

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Leonardo Sarkis Jorge

**OBTENÇÃO DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO PARA  
PROTEÍNA BSA EM RESINA DE TROCA ANIÔNICA**

SÃO CARLOS -SP  
2024

Leonardo Sarkis Jorge

**OBTENÇÃO DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO PARA PROTEÍNA BSA EM RESINA DE  
TROCA ANIÔNICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Thiago Faggion de Pádua

São Carlos-SP  
2024

Jorge, Leonardo Sarkis

Obtenção de isothermas de adsorção para proteína BSA em resina de troca aniônica / Leonardo Sarkis Jorge --  
2024.

62f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Thiago Faggion de Pádua

Banca Examinadora: Adriana Paula Ferreira, Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro

Bibliografia

1. Cromatografia de troca iônica. 2. Separação de proteínas . 3. Isothermas de adsorção. I. Jorge, Leonardo Sarkis. II. Título.

Leonardo Sarkis Jorge

**OBTENÇÃO DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO PARA PROTEÍNA BSA EM RESINA DE  
TROCA ANIÔNICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Departamento de Engenharia Química da  
Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de bacharel em Engenharia  
Química.

Local: São Carlos, 22 de Janeiro de 2024

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Thiago Faggion de Pádua  
UFSCar

---

Prof. Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro  
UFSCar

---

Profa. Dra. Adriana Paula Ferreira  
UFSCar

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço a todos meus familiares que me apoiaram todos esses anos na faculdade, em especial minha mãe Carla Sarkis Jorge e meu pai Eduardo Jorge por terem sido minha base e meu suporte diário.

Agradeço, também, a todos os amigos que fiz na graduação pelos bons momentos e longa amizade.

Finalmente, agradeço a todos os professores e orientadores da UFSCar que muito me ensinaram e carregaram comigo daqui para frente parte de suas sabedorias. Em especial agradeço ao professor Thiago Faggion de Pádua por toda a mentoria desde o início da graduação até sua finalização e que me instigou a aprofundar meu conhecimento pela área de bioprocessos.

## RESUMO

Processos cromatográficos são de extrema importância para separação de proteínas e outras biomoléculas de alto valor agregado e representam grande parcela dos custos de purificação na indústria. A cromatografia por troca iônica está entre os métodos cromatográficos mais utilizados para separação de proteínas em escala preparativa. Esse tipo de cromatografia se baseia na interação de cargas positivas ou negativas presentes na fase estacionária com componentes químicos inicialmente em fase líquida. Em cada processo cromatográfico proposto, condições operacionais precisam ser avaliadas, tanto na etapa de carregamento quanto na de eluição. Vários fatores influem no processo e resolução obtida, entre os mais importantes estão as características da fase móvel, como a concentração dos componentes químicos, os agentes modificadores de fase, força iônica do meio e pH. Assim, o desenvolvimento de processos cromatográficos é elaborado, longo e custoso. Porém, a aplicação de Triagem de Alto Desempenho (TAD, *High ThroughPut*) pode contribuir acelerando o desenvolvimento e reduzindo os custos envolvidos. Com enfoque nesse objetivo, o presente trabalho avaliou um esquema com ponteiras de pipetas recheadas com resina cromatográfica de troca aniônica. Foi utilizada Q-Sepharose como resina e albumina sérica bovina (*Bovine Serum albumin*, BSA) nos ensaios. A fim de obter parâmetros que caracterizem tanto a parte de carregamento quanto a parte de eluição do processo cromatográfico, foi avaliada a influência de um modificador de fase (NaCl). Em termos experimentais, o processo de lavagem das ponteiras foi definido, permitindo a reutilização nos ensaios. Além disso, o método apresentou resultados consistentes e reprodutíveis. Os resultados experimentais indicaram que ponteiras recheadas com sólido podem ser utilizadas na definição de condições operacionais e, também seriam uma alternativa viável para obtenção de isotermas. A aplicação de tais ponteiras pode trazer benefícios em relação a quantidade de material utilizado, reduzindo custos e o tempo de obtenção desses parâmetros.

**Palavras-chave:** cromatografia, troca-iônica; proteína; separação; isoterma; adsorção

## ABSTRACT

Chromatographic processes are extremely important for protein and other biomolecules with high added value purification and represent a large portion of the production cost in the industry. Ion exchange chromatography is a widely used chromatographic method for separating proteins on a preparative scale, based on their interaction with positive or negative charges present in the stationary phase with the starting chemical components on the liquid phase. In each chromatographic process, operational conditions need to be evaluated, both in the loading and elution stages. There's a variety of factors that impacts the process and its quality. Among the most important factors are the characteristics of the mobile phase, such as the concentration of chemical components, equilibrium shifting agents, the medium ionic force and the pH. The development of chromatographic processes is dense and expensive, and the application. Thus, the work proposes the use of a scheme with pipette tips loaded with anion exchange chromatographic resin. Q-Sepharoses and BSA protein were chosen for the tests. To obtain parameters that characterize both the loading and the elution part of the chromatographic process, the influence of an equilibrium shifting agent (NaCl) was evaluated. In experimental terms the process for washing the tips was defined, allowing them to be reused in the tests. Finally, it was verified that this method presents consistent and reproducible results for obtaining these parameters, bringing benefits in relation to the amount of material used, reducing costs and the time to obtain these parameters.

