Tese (Mestrado).
- FRIEDRICHS, G.; HANLEY, T.R.; KLEIN, E.; BAURMEISTER, U. Design of an affinity adsorption membrane module for heparin removal. *In Proceedings of the 11th Annual Conference of the North American Membrane Society*, Boulder/USA, May, 2000.
- FUSSENEGGER, M., BAILEY, J.E. *Control of mammalian cell proliferation as an important strategy in cell culture technology. Cancer therapy and tissue engineering*. In: Al-Rubeai, M. (ed), AH Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1999.
- FUSSENEGGER, M., BAILEY, J.E., HAUSER, H.; MUELLER, P.P. Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells. *Trends in Biotechnology*, v. 17, pp. 35-42, 1999.
- GHOSH, R. Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. *Journal of Chromatography A*, v. 952, pp. 13-27, 2002.
- GRIFFITHS, J.B. Scaling up of animal cell cultures. In: Freshney, R.I. (ed): *Animal Cell Culture, a Practical Approach*, pp. 47-93, New York: Ed. Oxford University Press, 1992.
- HARRIS, E.L.V.; ANGAL, S. *Protein Purification Methods – A practical approach*. New York: Ed. Oxford University Press, 1995, 179 p.

- HASHIMOTO, M.; KAJI, H.; KEMPPINEN, M.E.; NISHIZAWA, M. Localized immobilization of proteins onto microstructures within a preassembled microfluidic device. *Sensors and Actuators B*, v. 128, pp. 545–551, 2008.
- HAUPT, K.; BUENO, S.M.A. *Affinity Membranes in Affinity separation – Encyclopaedia of Separation Science*, Ed. Academic Press, pp. 229-235, 2000.
- HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; SMITH, P.K. Immobilized affinity ligand techniques. London: Ed. Academic Press Limited, 454 p., 1992.
- HOUEBINE, L.M. Antibody manufacture in transgenic animal and comparison with others systems. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, pp. 625-629, 2002.
- HUSSEIN, A.M.; ROSS, M.; VREDENBURGH, J.; MEISENBERG, B.; HARS, V.; GILBERT, C.; PETROS, W.P.; CONIGLIO, D.; KURTZBERG, J.; RUBIN, P. and PETERS, W.P. Effects of granulocyte–macrophage colony stimulating factor produced in CHO (regramostim), Escherichia coli (molgramostim) and yeast (sargramostim) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy. *European Journal of Haematology*, v. 54, pp. 281-287, 1995.
- JÄGER, V. A novel perfusion system for the large-scale cultivation of animal cells based on a continuous flow centrifuge. In: SPIER, R.E.; GRIFFITHS, J.B.; MACDONALD, C. (eds.) *Animal cell technology: developments, processes and products*, pp. 397-402, Ed Butterworth-Heinemann: Oxford, 1992.
- JARVIS, D. L. Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized, recombinant glycoprotein production. *Virology*, v. 310, pp. 1–7, 2003.
- JOSHI, O.; LEE, H.J.; MCGUIRE, J.; FINNERAN, P.; BIRD, K.E. Protein concentration and adsorption time effects on fibrinogen adsorption at heparinized silica interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 50, pp. 26–35, 2006.
- KADOURI, A., SPIER, R.E. Some myths and messages concerning the batch and continuous culture of animal cells. *Cytotechnology*, v. 24, pp. 89-98, 1997.
- KAWAHARA, H.; MITSUDA, S.; KUMAZAWA, E.; TAKESHITA, Y. High-

- density culture of FM-3A cells using a bioreactor with an external tangential-flow filtration device. *Cytotechnology*, v. 14, pp. 61-66, 1994.
- KEUREN, J.F.W.; WIELDERS, S.J.H.; WILLEMS, G.M.; MORRA, M.; CAHALAN, L.; CAHALAN, P.; LINDHOUT, T. Thrombogenicity of polysaccharide-coated surfaces. *Biomaterials*, v. 24, pp. 1917–1924, 2003.
- KLEIN, E. Affinity membranes: a 10-year review. *Journal of Membrane Science*, v. 179, pp. 1-27, 2000.
- KRAUSE, S.; KRONER, K.-H.; DECKWER, W.-D. Comparison of affinity membranes and conventional affinity matrices with regard to protein purification. *Biotechnol. Techn.*, v. 5, pp. 199-204, 1991.
- KUCHLER, R.J. *Biochemical methods in cell culture and virology*. Ed Dowden, Hutchinson & Ross Inc.:Stroudsburg, 2000.
- KUNITAKE, R.; SUZUKI, A.; ICHIHASHI, H.; MATSUDA, S.; HIRAI, O.; MORIMOTO, K. Fully-automated roller bottle handling system for large scale culture of mammalian cells. *Journal of Biotechnology*, v. 52, pp. 289-294, 1997.
- LARRICK, J.W.; THOMAS, D.W. Producing proteins in transgenic plants and animals, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, pp. 411–418, 2001.
- LIANG, J.Z.; NESS, J.N. The melt die-swell behaviour during capillary extrusion of LDPE/PP blends. *Polymer Testing*, v. 17, pp. 179-198, 1998.
- LUBINIECKI, A.S. Historical reflections on cell culture engineering. *Cytotechnology*, v. 28, pp. 139-145, 1998.
- LÜBBERSTEDT, M.; MEDRONHO, R.A.; ANSPACH, F.B. Separation of mammalian cells using hydrocyclones. *Proceedings of the Biotechnology 2000*, Berlin, v. 1, pp. 460-462, 2000.
- MANSIR, A. T.; MONTESINOS, R. M.; GUZMÁN, R. Mathematical analysis of frontal affinity chromatography in particle and membrane configurations. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, pp. 1-28, 2001.
- MATANGUIHAN, C.; MICHAELS, J.; THRIFT, J.; JOERIS, K.; HEIDEMANN, R.; ZHANG, C.; REDDY, C.; WU, P.; KONSTANTINOV, K. Trends in monitoring, optimization and control of mammalian cell bioprocesses.

- Proceedings of the Biotechnology 2000*, Berlim, v. 1, pp. 482-484, 2000.
- MAYER, H.-J.; STIEHL, C.; ROEDER, E. Applying the finite-element method to determine the die swell phenomenon during the extrusion of glass rods with non-circular cross-sections. *Journal of Material Processing Technology*, v. 70, pp. 145-150, 1997.
- MEDRONHO, R.A.; SCHUETZE, J.; DECKWER, W.-D. Numerical simulation of hydrocyclones for cell separation. *Latin American Applied Research*, v. 35, pp.1-8, 2005.
- MERCILLE, S.; JOHNSON, M.; LANTHIER, S.; KAMEN, A.A.; MASSIE, B. Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 67, pp. 435-450, 2000.
- MONTOR, W.R.; SOGAYAR, M.C. Insetos como biofábricas de proteínas humana. *Ciência Hoje*, v. 33, pp. 16-23, 2003.
- MORAES, A.M.; CASTILHO, L.R.; BUENO, S.M. *Processos de Purificação dos Produtos*, In: Moraes, A.M., Augusto, E.F.P., Castilho, L.R. (eds.), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*. Ed. Roca:São Paulo, 2007.
- MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, v. 117, pp. 307-310, 1981.
- NACHMAN, M. Kinetic aspects of membrane-based immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography*, 597 (1992) 167-172.
- NGUYEN, Q.T.; PING, Z.; NGUYEN, T.; RIGAL, P. Simple method for immobilization of bio-macromolecules onto membranes of different types. *Journal Membrane Science*, v. 213, pp. 85-95, 2003.
- PINTO, R.C.V; MEDRONHO, R.A; CASTILHO, L.R. Emprego de Diferentes Técnicas para Avaliar os Efeitos de Hidrociclones sobre a Viabilidade de Células CHO. ANAIS *SINAFERM* 2005, Recife, 2005.
- PINTO, RODRIGO COELHO VENTURA. Separação de células CHO utilizando

- hidrociclones. Rio de Janeiro: Programa de Engenharia Química–COPPE–Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2007. 100 p. Tese (Doutorado).
- PUI, P.W.S.; TRAMPLER, F.; SONDERHOFF, S.A. GROESCHL, M.; KILBURN, D.G.; PIRET, J.M. Batch and semicontinuous aggregation and sedimentation of hybridoma cells by acoustic-resonance fields. *Biotechnol Progress*, v. 11, pp. 146–152, 1995.
- RAJU, T.S., BRIGGS, J.B., BERGE, S.M., JONES, A.J.S. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoproteins therapeutics. *Glycobiology*, v. 10, pp. 477-486, 2000.
- RIPPERGER, S.; ALTMANN, J. Crossflow microfiltration – state of the art. *Separation and Purification Technology*, v. 26, pp. 19-31, 2002.
- ROPER, D.K.; LIGHTFOOT, E.N. Separation of biomolecules using adsorptive membranes. *Journal of Chromatography A*, v. 702, pp. 3-26, 1995.
- SANFORD, K.K., EARLE, W.R., EVANS, V.J., WALTZ, H.K.; SHANNON, J.E. The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. *Journal of the National Cancer Institute*, v.11, pp. 773–795, 1951.
- SEARLES, J.A.; TODD, P.; KOMPALA, D.S. Viable cell recycle with an inclined settler in the perfusion culture of suspended recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress*, v. 10, pp. 198–206, 1994.
- SEBOLLELA, A.; CAGLIARI, T.C.; LIMAVERDE, G.S.C.S.; CHAPEAUROUGE, A.; SORGINE, M.H.F.; COELHO-SAMPAIO, T.; RAMOS, C.H.I.; FERREIRA, S.T. Heparin-binding sites in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, pp. 31949-31956, 2005.
- SERPA, GISELE. *Purificação de anticorpos monoclonais anti-TNP do isotipo IgG₁ utilizando cromatografia em membranas de afinidade com íons metálicos imobilizados*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. 2002. 105 p. Tese (Mestrado).
- SHIRE, S.J; NGUYEN, T. The emergence of monoclonal antibody therapy and the challenges for the biotechnology industry. *AAPS News Magazine*, December,

pp. 19-20, 2004.

SHIRGAONKAR, I.Z.; LANTHIER, S.; KAMEN, A. Acoustic cell filter: a proven cell retention technology for perfusion of animal cell cultures. *Biotechnology Advances*, v. 22, pp. 433-444, 2004.

STEPAN, D.D.; WERNER, J.; YEATER, R.P. Essential regression and experimental design (livro e software disponíveis em <http://www.geocities.com/SiliconValley/Network/1032/>), (1998).

TAN, Q.; JI, J.; BARBOSA, M.A.; FONSECA, C.; SHENA, J. Constructing thromboresistant surface on biomedical stainless steel via layer-by-layer deposition anticoagulant. *Biomaterials*, v. 24, pp. 4699–4705, 2003.

THÖMMES, J.; BADER, A.; HALFAR, M.; KARAU, A.; KULA, M. R. Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein A coated adsorbent in expanded beds. *Journal of Chromatography*. v. 752, pp. 111-122, 1996.

THÖMMES, J.; KULA, M.R. Membrane Chromatography - an integrative concept in the downstream processing of proteins. *Biotechnology Progress*, v. 11, pp. 357-367, 1995.

TOKASHIKI, M., ARAI, T., HAMAMOTO, K.; ISHIMARU, K. High density culture of hybridoma cells using a perfusion culture vessel with an external centrifuge. *Cytotechnology*, v. 3, pp. 239–244, 1990.

VALDÉS, R.; GÓMEZ, L.; PADILLA, S.; BRITO J.; REYES B.; ALVAREZ T.; MENDOZA O.; HERRERA O.; FERRO W.; PUJOL M.; LEAL V.; LINARES M.; HEVIA Y.; GARCIA C.; MILA L.; GARCIA O.; SANCHEZ R.; ACOSTA A.; GEADA D.; PAEZ R.; LUIS VEGA J.; BORROTO C. Large-scale purification of an antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic tobacco plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 308, pp. 94-100, 2003.

VAN REIS, R., ZYDNEY, A. Membrane separations in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, pp. 208-211, 2001.

VERSTEEG, H.K.; MALALASEKERA, W. *An introduction to computational fluid dynamics*. London: Ed. Longman Limited, 1995, 257 p.

- VOGEL, J.H.; ANSPACH, B.; KRONER, K.-H.; PIRET, J.M.; HAYNES, C.A.
Controlled shear affinity filtration (CSAF): a new technology for integration of cell separation and protein isolation from mammalian cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 78, pp. 806-814, 2002.
- VOISARD, D.; MEUWLY, F.; RUFFIEUX, P.-A.; BAER, G.; KADOURI, A.
Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 82, pp. 751-765, 2003.
- WALSH, G. Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 55, pp. 3-10, 2003.
- WANG, L.-Y.; GU, Y.-H.; ZHOU, Q.-Z.; MA, G.-H.; WAN, Y.-H.; SU, Z.-G.
Preparation and characterization of uniform-sized chitosan microspheres containing insulin by membrane emulsification and a two-step solidification process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 50, pp. 126–135, 2006.
- WOODSIDE, S.M.; BOWEN, B.D.; PIRET, J.M. Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors. *Cytotechnology*, v. 28, pp. 163-175, 1998.
- WURM, F.M. Production recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, v. 22, pp. 1393-1398, 2004.

ANEXOS

ANEXO I - Obtenção da geometria e das malhas

Neste Anexo é apresentado um complemento à metodologia empregada em CFD (item 4.1.2 da Metodologia) para obtenção do domínio que representa o módulo com membranas, para emprego nas simulações. São acrescentadas informações relativas ao *software*, à obtenção da geometria e das malhas, e das condições de contorno adotadas.

Como inicialmente descrito na Revisão Bibliográfica (e na Metodologia, Figura 4.1) para a execução das simulações em CFD o primeiro passo é a construção da geometria, a qual define o espaço, ou domínio, em que serão aplicadas as equações de continuidade.