**Keyword:** chromatography, ion exchange; protein; separation; isotherm; adsorption

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Parcela de participação de indústrias no mercado de cromatografia preparativa.	2
Figura 2 – Representação esquemática de um processo de cromatografia de eluição em coluna.	7
Figura 3 - a) Representação esquemática de um sistema de HPLC. b) Cromatógrafo Biotage Selekt.	8
Figura 4 - Representação esquemática de um processo de IEC para resina de troca aniônica.	10
Figura 5 – Representação dos tipos de isoterma encontrados na literatura.	13
Figura 6 - Isotermas de adsorção de diferentes modelos.	14
Figura 7 - Representação esquemática do processo de adsorção para o modelo de isoterma linear.	16
Figura 8 - Manifold – Aparato utilizado para filtração à vácuo.	21
Figura 9 - Ponteira de pipeta empacotada com 50mg de resina Q-Sepharose.	22
Figura 10 – a) Placa de 96 poços vazada para circulação de água entre os poços. b) Aparato utilizado para o ensaio de adsorção em batelada com controle de temperatura.	27
Figura 11 - a) Microplaca de leitura de absorbância com 96 poços com soluções quantificadas pelo método BCA. b) Leitor de microplacas Multiskan Skyhigh Thermo Scientific.	30
Figura 12 – Procedimentos analítico de quantificação de proteínas utilizando microplacas. A) Método de BCA. B) Método A280.	31
Figura 13 – Massa de proteína na saída das lavagens consecutivas para cada ponteira recheada.	33
Figura 14 - Balanço de massa para os ensaios de lavagem. A) Massa adsorvida e eluída na lavagem, considerando 4 lavagens sucessivas. B) Massa adsorvida e eluída na lavagem, considerando as 3 primeiras lavagens.	34
Figura 15 - Ensaio de cinética de adsorção para as ponteiras empacotadas com resina.	36
Figura 16 - Monitoramento da temperatura de um poço na placa de trabalho em banho a 20°C.	38
Figura 17 – Dados de equilíbrio de troca iônica da BSA em Q-Sepharose a 20°C.	

Resultados obtidos por ensaios com ponteira recheada com 50mg de resina. a) Todos os dados de equilíbrio retirados nos ensaios. b) Dados de equilíbrio agrupados por dia de ensaio em função do  $C_{eq}$ . c) Dados de equilíbrio agrupados por dia de ensaio em função da concentração inicial de proteína. 39

Figura 18 - Isoterma de adsorção para proteína BSA em resina Q-Sepharose a 20°C. 41

Figura 19 - Análise de sensibilidade da concentração de sal na adsorção de BSA. 42

Figura 20 – Dados de equilíbrio para troca iônica de BSA em Q-Sepharose a 20°C na presença e ausência de NaCl. 43

Figura 21 - Ajuste de parâmetros realizados via programa em Python para as isotermas obtidas experimentalmente a 20°C. 44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais tipos de classificações encontradas para processos de cromatografia.	6
Tabela 2 - Condições de operação e carga de cada fase nos processos de IEC.	11
Tabela 3 - Principais métodos de TAD para separação de proteínas.	20
Tabela 4 - Condições iniciais dos ensaios em batelada para retirada da isoterma de adsorção sem a presença de modulador de fase. Csal refere-se à concentração de NaCl adicionada ao tampão previamente preparado. Nesse caso, nenhum.	26
Tabela 5 - Parâmetros iniciais dos ensaios de batelada para adsorção com modulador de fase. Csal refere-se à concentração de NaCl adicionada ao tampão previamente preparado.	28
Tabela 6 - Condições iniciais dos ensaios em batelada para retirada da isoterma de adsorção na presença de modulador de fase. Csal refere-se à concentração de NaCl adicionada ao tampão previamente preparado.	28
Tabela 7 – Comparação entre os métodos de quantificação de proteínas utilizados nos ensaios.	31
Tabela 8 - Protocolo de lavagem das ponteiras empacotadas.	35
Tabela 9 - Parâmetros de isotermas estimados a partir dos dados experimentais.	43

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

FE	fase estacionária
FM	fase móvel
IEC	<i>ion exchange chromatography</i> / cromatografia de troca iônica
ML	<i>machine learning</i> / aprendizado de máquina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	4
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	4
3.1	CLASSIFICAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	5
3.2	EQUIPAMENTOS PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	7
3.3	CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (IEC) .....	8
	<b>3.3.1 Seleção da Fase Estacionária e Condições de Operação para IEC</b> .....	10
	<b>3.3.2 Métodos de Eluição na IEC</b> .....	11
3.4	CINÉTICA DE ADSORÇÃO.....	12
3.5	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO .....	13
	<b>3.5.1 Modelo de Isoterma de Langmuir</b> .....	15
	<b>3.5.2 Modelo de Isoterma Linear</b> .....	16
	<b>3.5.3 Métodos para Obtenção de Isotermas</b> .....	17
	3.5.3.1 Método de Batelada .....	17
	3.5.3.2 Método da Análise Frontal .....	18
3.6	TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO.....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
4.1	MATERIAIS .....	20
4.2	MONTAGEM DAS PONTEIRAS.....	21
4.3	ENSAIOS PARA DEFINIÇÃO DE PROTOCOLO DE LAVAGEM.....	22
4.4	DEFINIÇÃO DOS CICLOS PARA ADSORÇÃO EM PONTEIRA RECHEADA.....	24
4.5	CINÉTICA DE ADSORÇÃO NAS PONTEIRAS .....	24
4.6	ENSAIOS DE ADSORÇÃO EM BATELA NAS PONTEIRAS RECHEADAS .....	25
4.7	OBTENÇÃO DE PARÂMETROS DE ISOTERMA.....	28
4.8	MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	29
4.9	MÉTODO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
5.1	ENSAIOS DE LAVAGEM DA PONTEIRA EMPACOTADA.....	33
5.2	ENSAIOS DE CINÉTICA NA ADSORÇÃO EM PONTEIRAS .....	35
5.3	ENSAIOS DE ADSORÇÃO PARA OBTENÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO .....	36
5.6	ENSAIOS DE ADSORÇÃO PARA OBTENÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO NA PRESENÇA DE UM MODIFICADOR DE FASE .....	41
5.5	AJUSTE DE PARÂMETROS DE ISOTERMA.....	43
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	45
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

A cromatografia é amplamente utilizada como técnica de separação na indústria biotecnológica. Sua alta seletividade e condições operacionais brandas tornaram-na um passo essencial na purificação de macromoléculas biológicas, como as proteínas. Na fabricação de bioprodutos, a etapa de separação (ou *downstream*) se mostra como um problema na viabilidade econômica, pois representa cerca de 50% a 80% do custo total desses processos (HARRISON et al., 2015; NFOR et al., 2009).

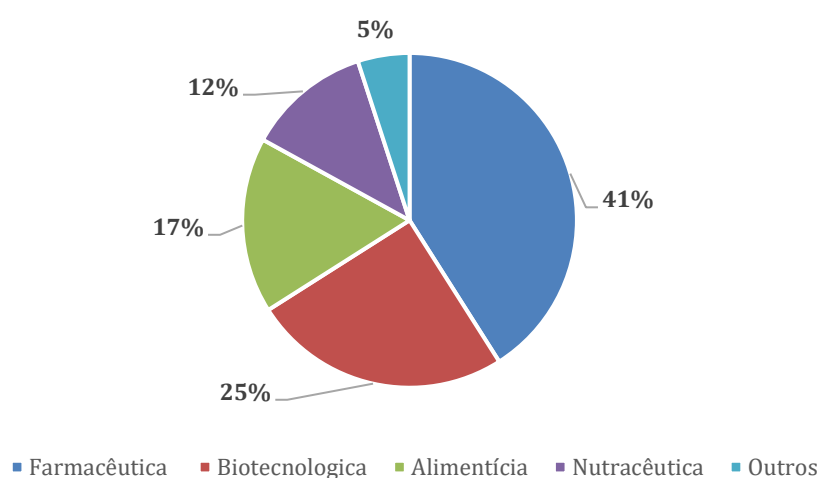
Apesar dos avanços na modelagem de processos cromatográficos, o desenvolvimento desses sistemas ainda é fortemente empírico. Esse é um fator que aumenta os custos e tempo de desenvolvimento de processos biotecnológicos, pois a definição dos parâmetros operacionais se torna um gargalo (HOUDE; BERKOWITZ, 2019). Isso se deve ao fato das interações entre biomoléculas e os materiais adsorventes serem complexas, fazendo com que o projeto de processos de separação seja muito difícil e demorado.

Existem vários tipos de métodos cromatográficos, cada qual com sua resolução e capacidade. Assim, dependendo do grau de pureza desejado, a biomolécula pode passar por várias etapas de cromatografia, geralmente iniciando de processos de maior capacidade e menor sensibilidade às condições experimentais (métodos mais robustos) e migrando para fases de polimento final com caráter cada vez mais seletivo. Quando necessários, processos cromatográficos de purificação de proteínas costumam estar envolvidos nas últimas etapas do processo de separação e representam grande parcela dos custos desses (HARRISON, 2003).

Para cada processo cromatográfico proposto, condições operacionais precisam ser definidas, tanto na etapa de carregamento quanto na de eluição. Entre os fatores mais importantes, estão as características da fase móvel como a concentração dos componentes químicos, os modificadores de fase, força iônica do meio e pH. Nesse caso, é importante destacar que o pH precisa ser estabilizado por agentes tamponantes de modo a manter a concentração das espécies carregadas, que no caso da troca iônica promoverá a interação de carga desejada com a matriz sólida (NELSON & COX, 2016). Além disso, distintos materiais sólidos podem estar disponíveis e uma etapa essencial do desenvolvimento é a triagem dos mais apropriados e custo-efetivos.

O tamanho do mercado global de cromatografia preparativa foi de USD 9,5 bilhões no ano de 2022, com estimativa de crescimento de 9.08% ao ano até 2030 (GRAND VIEW RESEARCH, 2022). Esse mercado é principalmente impulsionado pela expansão da indústria farmacêutica e biotecnológica como visto na Figura 1. Com base nos tipos de cromatografia, pode-se segmentar ainda mais o mercado, sendo a cromatografia líquida o maior representante em 2022 devido à aplicação na purificação de biomoléculas (GRAND VIEW RESEARCH, 2022).

Figura 1 - Parcela de participação de indústrias no mercado de cromatografia preparativa.



Fonte: Adaptado de Grand View Research, 2022.

Quanto ao mercado de bioprodutos, vemos um crescimento exponencial, que impactam diretamente no mercado de cromatografia. Com um valor de 586,8 bilhões de dólares em 2020 para 867,7 bilhões de dólares esperados em 2025, considerando um crescimento médio de 8,1% ao ano nesse período (BCC RESEARCH, 2021). Em 2018, estes produtos representavam aproximadamente 20% do total da indústria farmacêutica, demonstrando sua relevância no mercado (SALERNO et al., 2018).

A cromatografia por troca iônica (*Ion-Exchange Chromatography*, IEC) é provavelmente o método cromatográfico mais utilizado para separação de proteínas em escala preparativa, baseado na interação dessas com cargas positivas ou negativas presentes na fase estacionária (KASTNER, 2000). A retenção de proteínas em uma resina de troca iônica pode ser controlada pela concentração de sal na fase móvel, portanto a IEC, no seu modo clássico, utiliza um gradiente de concentração salina para eluição de diferentes componentes (JUNGBAUER, 2009).