Sendo assim, inicialmente foi desenhado um plano, o qual pode ser visualizado na Figura I.1, com as membranas representadas por círculos concêntricos e a fatia da geometria (1/10 da geometria integral). A Figura I.1 refere-se à estrutura gerada para representar o módulo final, obtido experimentalmente. A fatia foi projetada com 18° (ângulo A9), para a esquerda e para a direita no plano XY, formando 36° ao todo, de modo que seu centro está localizado em $X = 0$.

Para posterior extrusão da geometria foi necessário cortar as curvas em semi-círculos, o que pode ser observado nos pontos sobre os círculos concêntricos da Figura I.1, que configuram as extremidades dos segmentos.

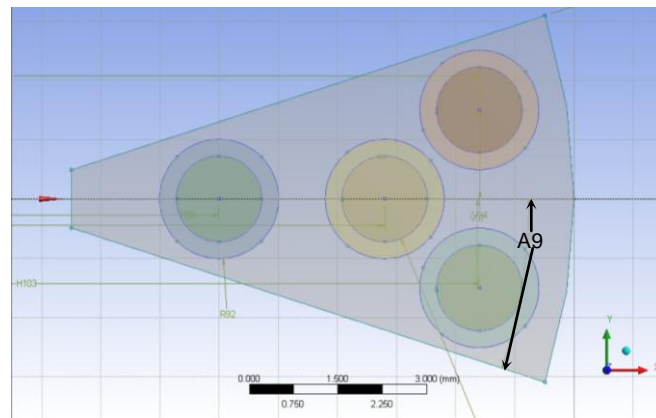


Figura I.1 – Plano base para a formação da estrutura que compreende o módulo desenvolvido experimentalmente, onde as membranas representadas por círculos concêntricos e a fatia que representa 1/10 da geometria.

A partir do plano base da Figura I.1 foi feita uma extrusão (*extruded*) de 10 mm (tamanho do casco simulado), gerando assim um sólido que representa o casco, no espaço formado entre a circunferência externa das membranas e o perímetro do casco superfície demarcada em verde na Figura I.2, com vazios no local das membranas (com formato cilíndrico após a extrusão no eixo z).

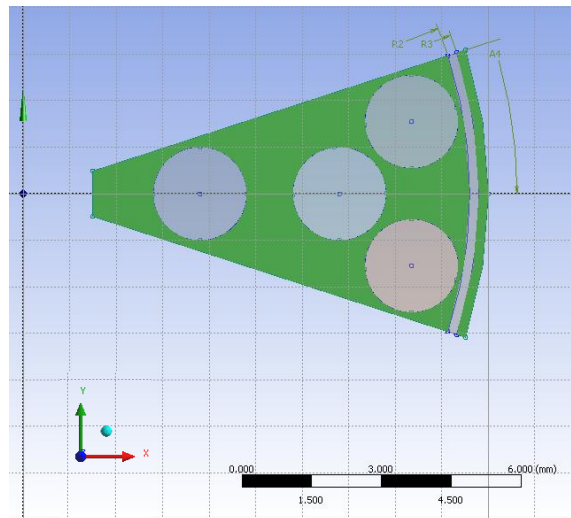


Figura I.2 – Operação de extrusão do casco (*software* ANSYS Workbench) com adição de material (*add material*) com extensão de 10 mm.

As membranas também foram geradas a partir de uma extrusão no plano base da Figura I.1, com 10 mm de extensão (tamanho do casco simulado), obtendo-se assim sólidos cilíndricos, no espaço interno às circunferências externas, tal como pode ser observado em verde na Figura I.3. Para que os sólidos não fossem todos agrupados pelo *software* em um só corpo (visto que compartilham dos mesmos pontos na interface), antes da criação das membranas, realizou-se uma operação denominada congelamento do sólido do casco (*freeze*).

Os sólidos que correspondem à parte interna das membranas, por onde escoar o fluido a ser permeado, foram gerados a partir da extrusão de material nas circunferências internas da Figura I.1. Realizou-se também o congelamento dos corpos que correspondem às membranas e para obter o interior executou-se mais uma vez a operação *add material*, com extensão de 10 mm.

A saída em anel foi criada a partir de uma “impressão” na superfície do casco (*imprint faces*), da figura que corresponde à saída em anel, tal como pode ser

visualizado na Figura I.4, de modo que, somente nas superfícies do sólido (planos $Z = 0$ mm e $Z = 10$ mm), pode ser identificada tal figura.

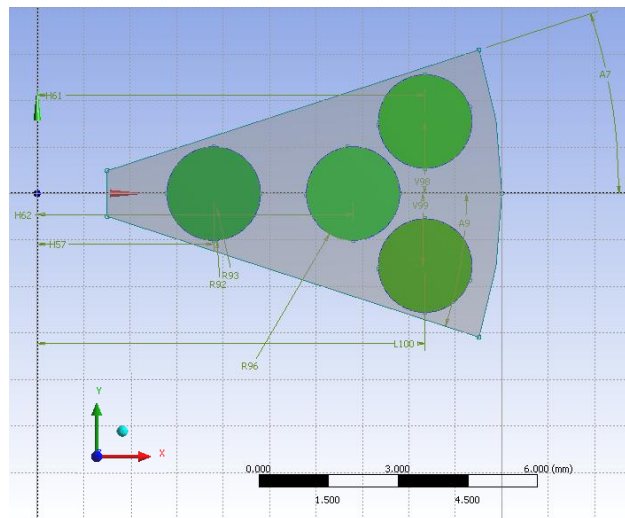


Figura I.3 – Obtenção dos sólidos que representam as membranas a partir da extrusão de material nas circunferências externas (destacadas em verde) do plano base, formando quatro corpos cilíndricos. Operação: *Add Material* com extensão de 10 mm, no *software* ANSYS Workbench.

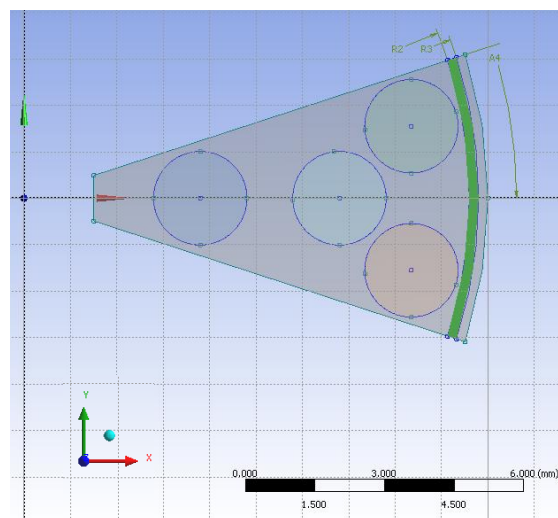


Figura I.4 – Obtenção da superfície em forma de anel que representa a saída do casco, destacada em verde. Operação: *imprint faces* no *software* ANSYS Workbench.

Depois de gerada a geometria, as superfícies de interesse passaram por uma identificação, para a posterior aplicação de configuração de malha específica, mas também para selecionar as condições de contorno do sistema. Na Figura I.5 podem ser visualizadas algumas das diferentes superfícies selecionadas, apresentadas em vermelho.

As regiões de simetria (Figura I.5-D), onde foi cortado o módulo, para a simulação em fatias, receberam condições de contorno específicas, para que a matéria pudesse entrar e sair desta região, sem que fosse considerada uma parede, que interage com o fluido em escoamento. Na simulação as regiões de simetria atuam de modo que toda matéria e momento que saem de uma superfície de simetria entram na outra, podendo, portanto, ser consideradas como uma parte do todo. Como o objeto integral consiste em 10 partes iguais, é mais fácil imaginar que a matéria e o momento que saírem da superfície 1 da Figura I.5-D entrarão na superfície 2 do bloco vizinho a este, e assim por diante. Pela condição de simetria, a matéria e o momento que saírem da superfície 1 do décimo bloco da estrutura integral entrarão na superfície 2 do bloco 1. Sendo assim, pode-se considerar que o que entra ou sai da superfície 1, sai ou entra, respectivamente, na superfície 2, pelo estabelecimento da condição de simetria.

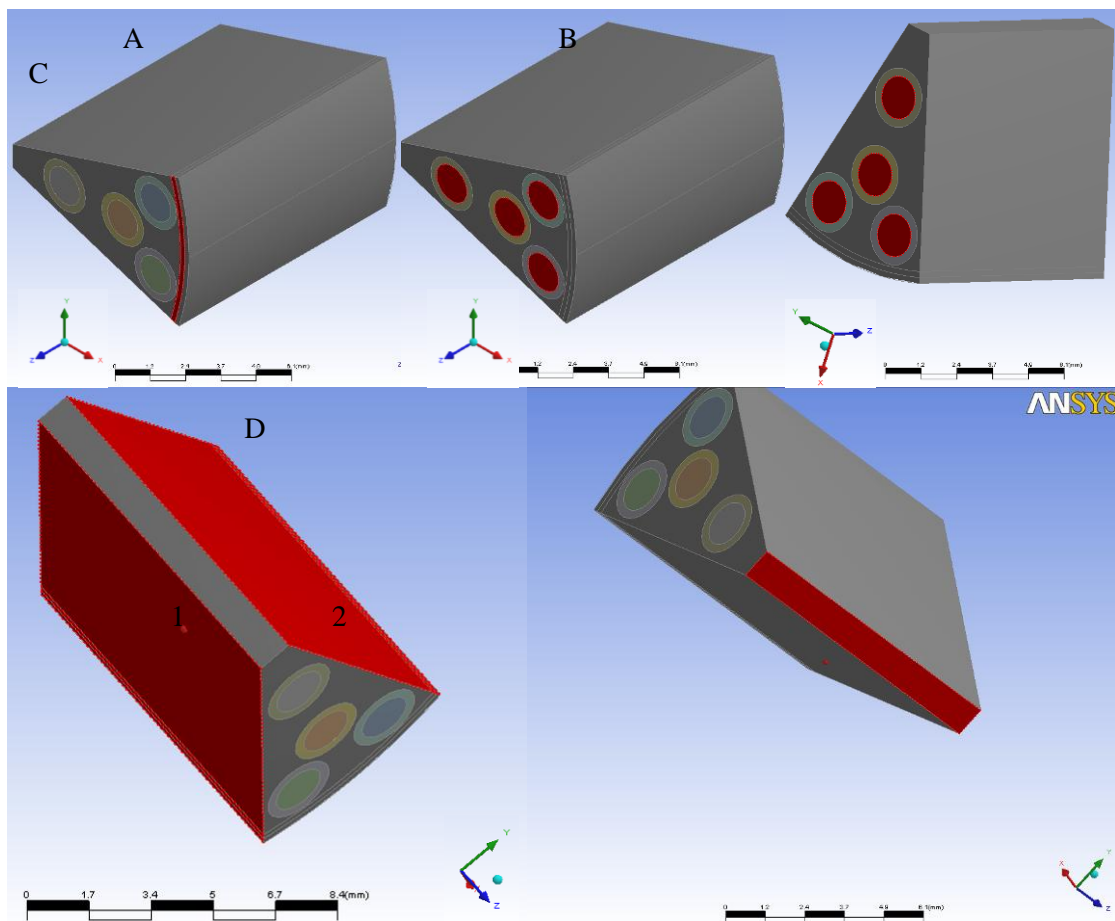


Figura I.5 – Identificação das superfícies que constituem a estrutura do módulo. As superfícies destacadas em vermelho correspondem à saída do casco (A), à saída de fluido do interior da membrana (saída da corrente de concentrado, $Z = 10$ mm) (B), à entrada de fluido na membrana ($Z = 0$ mm) (C), região de simetria (D) e plano de corte central (E).

A superfície denominada centro foi criada devido à geometria contendo a simetria (fatia) gerar um ângulo no centro, tal como descrito no item 5.1. Deste modo pode haver distorções que levem a erros de parametrização (ângulos muito pequenos), ou seja, na confecção da malha o *software* pode “se perder” ao tentar compor a malha perto do ângulo. Evita-se este erro cortando o ângulo, operação que não influi no resultado da simulação e diminui o número de nós e elementos, segundo os estudos realizados neste trabalho.

Na definição das malhas usadas nas simulações foram empregadas condições de refinamento nas superfícies de interface, visando minimizar erros numéricos. Foram adicionadas até 5 camadas de prismas a partir das superfícies escolhidas, contendo ângulo interno e externo mínimo de $2,5^\circ$ e 10° , respectivamente.

Foram empregadas linhas, chamadas linhas de controle, em posições consideradas estratégicas do sólido. Estas linhas, cuja localização pode ser visualizada na Figura I.6, servem para um detalhamento específico da malha a ser gerada, em áreas identificadas como possíveis pontos de erro numérico na formação da malha, devido principalmente à pequena distância existente entre superfícies. Sendo assim, empregou-se uma linha na saída do casco (L_S), uma linha na superfície de corte no centro do sólido (L_C) e linhas laterais na região de simetria nas posições correspondentes às membranas (L_2 , L_3 , L_5 , L_6 , L_{10} e L_{13} , respectivamente), da geometria mais complexa, ou seja, aquela do planejamento de simulações contendo 13 membranas, por fatia de 36° , visando também à realização de refinamento.

Todas as simulações iniciais foram realizadas desta forma, sendo que na construção da geometria, no plano base (Figura I.1) foram alterados somente o número de membranas, sendo construída inicialmente o plano mais complexo e a seguir, para obter os demais foram retiradas membranas e alterados os diâmetros, mantendo-se sempre a membrana central (que corresponde à posição da única membrana na geometria básica), exatamente com o mesmo centro.

Como resultado da inclusão de uma linha a malha gerada no seu entorno recebe influência desta, podendo adquirir um aspecto tal como o apresentado na Figura I.7, onde a linha recebeu condições de raio de influência (raio em que a malha é controlada pela linha) de 0,25 mm e o tamanho da aresta da face triangular do prisma foi definido como 0,02 mm.