Os processos cromatográficos podem ser otimizados de várias maneiras. No

entanto, as duas abordagens mais proeminentes baseiam-se na análise de dados estatísticos ou em modelos de simulação validados experimentalmente (SUSANTO, 2008). A otimização desses processos depende de dados de equilíbrio de adsorção que podem ser modificados por fatores como a matriz da resina, tamanho dos poros, tipo e densidade do ligante, pH, temperatura e condutividade, constituindo um problema multi paramétrico (KAWAJIRI, 2020).

Modelos estatísticos ou orientados por dados podem ser construídos sem conhecimento prévio dos mecanismos subjacentes ao processo e, portanto, são especialmente úteis em processos complexos de produção biotecnológica (WALTHER *et al.*, 2022). O uso dessas abordagens utiliza dos dados para construir modelos descritivos ou preditivos *a posteriori* por aplicação de técnicas de análise de dados, como aprendizado de máquina (ML) e análise de regressão estatística clássica (MITCHEL 1997; VIDA KOVIC 2011; SONG *et al.*, 2021).

Em contraste com modelos estatísticos, modelos de simulação baseiam-se em mecanismos físico-químicos reais. Apesar de menos utilizados, tais modelos permitem a extrapolação de processos de separação para condições fora do espaço de parâmetros testado experimentalmente (BENNER *et al.*, 2019; KUMAR e LENHOFF, 2020).

Tendo em vista esse cenário, a obtenção de dados experimentais confiáveis, especialmente dados de equilíbrio de adsorção, vem sendo objeto de estudo de diversos trabalhos. Ademais, diversas metodologias que aplicam o paralelismo e miniaturização de ensaios surgem com o propósito de ganho de velocidade e redução dos custos. A utilização de tais técnicas em conjunto e a aceleração dada pela robótica traz o nome de Triagem de Alto Desempenho (TAD, “High ThroughPut”) nesse cenário (SUSANTO, 2008).

No contexto apresentado, o presente trabalho teve o objetivo de testar a adsorção de BSA com ensaio em ponteira recheada com Q-sepharose. O sistema testado pode ser utilizado para definição de condições operacionais e triagem de resinas. Ademais, a variação de condições dos ensaios pode fornecer dados para obtenção de isotermas de adsorção, o que é útil para modelagem matemática do sistema. Espera-se que venha a ser possível acelerar e reduzir os custos para obtenção de isotermas no futuro, permitindo a aplicação da modelagem cromatográfica em paralelo ao desenvolvimento do processo.

## 2 OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi testar a metodologia para obtenção de dados de equilíbrio de adsorção utilizando ponteira carregada com resina cromatográfica, para obtenção de parâmetros da isoterma de adsorção. Assim, o tema teve foco na redução do tempo de obtenção desses parâmetros e redução dos custos de desenvolvimento de processos cromatográficos.

Para tal, definem-se os seguintes objetivos específicos:

- testar uma microplaca alterada mantida em suporte dentro da cuba de um banho termostaticado para manter a temperatura dos poços;
- propor um protocolo de lavagem para reutilização da resina;
- obter dados de cinética do processo variando o número de ciclos e verificar se foi possível obter equilíbrio com um número de ciclos que viabilizasse a aplicação;
- ao fixar o número de ciclos necessários, verificar se o método apresentava dados reprodutíveis e condizentes com o que se espera de uma isoterma favorável;
- estimar os parâmetros da isoterma de Langmuir para um par adsorvente-adsorbato.

## 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A cromatografia é uma técnica de separação baseada na distribuição dos componentes de uma mistura entre um fluido e um adsorvente. O adsorvente é chamado de fase estacionária (FE) e geralmente é um material sólido particulado e compactado em uma coluna. Já o fluido viaja sobre o adsorvente e é chamada de fase móvel (FM) (HARRISON, 2003). Geralmente, a coluna é equilibrada com contra-íons (etapa da IEC) e carregada com a mistura a ser separada. Em seguida, ocorre o processo de passagem do líquido ou do gás por uma coluna cromatográfica conhecida como a eluição. Após o processo, a coluna pode ser recuperada/reutilizada ou descartada.

Os constituintes de uma mistura apresentam diferentes afinidades com a FE e através de forças de interação com a superfície do sólido fazem com que a separação ocorra (MASEL, 1996). A FE ocasiona um retardamento seletivo nos analitos da fase móvel. Assim, cada componente da mistura apresenta uma velocidade efetiva

diferente. Em consequência dessa migração diferencial, os vários componentes tendem a se agregar em diferentes bandas ou picos (BELTER, 1998).

No equilíbrio, componentes individuais da mistura a ser separada são distribuídos entre as duas fases, de modo que não há tendência a alterar as concentrações de cada fase. Este equilíbrio pode ser modificado por manipulações termodinâmicas, como temperatura ou composição (atividade química). Concentração de sal, adição de solvente orgânico e pH são características termodinâmicas comuns da FM que podem ser modificadas facilmente (GUIOCHON, 2002). As isotermas de adsorção são curvas que representam a relação de equilíbrio entre a concentração do analito nessas fases.

Na literatura são encontrados alguns modelos de isoterma, sendo o linear e a isoterma de Langmuir os dois mais utilizados para processos de separação em fase líquida. A isoterma linear é comumente utilizada para representar cromatografias analíticas (baixas concentrações, abaixo da sobrecarga), enquanto a de Langmuir para processos preparativos, pois considera a saturação da fase estacionária (HARRISON, 2003).

Assim como na maioria dos processos de separação, os fenômenos de transporte são de extrema importância e a cinética de adsorção pode, às vezes, afetar a separação. A mistura axial também pode ser um fator importante na separação (CREMASCO, 2012).

Processos cromatográficos permitem explorar características físico-químicas das moléculas biológicas, como afinidade biológica, carga elétrica, tamanho molecular e hidrofobicidade. Existe uma variedade de resinas cromatográficas com aplicação na purificação de proteínas, como a cromatografia de troca iônica (IEC), cromatografia de afinidade, cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), entre outras (WONGCHUPHAN *et al.*, 2009, SILVA, 2004).

### 3.1 CLASSIFICAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Existem diversas maneiras de classificar uma cromatografia. Dentre elas, podemos destacar as cinco mais usuais explicitadas na Tabela 1. Em relação a finalidade a maioria das implementações de cromatografia foram desenvolvidas para propósitos analíticos e, posteriormente, esses métodos foram usados para aplicações preparativas com vários graus de sucesso (GUIOCHON, 2002).

Tabela 1 - Principais tipos de classificações encontradas para processos de cromatografia.

<b>Classificação</b>	<b>Tipos de Cromatografia</b>
Finalidade da cromatografia	Preparativa ou analítica
Forma física do sistema	Em coluna ou planar
Fase móvel utilizada	Líquida, gasosa ou supercrítica
Modo de separação	Adsorção, troca-iônica, exclusão por tamanho

Fonte: Adaptado de Arcanjo (2014).

Em relação a forma física, a fase móvel utilizada e a fase estacionária, as classificações denotam o sistema escolhido resultando em diferentes métodos cromatográficos, cada qual para uma finalidade. Para purificação de biomoléculas em escala preparativa temos a predominância da cromatografia com FM líquida e FE sólida em coluna (ARCANJO, 2014).

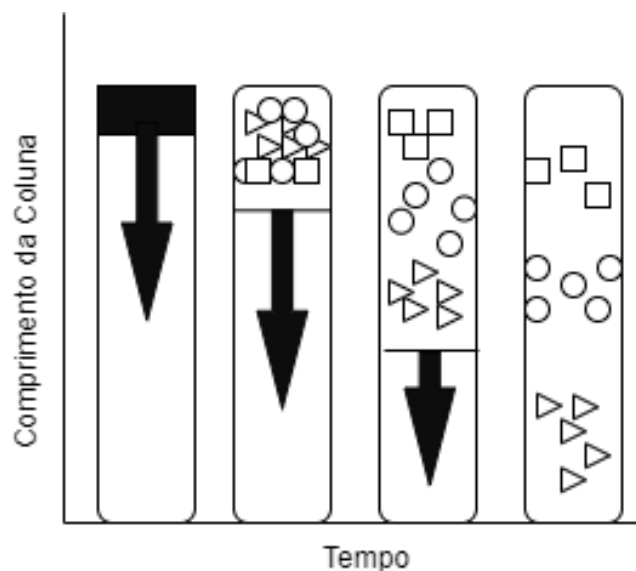
A cromatografia líquida em coluna divide-se em dois grupos: a cromatografia líquida “clássica”, feita em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, com o fluxo da FM devido à força da gravidade e a cromatografia líquida que utiliza pressões da FM elevadas. Nesse caso, o fluxo é obtido com auxílio de uma bomba e a depender da pressão recebe o nome de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), designada desta forma devido a sua elevada eficiência atingida na separação (COLLINS, 2006). A elevada perda de carga ocorre devido ao tamanho reduzido de particulado usado e o sistema em HPLC é frequentemente aplicado em sistemas analíticos.

Existem diferentes mecanismos que governam as separações de misturas. De acordo com estes mecanismos, pode-se classificar a cromatografia líquida em: cromatografia por adsorção, cromatografia por partição, cromatografia com fase ligada, cromatografia líquida quiral, cromatografia por troca iônica, cromatografia por bioafinidade e cromatografia por exclusão. Independentemente do mecanismo destacam-se três modos de operação: a cromatografia de eluição, a de análise frontal e a de deslocamento (HUANG, 1989).

No primeiro caso, uma mistura de analitos com diferentes afinidades à matriz sólida se separam ao longo de seu comprimento com a adição contínua de uma solução de eluição. No segundo caso, as impurezas são retidas na coluna enquanto o analito tem pouca ou nenhuma interação com a matriz sólida. Já no modo de deslocamento, a coluna é carregada com a solução, que então é eluída pela

introdução contínua uma substância adsorvente mais forte, conhecida como deslocador. Um exemplo de cromatografia está representado esquematicamente na Figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática de um processo de cromatografia de eluição em coluna.



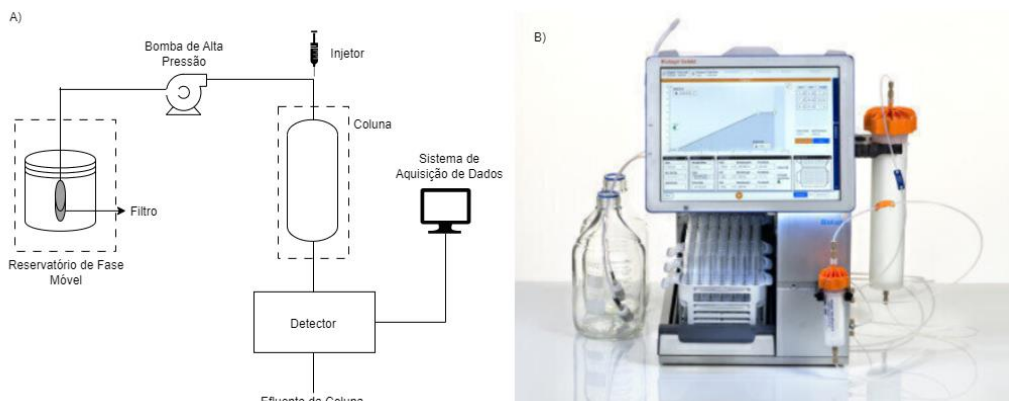
Fonte: Adaptado de Harrison (2003).