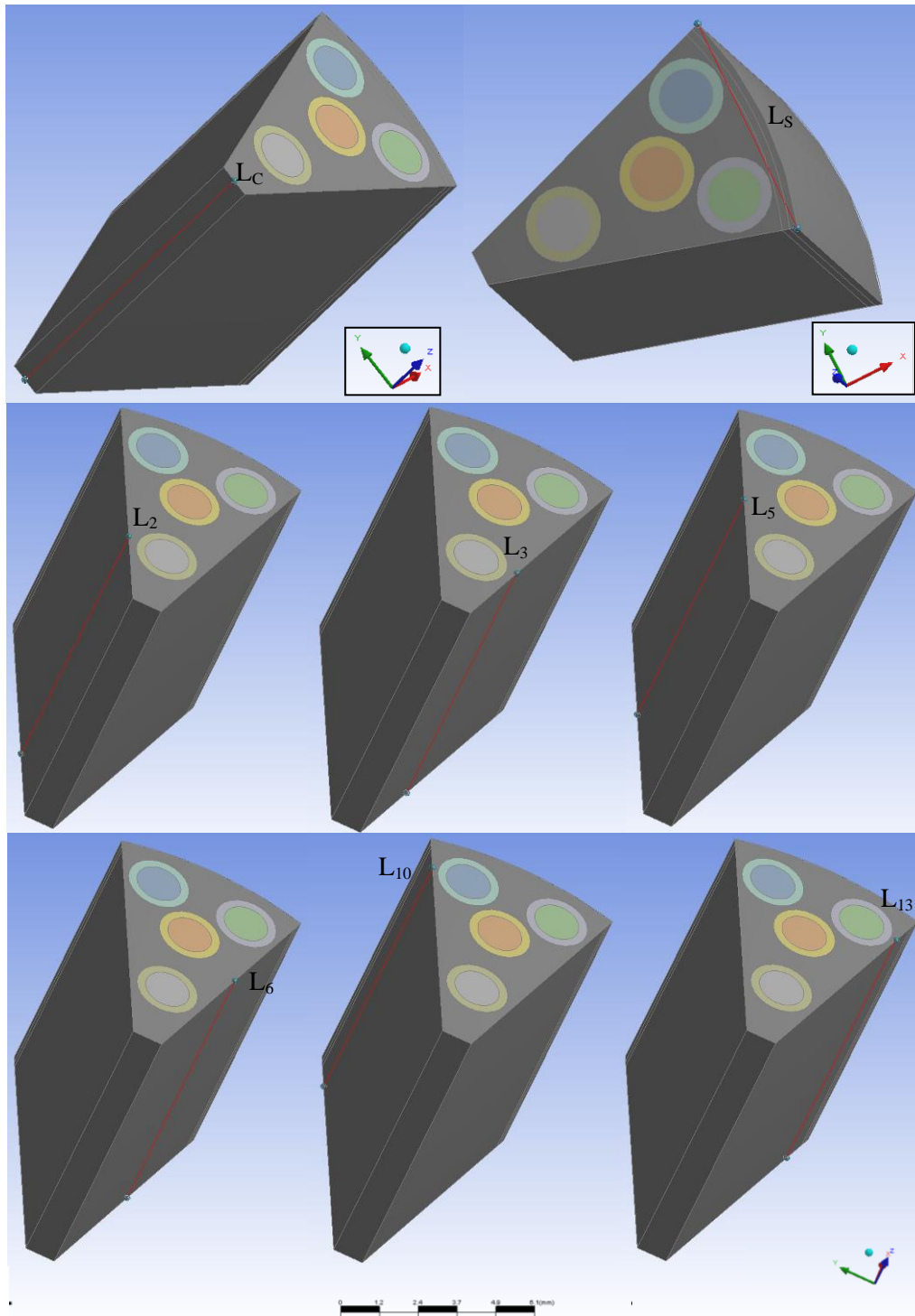


Figura I.6 – Linhas adicionadas à malha para refino local específico. Posições das linhas (pontos): Centro (L_C) – (1,5; 0; 0) e (1,5; 0; 10); Saída do módulo (L_S) – vértices da fatia do módulo; L_2 – (4,1 ; 1,33; 0) e (4,1; 1,33; 10); L_3 (4,1; -1,33; 0) e (4,1; -1,33; 10); L_5 – (5,7 ; 1,85; 0) e (5,7 ; 1,85; 10); L_6 – (5,7 ; -1,85; 0) e (5,7 ; -1,85; 10); L_{10} – (8,3 ; 2,69; 0) e (8,3 ; 2,69; 10) e L_{13} – (8,3 ; -2,69; 0) e (8,3 ; -2,69; 10);

Na construção da geometria do módulo obtido experimentalmente, na qual existem 4 membranas, com um diâmetro maior que aquelas simuladas inicialmente, foi necessário a modificação das posições das demais membranas para que se mantivesse a

membrana central na mesma posição das demais simulações, tendo em vista que tal membrana foi empregada para obtenção de perfil de pressão durante as avaliações preliminares. Como resultado, foi necessário também realizar modificações na confecção da malha, de modo que esta não segue exatamente as mesmas condições que as demais, no que se refere à colocação de linhas para refino, por exemplo.

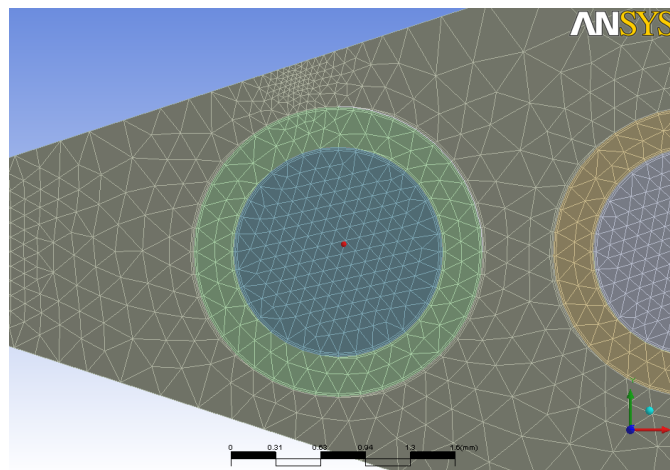


Figura I.7 – Aspecto da malha gerada no entorno da linha na posição 2, cujas definições de raio de influência e da aresta da face triangular do prisma foram definidas como 0,25 mm e 0,02 mm, respectivamente.

A motivação para a modificação descrita na obtenção da malha pode ser observada na Figura I.8, na qual é apresentada a malha gerada com 6 linhas laterais (descritas na Figura I.6), e que resulta em uma malha bastante refinada (112409 nós, 155520 elementos), mas com prismas colapsados (não são mantidas as condições definidas de 5 camadas de prismas no entorno da superfície) em regiões próximas à superfície de simetria, ainda que próximas a linhas de refino. A ocorrência de prismas colapsados na estrutura da malha implica em executar as equações de continuidade de forma distinta em uma mesma superfície, resultando em diferentes valores, influenciando no balanço final. Ainda é possível visualizar na Figura I.8 regiões com somente uma camada de prismas, tanto na superfície externa (S_E) quanto na superfície interna (S_I) da membrana, o que interfere na qualidade dos resultados das simulações.

Deste modo, como alternativa às novas dificuldades de obtenção da malha, como resultado da modificação da geometria do sólido, foram criadas 4 linhas, uma no centro de cada uma das membranas, com raio de influência 0,9 mm visando detalhamento da malha e resolução do colapso nas superfícies de refinamento e foram

mantidas as linhas nas superfícies central (L_C) e de saída do casco (L_S), as quais podem ser visualizadas na Figura I.6.

Foram selecionadas para o detalhamento (*inflated*) as superfícies nas interfaces, na região de simetria e no plano de corte no centro da geometria.

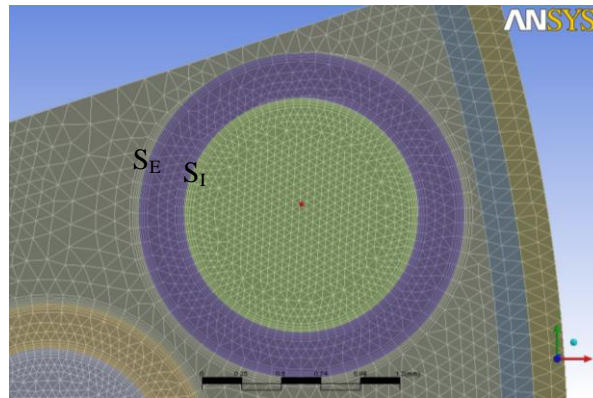


Figura I.8 – Malha com prismas colapsados nas superfícies interna (S_I) e externa (S_E) do meio poroso.

A malha 2 (M2), contém 3 camadas de prismas nas regiões selecionadas, e resulta em 94740 elementos, enquanto que a malha 3 (M3), com 99520 elementos, tem 4 camadas de prismas como refinamentos das superfícies previamente selecionadas.

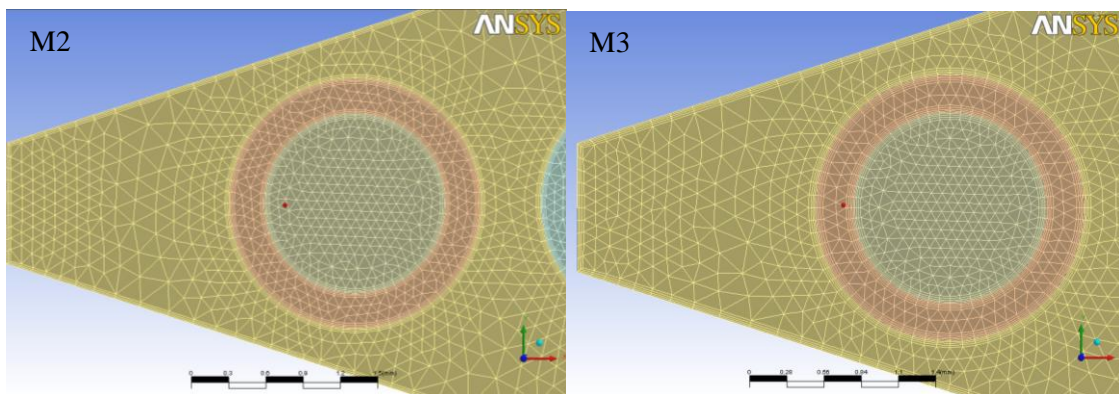


Figura I.9 – Aspecto da malha com modificação do grau de refinamento das malhas M2 e M3, obtidas a partir de estrutura correspondente ao módulo obtido experimentalmente.

A ampliação para 5 no número de camadas de refinamento gerou colapso de prismas, na última camada nos ângulos dos vértices do casco, na região próxima à saída do casco. Deste modo a malha ficou com 4 camadas de prismas e executou-se a divisão da malha no sentido axial do mólulo (coordenada Z), passando então o número de divisões da coordenada Z de 10 para 20, gerando a malha 4 (M4 – 199040 elementos),

para 30 (M5 - 298560), 40 (M6 - 398080 elementos) e 50 (M7 - 497600 elementos), resultando na Figura I.10.

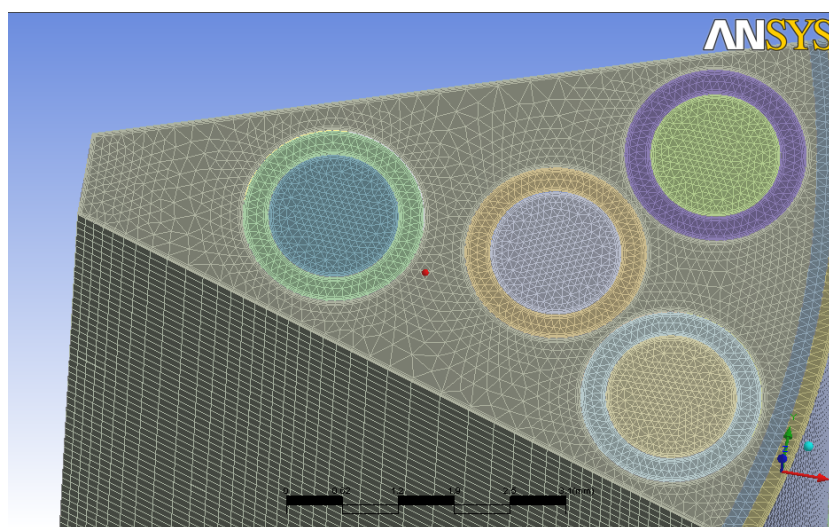
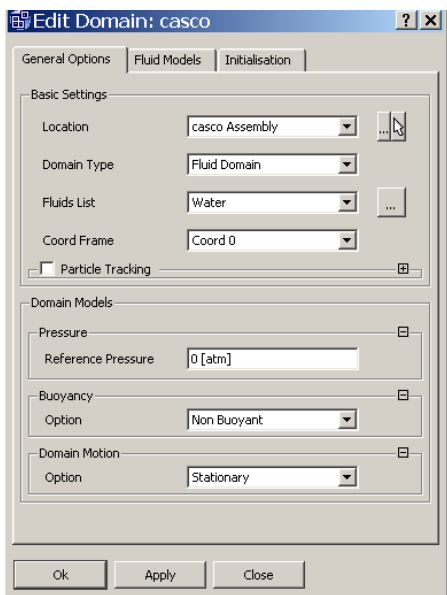
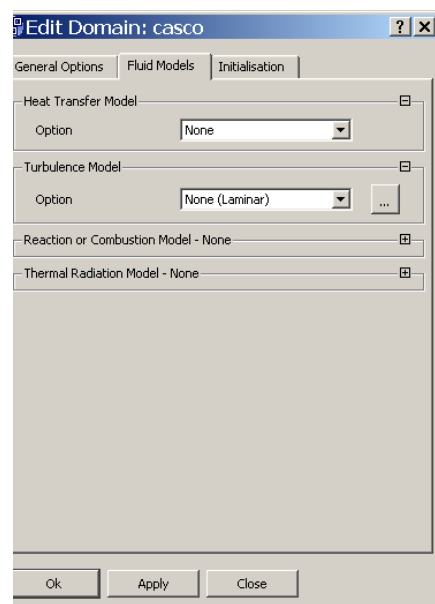


Figura I.10 - Aspecto da malha com maior refinamento (M7 - 497600 elementos), obtida a partir de estrutura correspondente ao módulo obtido experimentalmente, utilizada para o estudo de escolha da malha.

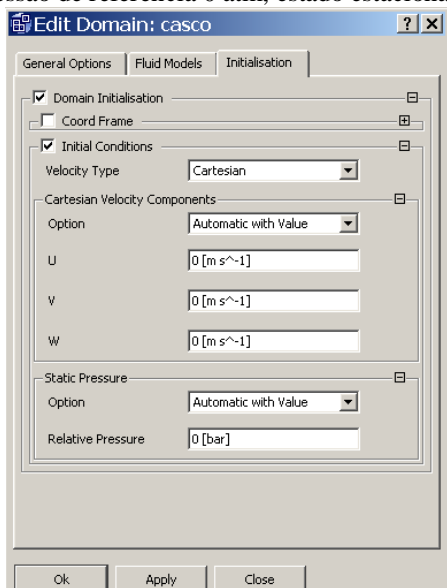
Anexo II - Condições de contorno empregadas nas simulações



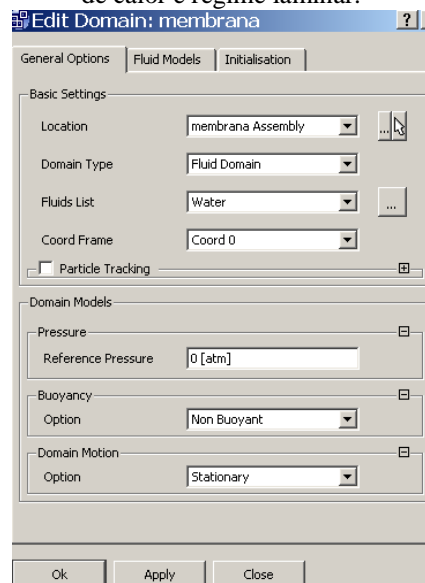
A) Condições gerais para o casco: líquido água, pressão de referência 0 atm, estado estacionário.



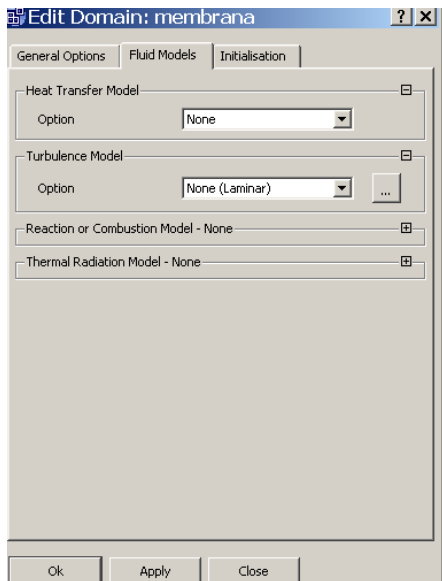
B) Condições para o casco: sem transferência de calor e regime laminar.



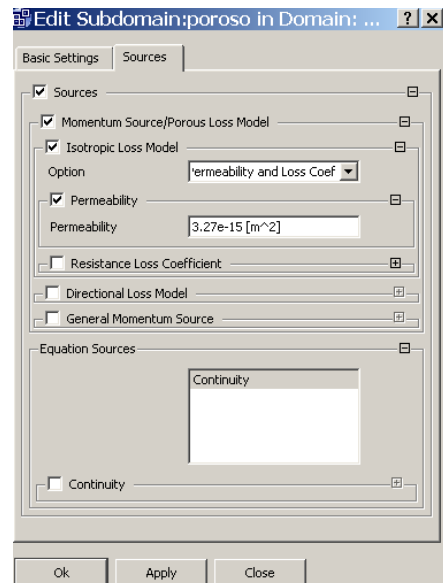
C) Condições de inicialização para o casco: velocidade de 0 m/s em todas as direções e pressão relativa 0 bar.



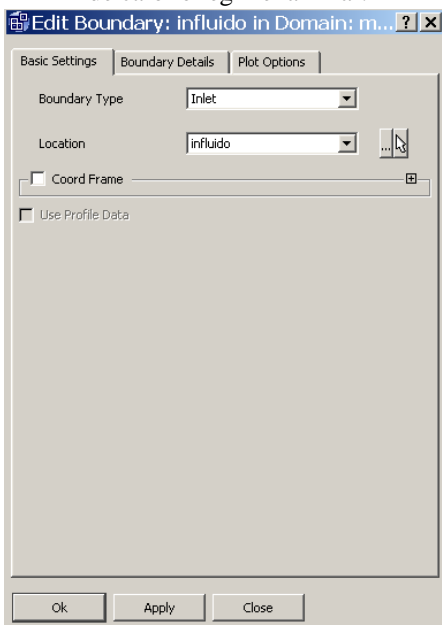
D) Condições gerais para a membrana: líquido água, pressão de referência 0 atm, estado estacionário.



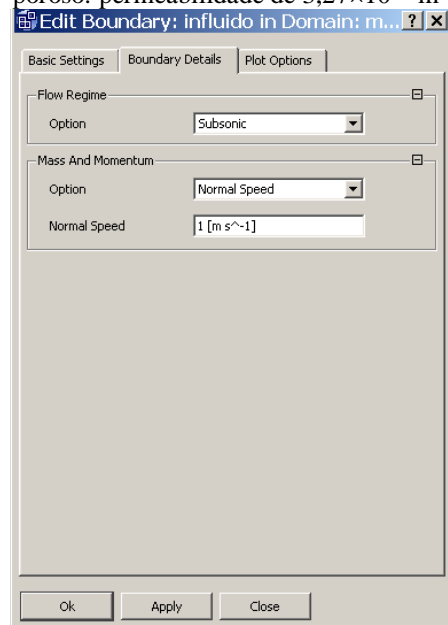
E) Condições para a membrana: sem transferência de calor e regime laminar.



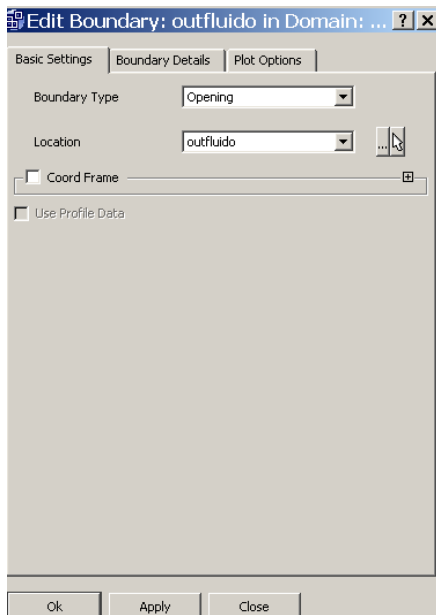
F) Condições para a membrana, em seu subdomínio poroso: permeabilidade de $3,27 \times 10^{-15} \text{ m}^2$.



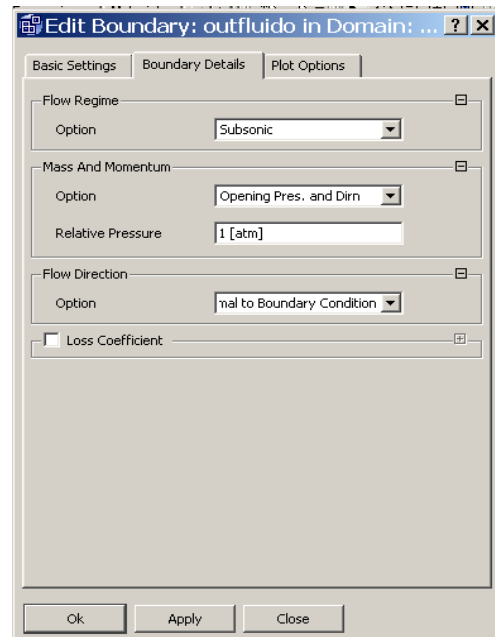
G) Condição de contorno na entrada da membrana: *Inlet*.



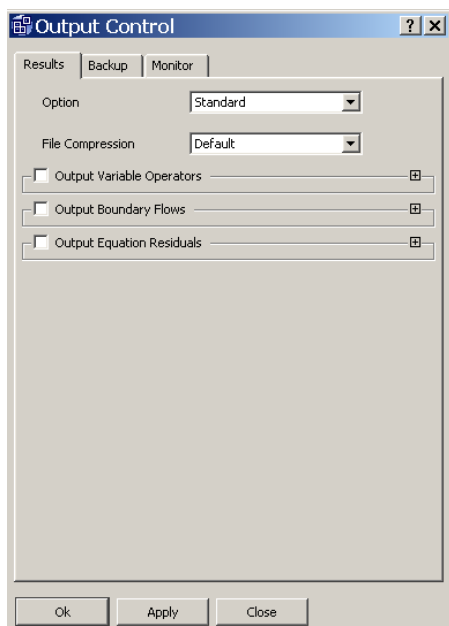
H) Condição de contorno de entrada da membrana: velocidade de 1 m/s.



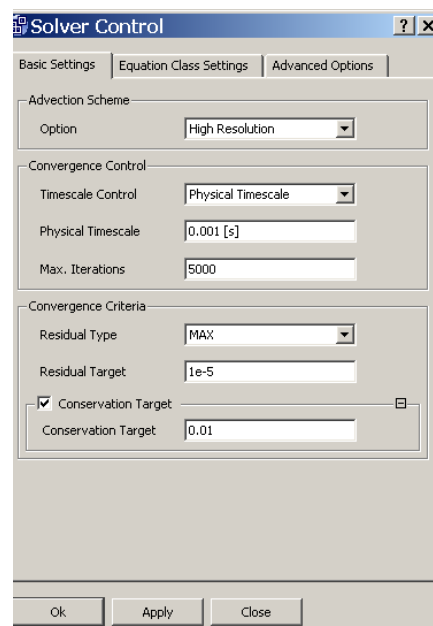
I) Condição de contorno na saída de fluido da membrana: *Opening*



J) Condições contorno na saída da membrana: pressão de 1 atm.



K) Condição de armazenamento dos resultados



L) Controles de execução da simulação.

Anexo III - Figuras obtidas através de fluidodinâmica computacional, resultantes dos pontos do planejamento das simulações

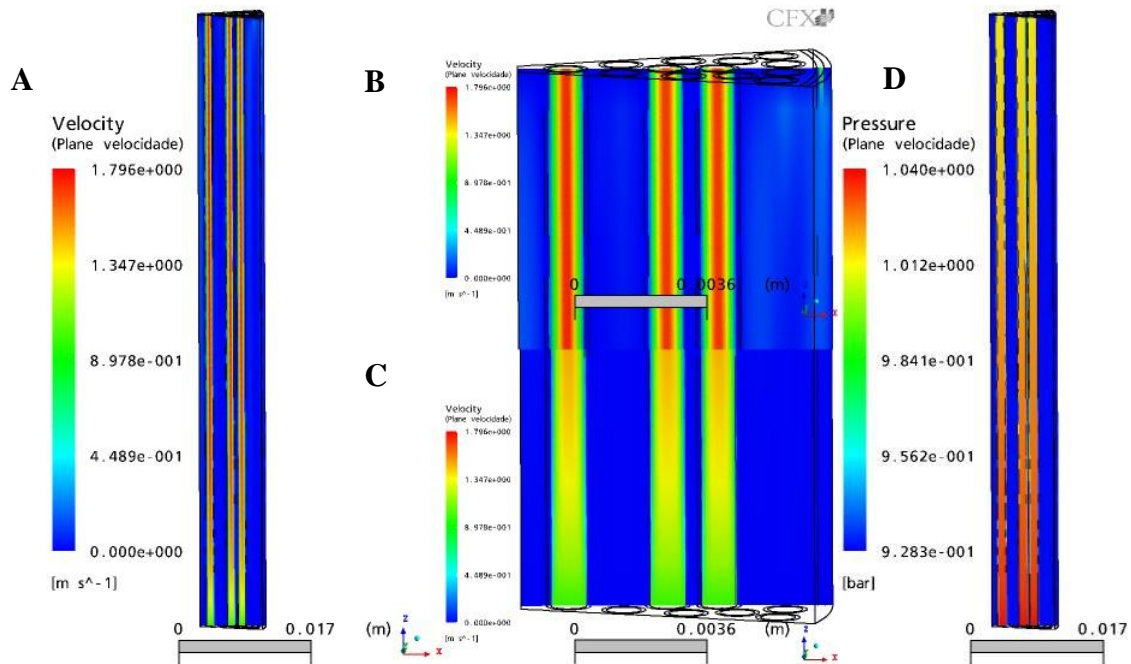


Figura III.1 - Planos referentes ao módulo do ponto 1 (80 mm, 130 membranas, $D_{int} = 0,95$ mm) do planejamento. Velocidade do fluido na vista global do módulo (A), na saída (B) e na entrada (C) e a variável pressão na vista global (D). Velocidade máxima 1,796 m/s e pressão máxima 1,04 bar.