No processo, uma solução de alimentação, com diversos analitos, é introduzida na entrada de uma coluna contendo a fase estacionária. Esses analitos são separados em zonas individuais ao longo do comprimento da mesma. Os solutos são transportados pela ação de um solvente de eluição que é continuamente alimentado à coluna após a alimentação ter sido introduzida.

### 3.2 EQUIPAMENTOS PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Existe uma ampla variedade de cromatógrafos líquidos que se diferenciam pelo custo, versatilidade e complexidade (COLLINS, 1997). Contudo, a maioria dos equipamentos segue uma linha de funcionamento, representada na Figura 3 ao lado de um cromatógrafo de escala preparativa.

Figura 3 - a) Representação esquemática de um sistema de HPLC. b) Cromatógrafo Biotage Selekt.



Fonte: a) Adaptado de Collins (1997) b) Catálogo Biotage (2023).

Anteriormente a injeção da amostra, a FM é bombeada para obtenção de uma linha de base estável para posterior detecção de analitos. Uma quantidade de amostra é introduzida por meio de um injetor, sendo arrastada pela FM através da coluna. Ao sair da coluna a solução chega ao detector, que gera um sinal proporcional à concentração do soluto, enviado para um sistema de registro e tratamento de dados, produzindo um cromatograma.

### 3.3 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (IEC)

A cromatografia de troca iônica é aquela que utiliza a carga líquida dos compostos para realizar a separação. As resinas de IEC contêm grupos funcionais carregados negativa ou positivamente ligados a um suporte sólido, produzindo um trocador de cátions ou de ânions, respectivamente (ARCANJO, 2014). Os compostos com carga diferente da matriz sólida são retidos, enquanto os compostos que são neutros ou têm a mesma carga do meio passam através do volume vazio e são eluídos da coluna.

Para este tipo de adsorção sólido-líquido, as moléculas existentes na FM, migram para uma zona interfacial, por meio das forças atrativas na superfície da FE. As forças existentes nesse processo, são do tipo Van der Waals e interações eletrostáticas, sendo que as forças de Van der Waals estão envolvidas no processo de adsorção física e as eletrostáticas no processo de troca iônica. Essas só são significantes no caso de adsorventes, como as resinas de troca iônica, que possuem

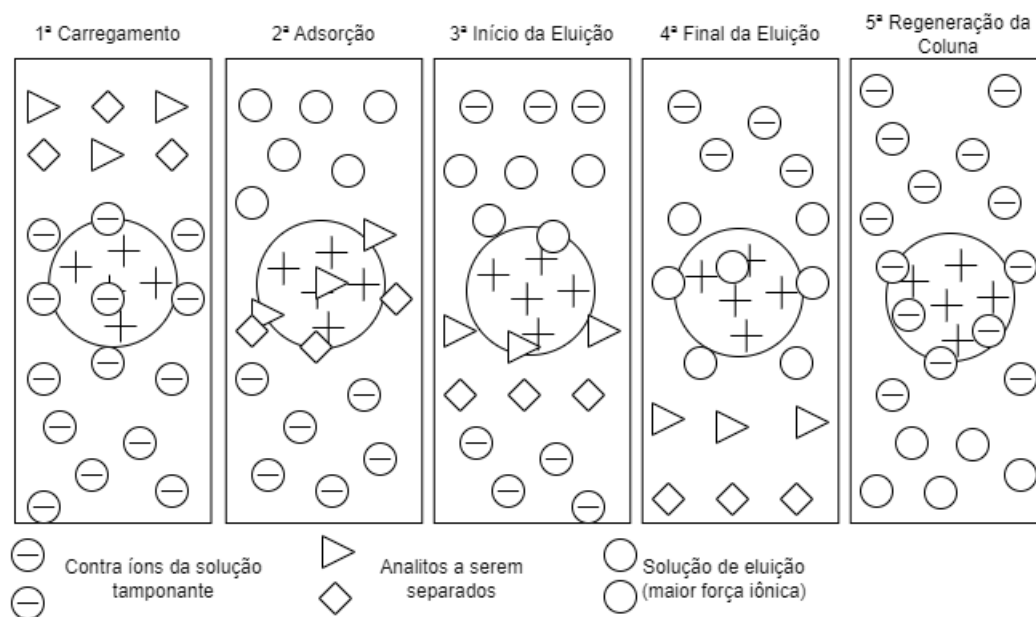
estrutura iônica (ARCANJO, 2014; RUTHVEN, 1985).

As fases móveis para cromatografia iônica costumam ser predominantemente aquosas, podendo conter um tampão para controlar e estabilizar o pH e um ou mais sais contendo contra-íons que ajustam a força do eluente e modulam a interação dos analitos com a coluna (SNYDER, 2010). A interação dos compostos carregados com a superfície é reversível e os compostos adsorvidos são comumente eluídos com um gradiente salino ou de pH.

Como dito anteriormente a IEC, no seu modo clássico, utiliza um gradiente de concentração salina para eluição de diferentes componentes (JUNGBAUER, 2009). O sal comumente utilizado é o cloreto de sódio (NaCl), mas podem ser utilizados outros sais para influenciar na separação (ALBERTINA, 2023). O tampão utilizado, pode também, afetar a separação, os íons que se ligam à proteína podem alterar seu comportamento na cromatografia de troca iônica ou competir com a mesma pelos sítios de adsorção (GE HEALTHCARE, 2010).