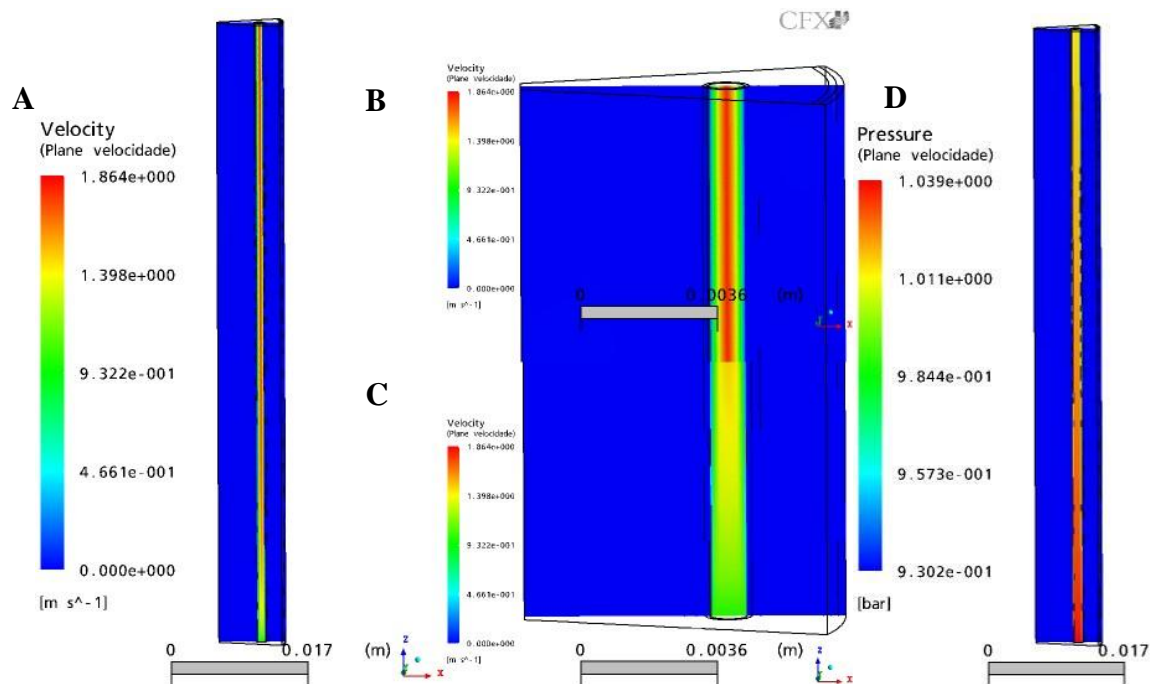


Figura III.2 - Planos referentes ao módulo do ponto 2 (80 mm, 10 membranas, $D_{int} = 0,95$ mm) do planejamento. Velocidade do fluido na vista global do módulo (A), na saída (B) e na entrada (C) e a variável pressão na vista global (D). Velocidade máxima 1,864 m/s e pressão máxima 1,039 bar.

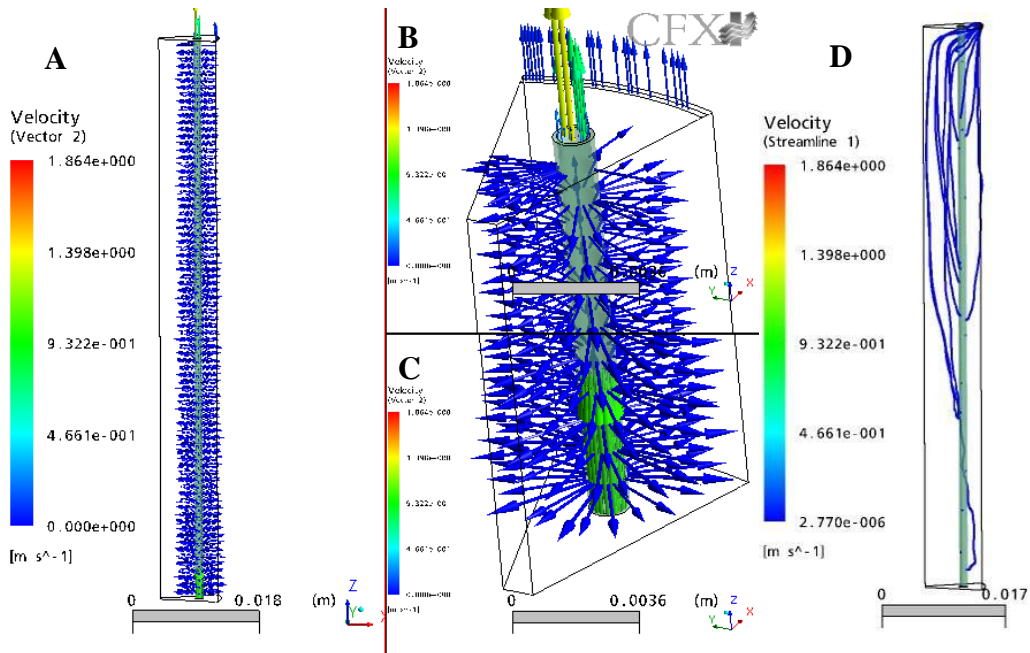


Figura III.3 – Ponto 2 do planejamento (80 mm, 10 membranas, $D_{int} = 0,95$ mm). Vetores velocidade saindo da membrana no módulo inteiro (A), na região de saída (B) e na entrada (C) do módulo. Linhas de corrente no módulo inteiro (D). Velocidade máxima 1,864 m/s.

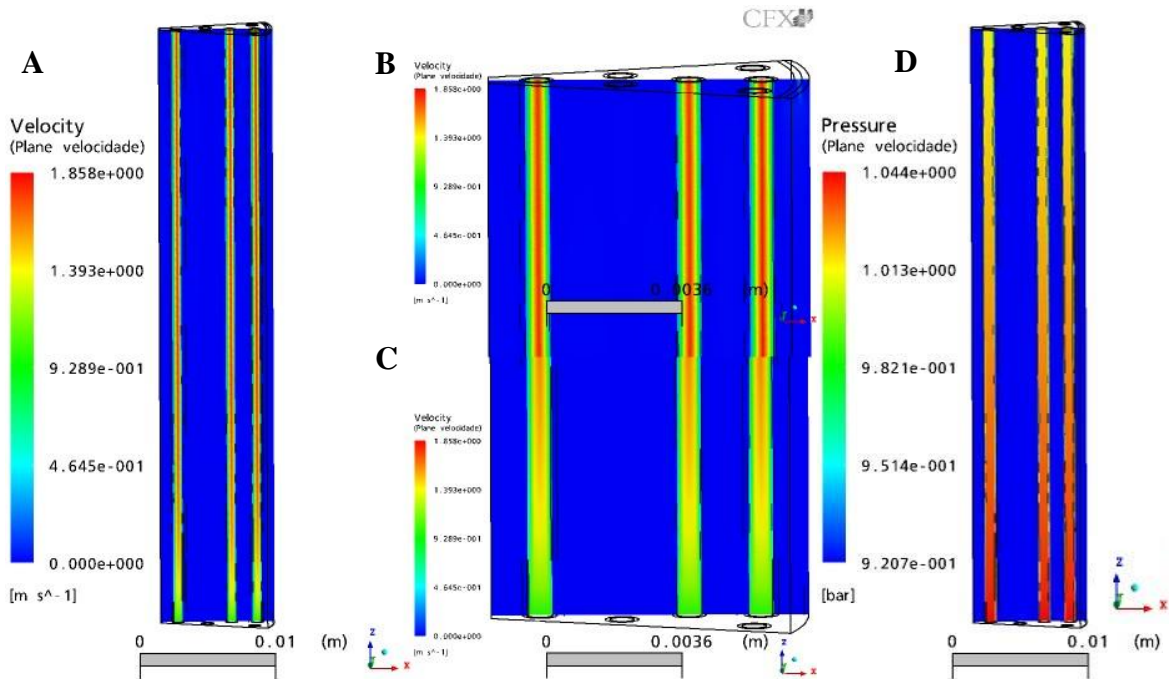


Figura III.4 - Planos referentes ao módulo do ponto 3 (45 mm, 70 membranas, $D_{int} = 0,65$ mm) do planejamento. Velocidade do fluido na vista global do módulo (A), na saída (B) e na entrada (C) e a variável pressão na vista global (D). Velocidade máxima 1,858 m/s e pressão máxima 1,044 bar.

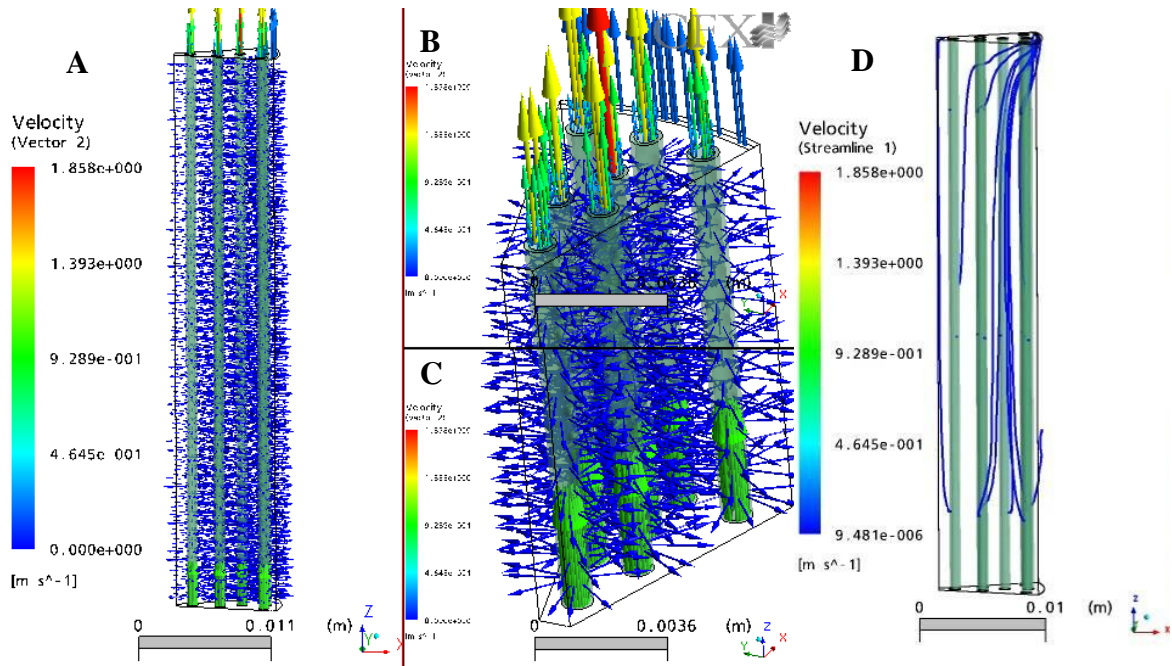


Figura III.5 – Ponto 3 do planejamento (45 mm, 70 membranas, $D_{int} = 0,65$ mm). Vetores velocidade saindo da membrana no módulo inteiro (A), na região de saída (B) e na entrada (C) do módulo. Linhas de corrente no módulo inteiro (D). Velocidade máxima 1,858 m/s.

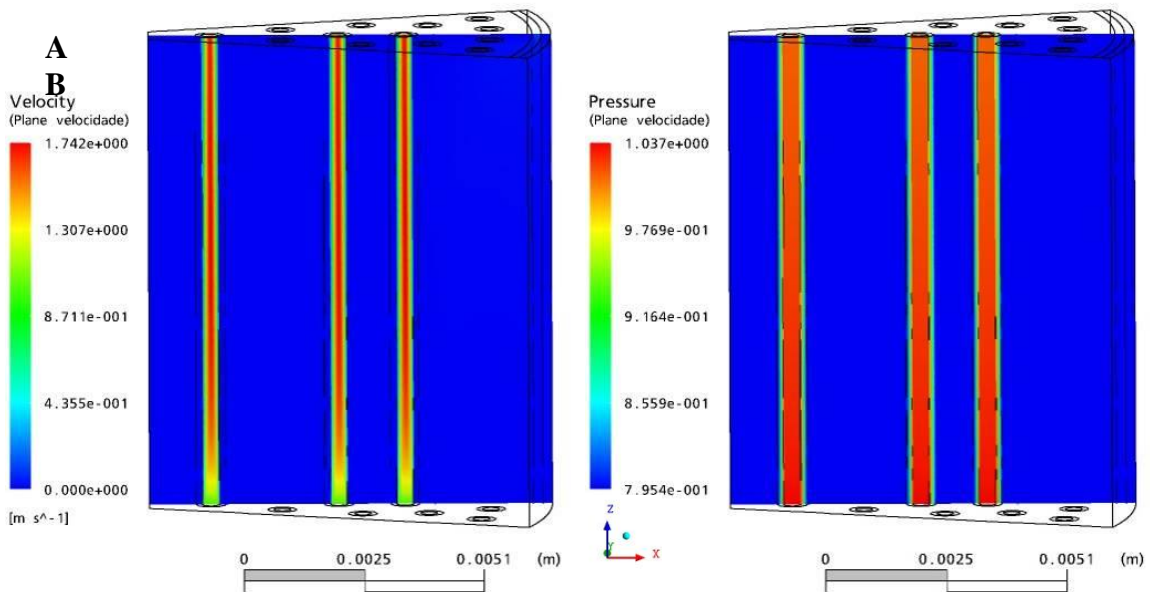


Figura III.6 - Planos referentes à velocidade do fluido (A) e à pressão (B) na vista global do módulo do ponto 4 (10 mm, 130 membranas, $D_{int} = 0,35$ mm) do planejamento. Velocidade máxima 1,742 m/s e pressão máxima de 1,037 bar.