A Figura 4 representa o processo de IEC para resina de troca aniônica com aumento da concentração de sal para eluição. A primeira etapa desse processo é o equilíbrio da coluna, na qual são adicionados contra-íons para equilíbrio dessa. Na segunda etapa, é realizada a injeção da alimentação (etapa de carregamento), ou seja, é inserida a solução com componentes a serem separados. Em seguida, temos a eluição, onde é adicionada uma solução de maior concentração salina para favorecer a eluição de componentes químicos. Durante o processo, os componentes de interesse competem com os contra-íons pela superfície carregada da resina e a separação ocorre. Por fim, temos a etapa 5 com a regeneração da coluna.

Figura 4 - Representação esquemática de um processo de IEC para resina de troca aniônica.



Fonte: Adaptado de Yagnuma (2007).

Como essa técnica separa as proteínas com base na diferença das cargas superficiais, há uma separação de alta resolução com elevada capacidade de carga da amostra. Ademais, essa cromatografia pode utilizar vazões relativamente elevadas, pois a cinética de adsorção para a IEC é considerada rápida (GE HEALTHCARE, 2010).

### 3.3.1 Seleção da Fase Estacionária e Condições de Operação para IEC

Em relação a escolha da resina, um fator importante a ser analisado é a porosidade da mesma. Essa porosidade refere-se ao volume total de poros dentro da matriz, maior volume de poros é igual a maior porosidade. Um suporte muito poroso pode ter muitos poros pequenos ou alguns poros grandes. Assim, a resina é definida com base no tamanho do maior composto a ser purificado que deve ser capaz de entrar nos poros sob um determinado conjunto de condições (YAGNUMA, 2007).

Ademais, para compostos anfotéricos, assim como as proteínas e outras biomoléculas, o ponto isoelétrico (pI) e sua estabilidade em vários valores de pH determinam a estratégia de separação (YAGNUMA, 2007). Quando se tem um pH acima do pI, o composto de interesse terá carga negativa, inversamente, com um pH abaixo do seu pI, o composto terá carga positiva. Assim, quando o composto é estável a um pH acima do seu pI, é utilizado um suporte de troca aniônica, por exemplo. A

Tabela 2 sumariza os tipos de IEC e as cargas em cada fase.

Tabela 2 - Condições de operação e carga de cada fase nos processos de IEC.

<b>Tipo de Suporte</b>	Troca Catiônica	Troca Aniônica
<b>Carga do Analito</b>	Positiva	Negativa
<b>Carga da FE</b>	Negativa	Positiva
<b>Condições de Operação</b>	Operar entre 0,5-1,5 unidades de pH abaixo do pl de interesse	Operar entre 0,5-1,5 unidades de pH abaixo do pl de interesse

Fonte: Adaptado de Bio-Rad Laboratories (2023).

Colunas de troca iônica com grupos que permanecem completamente ionizados em toda a faixa de pH utilizada, como grupos sulfônicos para cátions e aminas quaternárias para ânions, são trocadores de íons fortes. Trocadores de íons fracos contêm grupos com pKa intermediário (entre 4 e 10), como grupos carboxílicos para cátions e aminas terciárias ou menos substituídas para ânions, de forma que a ionização dos grupos e a capacidade de troca iônica da coluna varia com o pH da FM (HALL, 1993).

### 3.3.2 Métodos de Eluição na IEC.

Depois da escolha de uma coluna apropriada (fase estacionária, dimensões e tipo da coluna) e sistema eluente (solventes orgânicos e modificadores de fase), a próxima etapa importante no desenvolvimento de métodos cromatográficos é a escolha do modo de eluição. Dois modos básicos de eluição podem ser aplicados: o primeiro é chamado de eluição isocrática e o segundo eluição em gradiente (SCHELLINGER, 2006).

Para a eluição isocrática, a FM, seja um solvente puro ou uma mistura, permanece a mesma durante todo o processo. Já para eluição de gradiente, como seu nome indica, a composição da FM muda durante a separação. Esse modo é útil para separação de misturas que contenham compostos abrangendo uma ampla faixa de polaridade cromatográfica. No início do gradiente, quando a força do solvente é baixa, o analito fica retido na FE. À medida que a força do solvente aumenta, o analito é transferido para a fase móvel, percorre toda a coluna e, finalmente, é eluído.

A eluição isocrática, apesar de ser um modo mais simples de operação, pode não ser apropriada para todas as separações. Há problemas inerentes a esse método, incluindo resolução do processo, diminuição da sensibilidade devido a alargamento de picos e problemas com a contaminação da coluna devido ao acúmulo de compostos fortemente retidos encarecendo o processo com etapas de regeneração da colina (SCHELLINGER, 2006).

Nesse caso, é possível que o tempo de operação para obter resolução para algumas soluções seja inviável, inclusive ampliando demais o consumo de fase móvel. Já o processo de gradiente pode tornar a separação viável, tornando a resolução adequada e tempo de processo apropriado. Em contrapartida, a adequação do gradiente para o processo cromatográfico em desenvolvimento certamente amplia o tempo e custos de desenvolvimento.

O processo de eluição com aumento da concentração salina é o mais comum em IEC (ALBERTINA, 2023). Isso ocorre devido à facilidade de deslocamento das moléculas que estão ligadas a FE por um íon trocador. Os contra-íons do sal deslocam competitivamente os adsorbatos na FE. Íons menores e mais carregados são mais eficazes nesse processo, por isso o cloreto de sódio é um sal comumente utilizado para esse método (CUNICO, 1998). Contudo existem outros gradientes, menos usuais, que podem ser utilizados como, por exemplo, o de pH (AHAMED, 2007).