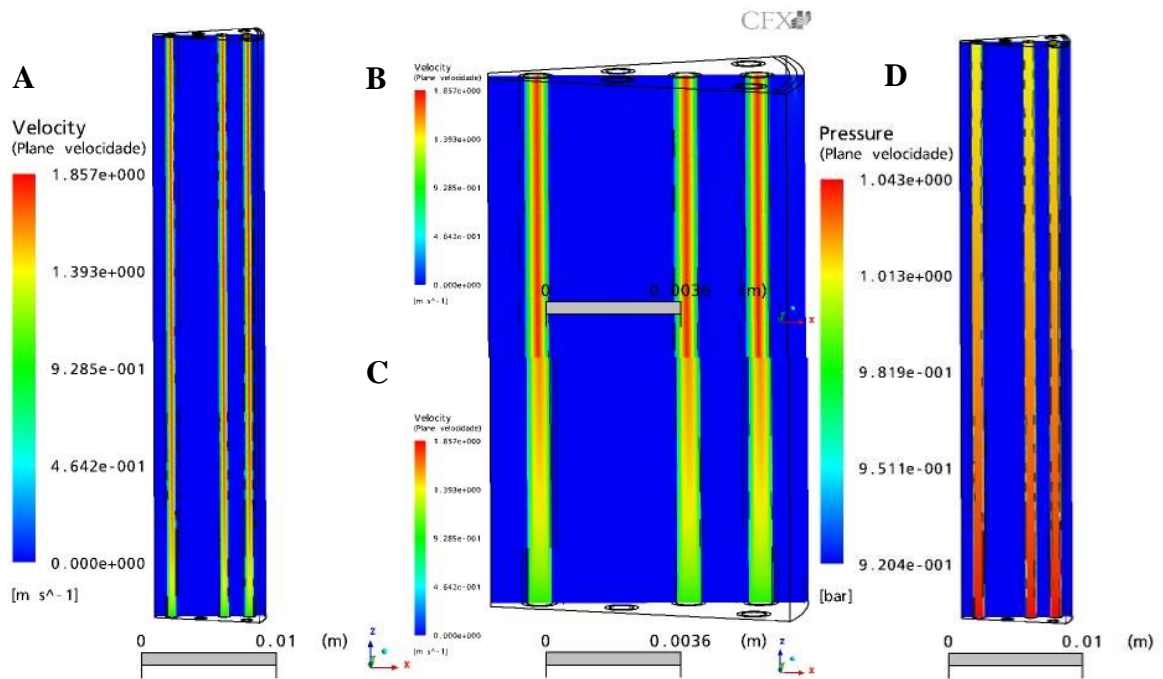


Figura III.7 - Planos referentes ao módulo do ponto 5 (45 mm, 70 membranas, $D_{int} = 0,65$ mm) do planejamento. Velocidade do fluido na vista global do módulo (A), na saída (B) e na entrada (C) e a variável pressão na vista global (D). Velocidade máxima 1,857 m/s e pressão máxima 1,043 bar.

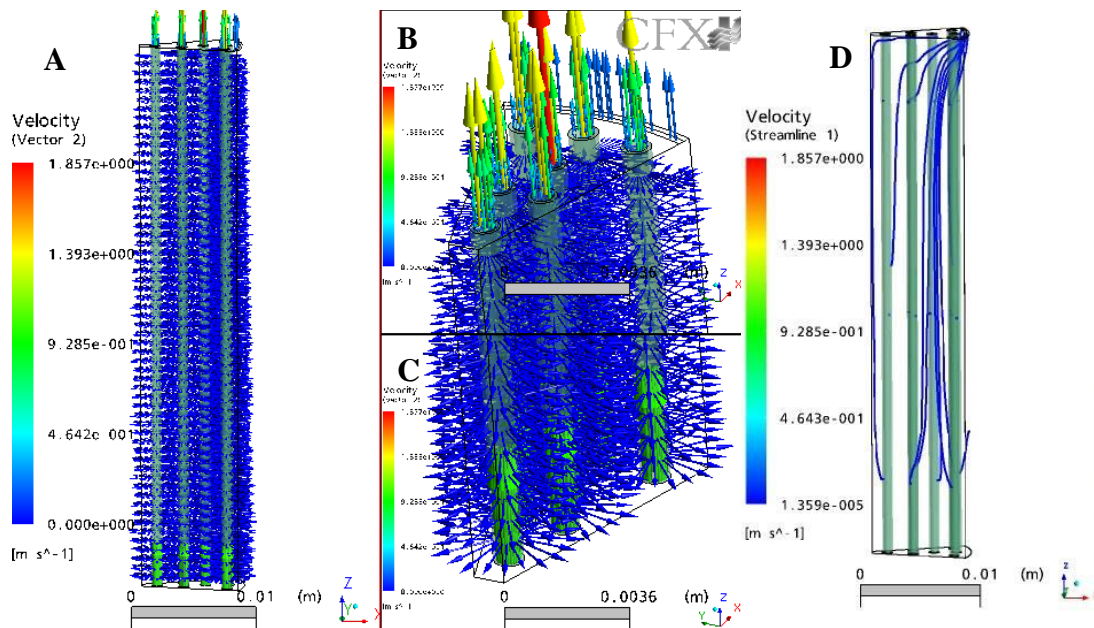


Figura III.8 – Ponto 5 do planejamento (45 mm, 70 membranas, $D_{int} = 0,65$ mm). Vetores velocidade saindo da membrana no módulo inteiro (A), na região de saída (B) e na entrada (C) do módulo. Linhas de corrente no módulo inteiro (D). Velocidade máxima 1,857 m/s.

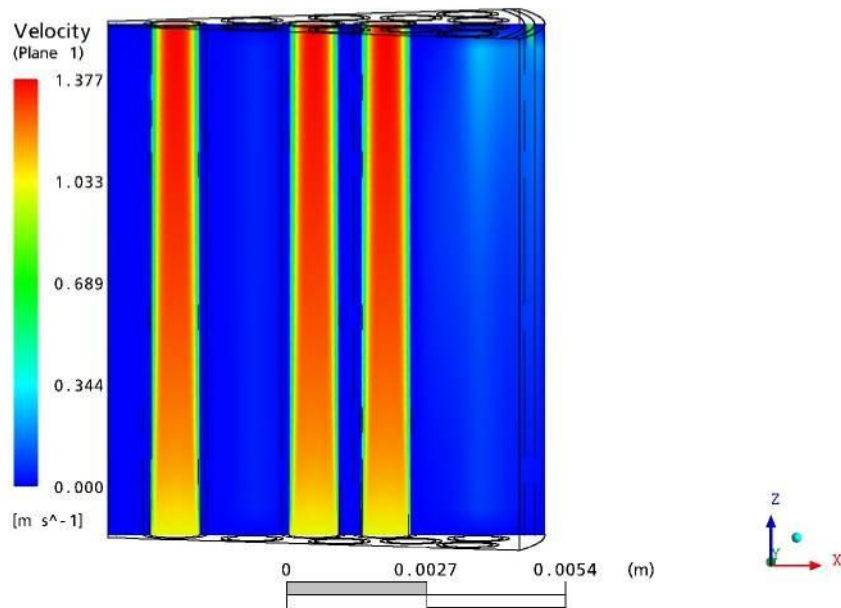


Figura III.9 - Planos referentes à velocidade do fluido, dentro do módulo do ponto 6 (10 mm, 130 membranas, $D_{int} = 0,95$ mm) do planejamento. Velocidade máxima 1,377 m/s.

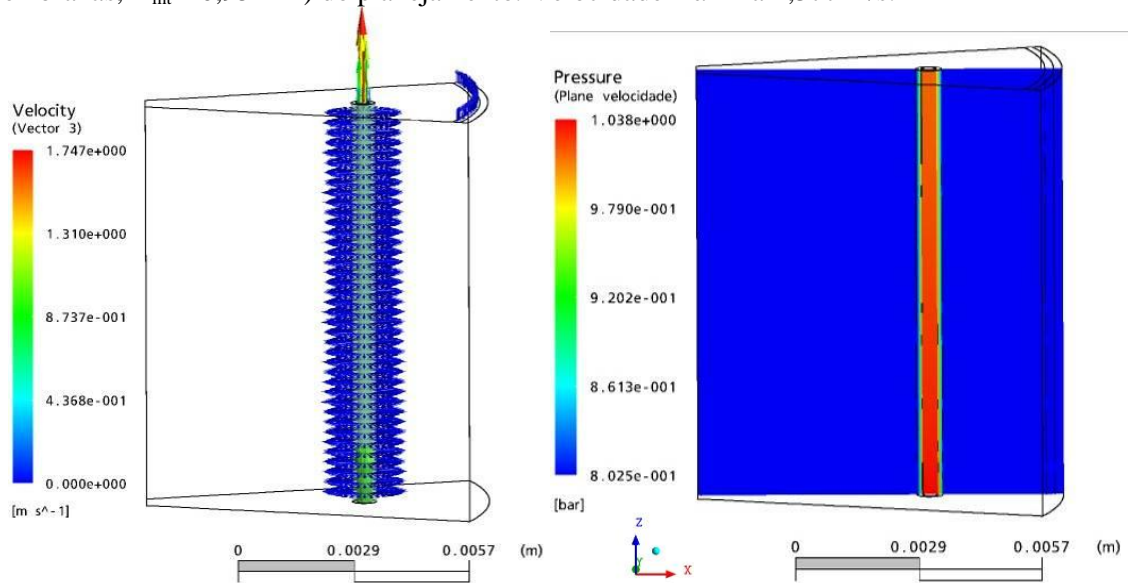


Figura III.10 – Ponto 7 do planejamento (10 mm, 10 membranas, $D_{int} = 0,35$ mm). Vetores velocidade saindo da membrana (A) e a variável pressão sobre um plano, em vista global do módulo. Velocidade máxima 1,747 m/s e pressão máxima 1,038 bar.

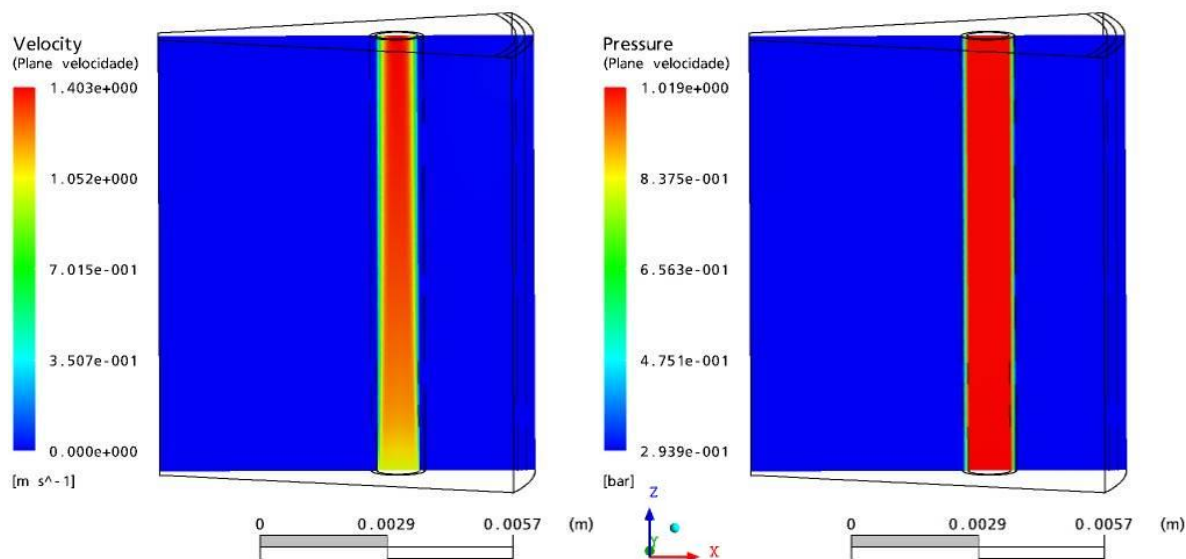


Figura III.11 – Planos de velocidade e de pressão referentes ao ponto 8 (10 mm, 10 membranas, $D_{int} = 0,95$ mm) do planejamento. Velocidade máxima 1,403 m/s e pressão máxima 1,019 bar.

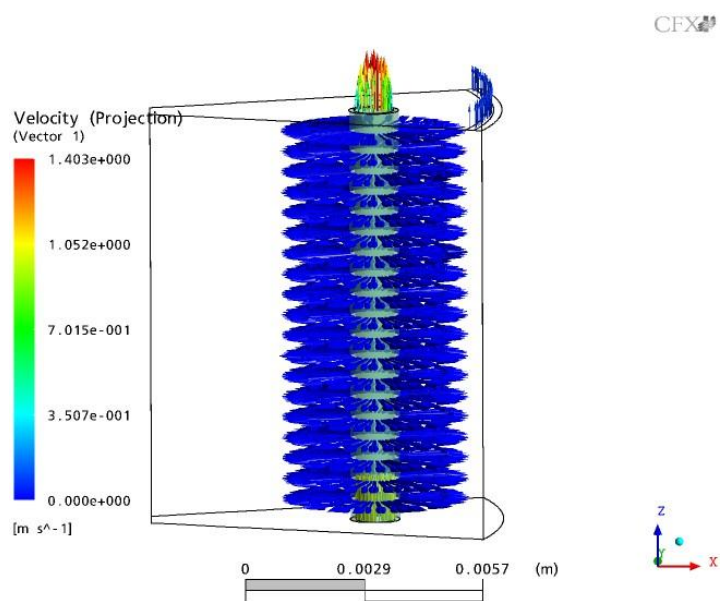


Figura III.12 – Vetores velocidade saindo da membrana referentes ao ponto 8 (10 mm, 10 membranas, $D_{int} = 0,95$ mm) do planejamento. Velocidade máxima 1,403 m/s, observada no centro da membrana.

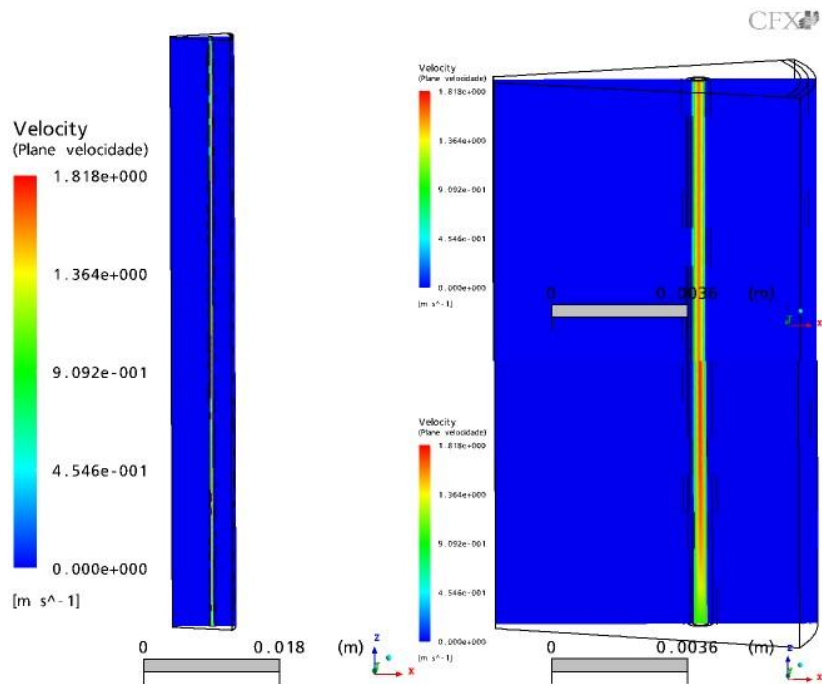


Figura III.14 - Planos referentes à velocidade do fluido, dentro do módulo do ponto 9 (80 mm, 10 membranas, $D_{int} = 0,35$ mm) do planejamento. Esquerda mostra entrada do módulo e à direita pode ser visualizada a saída. Velocidade máxima 1,818 m/s.

ANEXO IV – Fotomicrografias das membranas de PEI/PVP obtidas sob diferentes condições experimentais

Neste ANEXO são apresentadas as fotomicrografias das membranas de PEI/PVP obtidas durante os ensaios de fiação realizados ao longo deste trabalho, mas que não foram apresentadas no corpo do texto. As membranas foram obtidas com a injeção de solução polimérica e de líquido interno (com composição e alimentação variável) em uma extrusora do Laboratório de Processos de Separação com Membranas (PAM), empregando diferentes distâncias entre a saída da agulha de injeção e o banho de precipitação (L_{E-Ba}) contendo não solvente, tal como descrito na Metodologia, item 4.2.2.a.

Abaixo podem ser observadas as micrografias, ordenadas pela condição de fiação.

FIAÇÃO UM

Condições:

- composição da solução polimérica: 10% PVP, 15% PEI, 75% NMP
- composição do líquido interno: 70% NMP e 30% água deionizada
- pressão de injeção da solução polimérica: 7 kgf/cm²
- MEV: Laboratório de Microscopia Eletrônica do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (PEMM-COPPE-UFRJ), equipamento Jeol JSM - 6460 LV

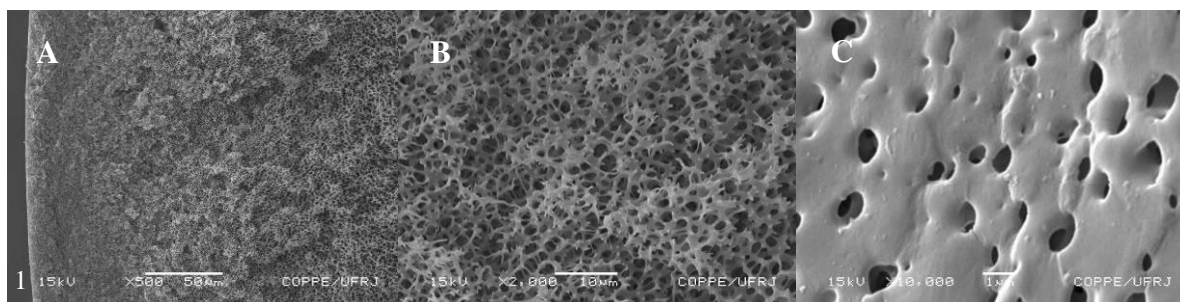


Figura IV.1 – Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C1 (líquido interno: 70% NMP/30% H₂O (%m/m); vazão líquido interno: 3,7 mL/min; L_{E-Ba} : 7 cm). (A) Ampliação da seção transversal próxima à superfície externa (1). (B) Detalhe da região central da espessura da membrana. (C) Superfície externa. Barras correspondem a 50, 10 e 1 μ m, respectivamente.

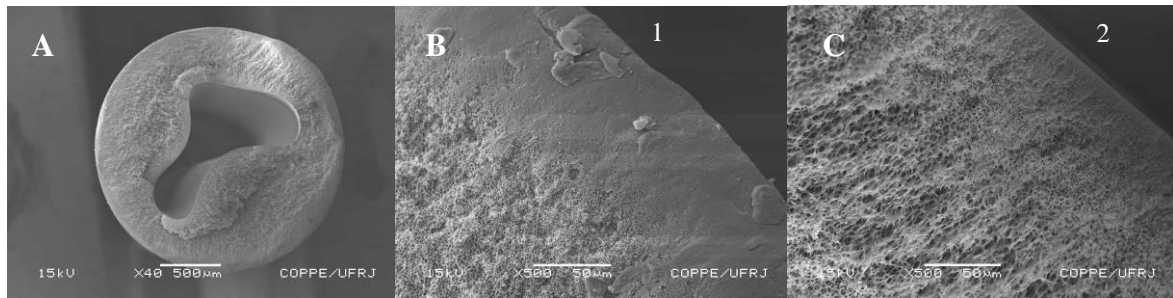


Figura IV.2 – Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C2 (líquido interno: 70% NMP/30% H₂O (%m/m); vazão líquido interno: 3,7 mL/min; L_{E-Ba}: 18 cm). (A) Seção transversal. (B) e (C) Ampliações da seção transversal próximas às superfícies externa (1) e interna (2). Barras correspondem a 500, 50 e 50 µm, respectivamente.

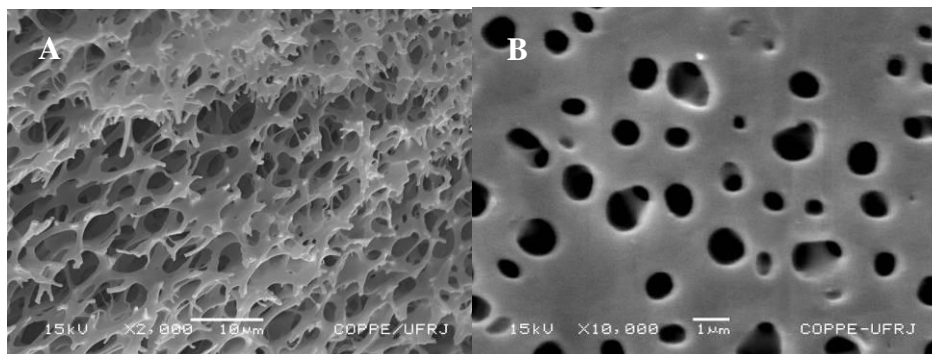


Figura IV.3 – Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C2 (líquido interno: 70% NMP/30% H₂O (%m/m); vazão líquido interno: 3,7 mL/min; L_{E-Ba}: 18 cm). (A) Ampliação da região central da espessura da membrana. (B) Superfície externa. Barras correspondem a 10 e 1 µm, respectivamente.

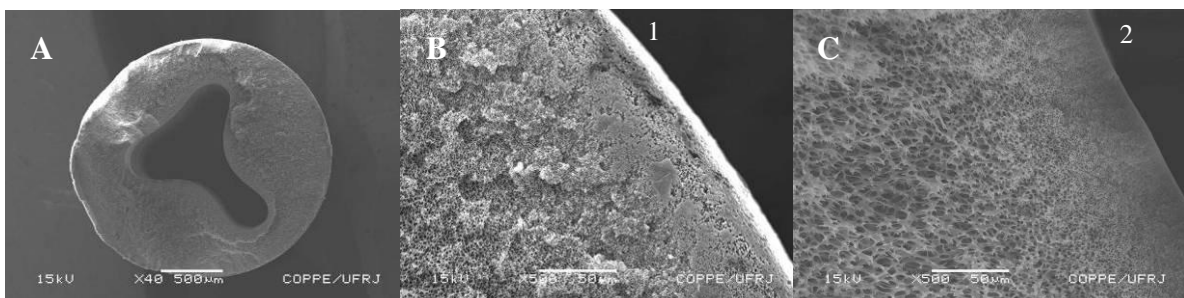


Figura IV.4 – Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C3 (líquido interno: 70% NMP/30% H₂O (%m/m); vazão líquido interno: 1,3 mL/min; L_{E-Ba}: 18 cm). (A) Seção transversal. (B) e (C) Ampliações da seção transversal próximas às superfícies externa (1) e interna (2), com ausência de poros na superfície interna. Barras correspondem a 500, 50 e 50 µm, respectivamente.

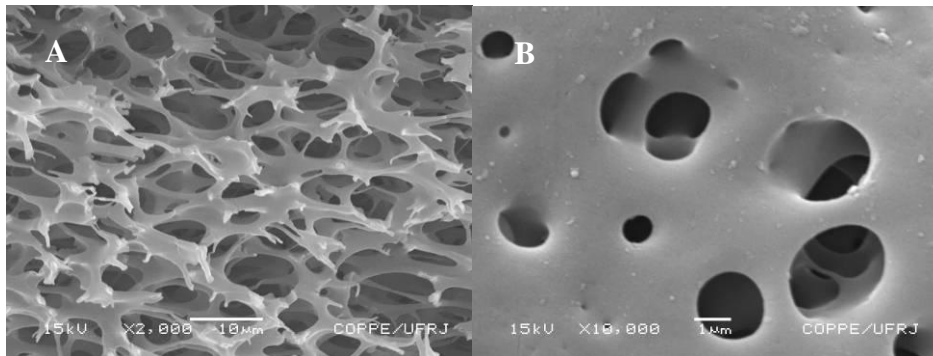


Figura IV.5 – Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C3 (líquido interno: 70% NMP/30% H₂O (%m/m); vazão líquido interno: 1,3 mL/min; L_{E-Ba}: 18 cm). (A) Ampliação da região central da espessura da membrana. (B) Superfície externa. Barras correspondem a 10 e 1 μm, respectivamente.

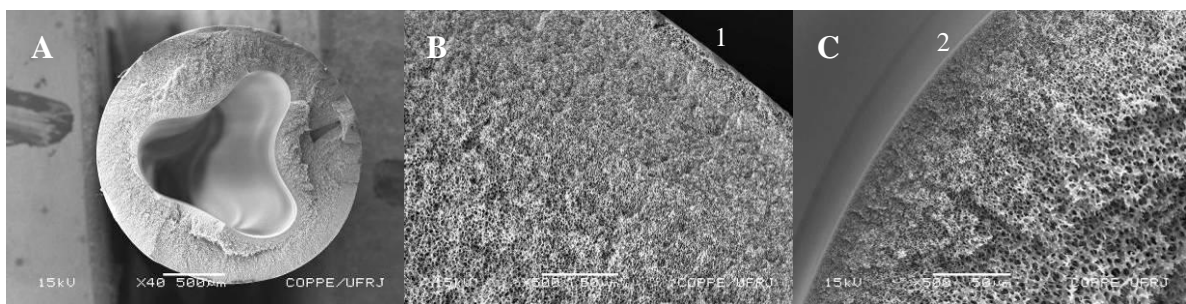


Figura IV.6 - Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C4 (líquido interno: 70% NMP/30% H₂O (%m/m); vazão líquido interno: 2,3 mL/min; L_{E-Ba}: 18 cm). (A) Seção transversal. (B) e (C) Ampliações da seção transversal próximas às superfícies externa (1) e interna (2), com ausência de poros na superfície interna (pele). Barras correspondem a 500, 50 e 50 μm, respectivamente.

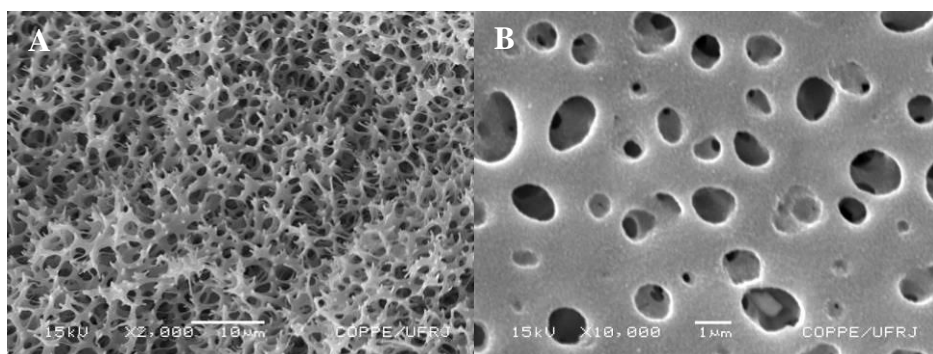


Figura IV.7 - Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C4 (líquido interno: 70% NMP/30% H₂O (%m/m); vazão líquido interno: 2,3 mL/min; L_{E-Ba}: 18 cm). (A) Ampliação da região central da espessura da membrana. (B) Superfície externa. Barras correspondem a 10 e 1 μm, respectivamente.

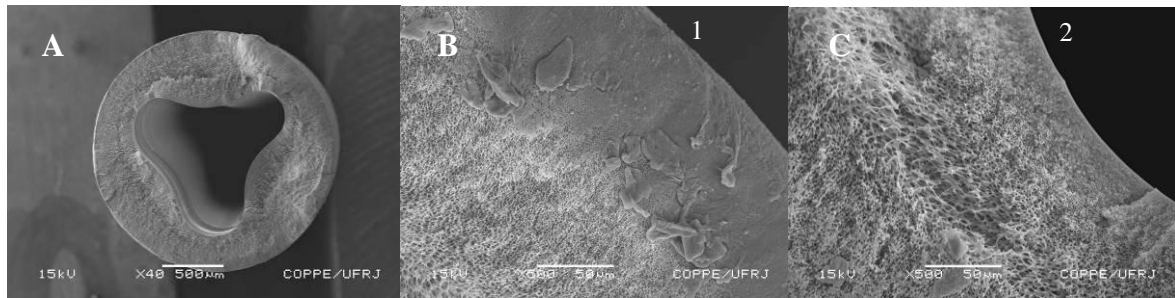


Figura IV.8 - Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C5 (líquido interno: 70% NMP/30% H₂O (%m/m); vazão líquido interno: 2,3 mL/min; L_{E-Ba}: 29 cm). (A) Seção transversal. (B) e (C) Ampliações da seção transversal próximas às superfícies externa (1) e interna (2). Barras correspondem a 500, 50 e 50 μm, respectivamente.

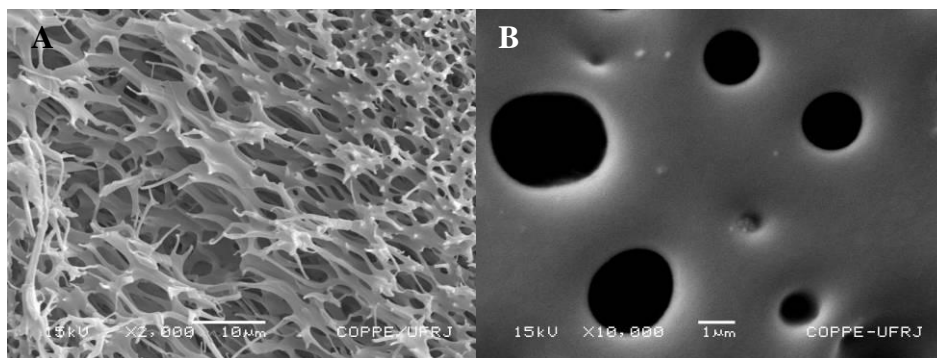


Figura IV.9 - Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C5 (líquido interno: 70% NMP/30% H₂O (%m/m); vazão líquido interno: 2,3 mL/min; L_{E-Ba}: 29 cm). (A) Ampliação da região central da espessura da membrana. (B) Superfície externa. Barras correspondem a 10 e 1 μm, respectivamente

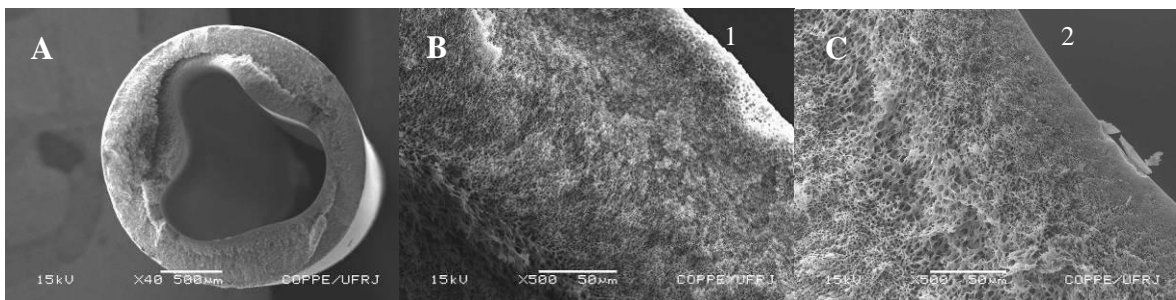


Figura IV.10 - Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C6 (líquido interno: 70% NMP/30% H₂O (%m/m); vazão líquido interno: 2,8 mL/min; L_{E-Ba}: 29 cm). (A) Seção transversal. (B) e (C) Ampliações da seção transversal próximas às superfícies externa (1) e interna (2), com ausência de poros na superfície interna (pele). Barras correspondem a 500, 50 e 50 μm, respectivamente.

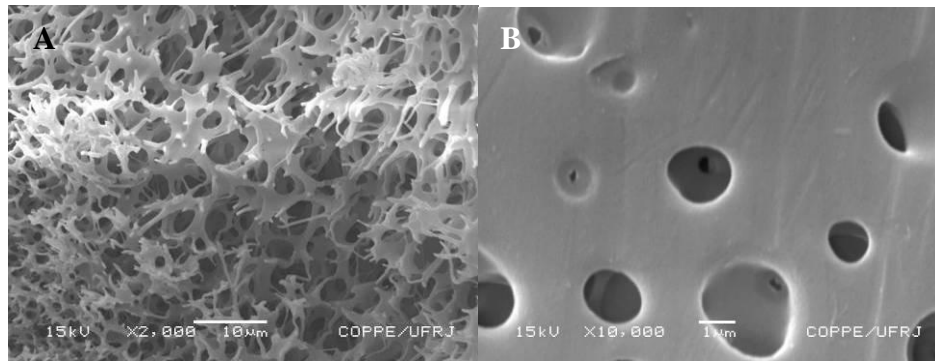


Figura IV.11 - Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F1C6 (líquido interno: 70% NMP/30% H₂O (%m/m); vazão líquido interno: 2,8 mL/min; L_{E-Ba}: 29 cm). (A) Ampliação da região central da espessura da membrana. (B) Superfície externa. Barras correspondem a 10 e 1 µm, respectivamente

FIAÇÃO QUATRO

Condições:

- composição da solução polimérica: 10% PVP, 15% PEI, 75% NMP
- composição do líquido interno: 60,5% NMP; 30,7% água deionizada; 8,8% PVP
- pressão de injeção da solução polimérica: 7 kgf/cm²
- MEV: Laboratório do Setor de Caracterização Tecnológica (SCT), do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), equipamento LEICA S440

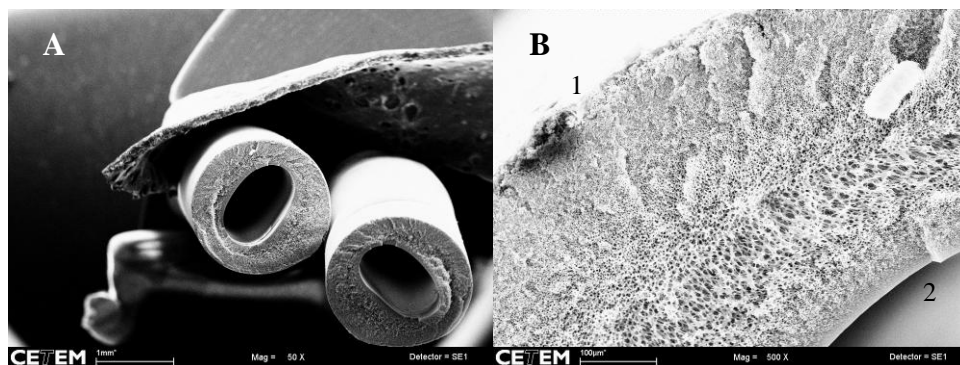


Figura IV.12 - Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F4C4 (líquido interno: 60,5% NMP/30,7% H₂O/8,8% PVP (%m/m); vazão líquido interno: 1,8 mL/min; L_{E-Ba}: 11 cm). (A) Seção transversal. (B) Ampliação da seção transversal destacando as superfícies externa (1) e interna (2), com ausência de poros na superfície interna (pele). Barras correspondem a 1000 e 100 µm, respectivamente.

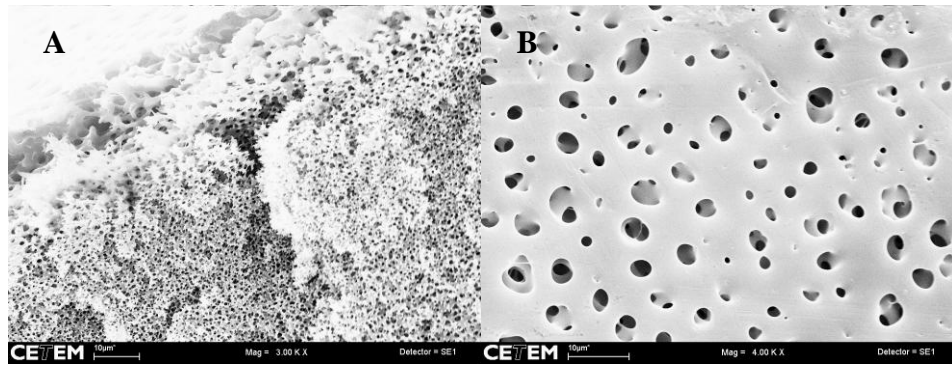


Figura IV.13 - Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 % m/m) obtida no ensaio F4C4 (líquido interno: 60,5% NMP/30,7% H₂O/8,8% PVP (%m/m); vazão líquido interno: 1,8 mL/min; L_{E-Ba}: 11 cm). (A) Ampliação da região central da espessura da membrana. (B) Superfície externa. Barras correspondem a 10 µm.

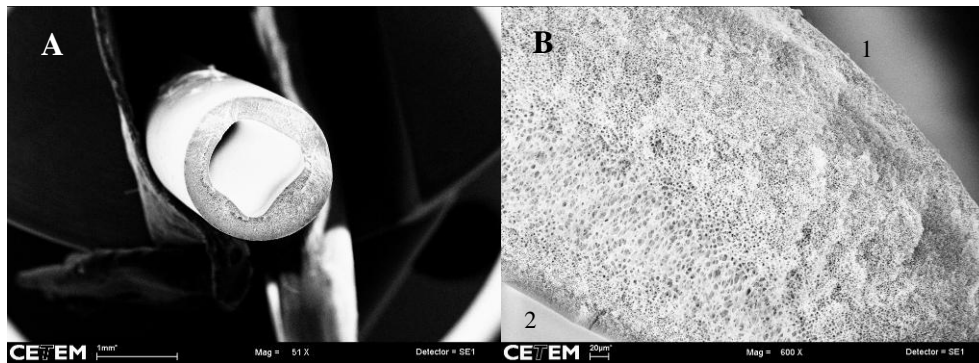


Figura IV.14 - Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 % m/m) obtida no ensaio F4C6 (líquido interno: 60,5% NMP/30,7% H₂O/8,8% PVP (%m/m); vazão líquido interno: 1,8 mL/min; L_{E-Ba}: 21 cm). (A) Seção transversal. (B) Ampliação da seção transversal destacando as superfícies externa (1) e interna (2), com ausência de poros na superfície interna. Barras correspondem a 1000 e 20 µm, respectivamente.

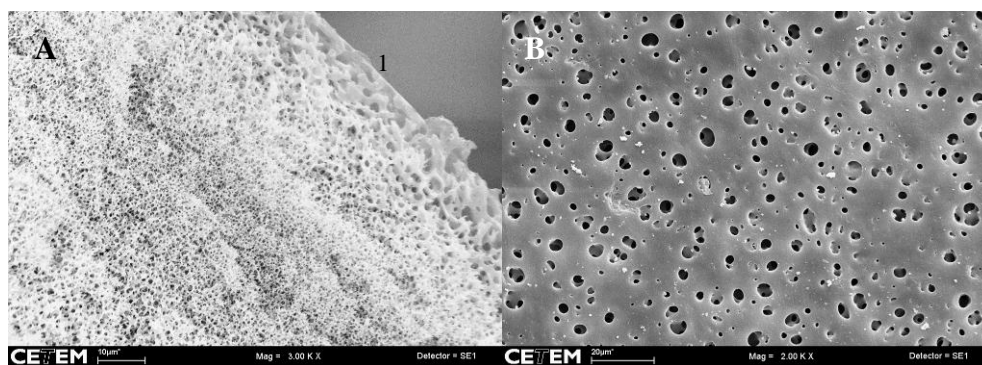


Figura IV.15 – Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 % m/m) obtida no ensaio F4C6 (líquido interno: 60,5% NMP/30,7% H₂O/8,8% PVP (%m/m); vazão líquido interno: 1,8 mL/min; L_{E-Ba}: 21 cm). (A) Ampliação da seção transversal da espessura da membrana, próxima à superfície externa. (B) Superfície externa. Barras correspondem a 10 e 20 µm, respectivamente.

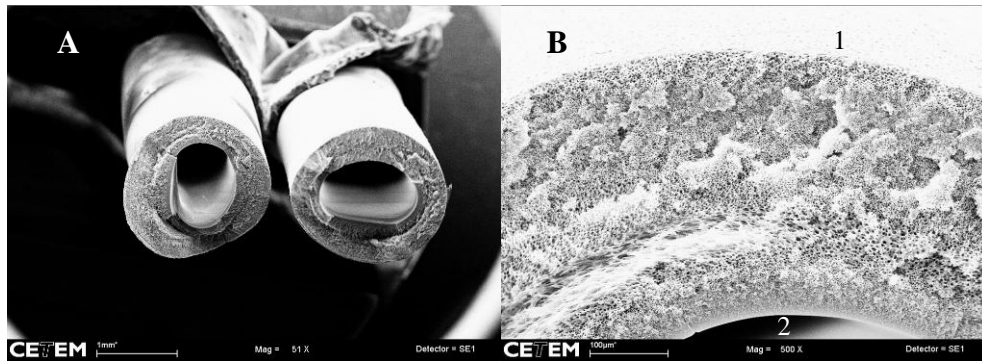


Figura IV.16 - Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F4C7 (líquido interno: 60,5% NMP/30,7% H₂O/8,8% PVP (%m/m); vazão líquido interno: 3,2 mL/min; L_{E-Ba}: 21 cm). (A) Seção transversal. (B) Ampliação da seção transversal destacando as superfícies externa (1) e interna (2), com ausência de poros na superfície interna (pele). Barras correspondem a 1000 e 100 µm, respectivamente.

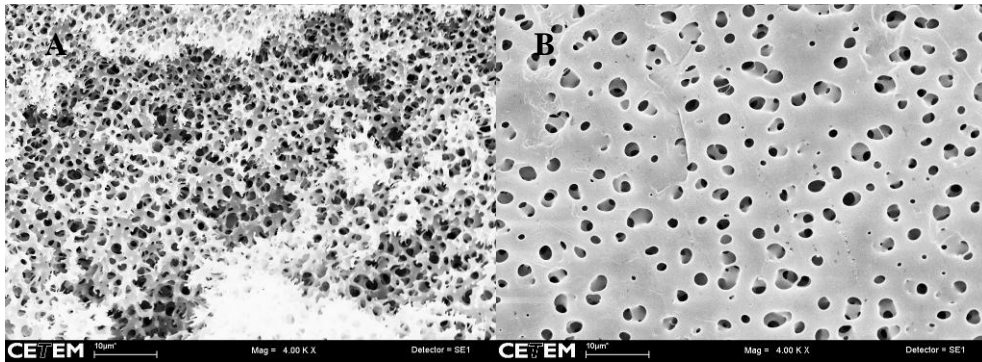


Figura IV.17 - Fotomicrografias da membrana de PEI/PVP (15/10 %m/m) obtida no ensaio F4C7 (líquido interno: 60,5% NMP/30,7% H₂O/8,8% PVP (%m/m); vazão líquido interno: 3,2 mL/min; L_{E-Ba}: 21 cm). (A) Ampliação da região central da espessura da membrana. (B) Superfície externa. Barras correspondem a 10 µm.