### 3.4 CINÉTICA DE ADSORÇÃO

A adsorção é o fenômeno de superfície no qual a espécie que se acumula na interface do material é normalmente denominada de adsorbato, e a superfície sólida é chamada de adsorvente (RUTHVEN, 1984). Efetivamente, a adsorção é uma operação em modo contínuo ou descontínuo utilizando adsorventes porosos (TAN; HAMEED, 2017). Como uma operação unitária, a cromatografia é uma versão especializada de separação baseada em adsorção.

As cinéticas são importantes para verificar o tempo necessário até o sistema atingir o equilíbrio de adsorção, ou seja, até o momento em que não haja mais transferência de massa entre as fases. A cinética de adsorção descreve a taxa de transferência de um componente da FM, sendo dependente de suas características físicas e químicas, assim como das características do adsorvente e do sistema

experimental (RUTHVEN, 1984).

Em princípio, essa cinética pode ser regida por diferentes etapas. Têm-se a transferência de moléculas da FM através do filme líquido externo à FE, a difusão de moléculas da FM para o interior dos poros (difusão de poro, intrapartícula) e a difusão de moléculas adsorvidas ao longo da superfície dos poros (difusão de superfície) (FEBRIANTO *et al.* 2009).

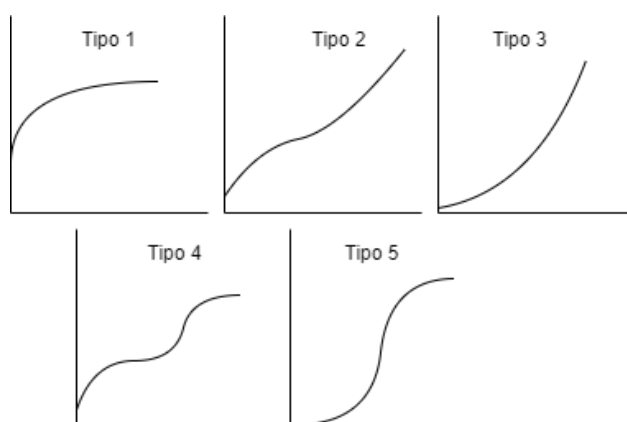
Em vários sistemas de cromatografia, a cinética é muito rápida e as fases podem ser assumidas como estando em equilíbrio a nível de modelagem de fenômenos (FEBRIANTO *et al.* 2009). A quantidade real de “desequilíbrio” adiciona alguma dispersão às zonas de soluto, nesse caso, uma dispersão aparente na coluna, responsável pelo espalhamento (ou alargamento) de pico.

### 3.5 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

As isotermas de adsorção são funções que descrevem a relação entre as concentrações em equilíbrio na FM e FE em uma temperatura constante. Vários modelos de isotermas de adsorção estão disponíveis para descrever sistemas mono e multicomponentes. Cada modelo consiste em uma série de parâmetros, que caracterizam o processo para os diferentes componentes (FORNSTEDT, 2013).

Os fundamentos termodinâmicos para as isotermas de equilíbrio gás-sólido se encontram bem desenvolvidos. Essencialmente são cinco classes baseadas na forma da isoterma (Figura 5).

Figura 5 – Representação dos tipos de isoterma encontrados na literatura.

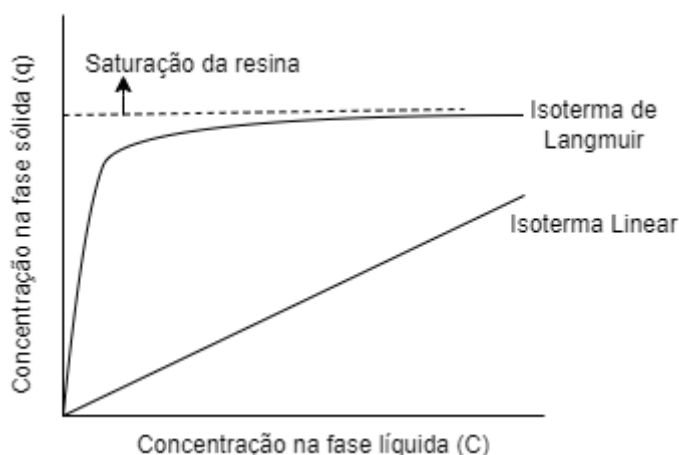


Fonte: Adaptado de Guiochon (2006).

Isotermas do tipo I são as mais comuns (Guiochon et al., 2006), correspondem a um trecho de aproximação linear em baixas concentrações e estabilização em altas, representando processo de saturação. As isotermas dos tipos II e III possuem assíntota vertical, correspondente à pressão de vapor da fase gasosa nas condições de poro. Deste modo, o comportamento é explicado pela condensação capilar. As isotermas do tipo IV e V indicam a existência de poros pequenos, que ficam preenchidos após a formação de múltiplas camadas de adsorção.

Dentre os modelos de isoterma do tipo I, pode-se destacar a de Langmuir para aplicações em cromatografia líquida. As isotermas lineares também são muito utilizadas nesse processo e ambas estão ilustradas na Figura 6. Guiochon et al. (2006) destacou o papel relevante desses modelos para o equilíbrio em casos de adsorbatos polares em adsorventes polares e que tem sido assim adequada para ajuste de dados experimentais de proteínas em adsorventes para troca iônica.

Figura 6 - Isotermas de adsorção de diferentes modelos.



Fonte: Adaptado de Guichon (2006).

Para gases, frequentemente a proporção de componentes na FM é expressa pela pressão parcial, já que a mesma possui uma relação direta com a fração molar e pressão total em misturas de gases ideais. Para líquidos, a concentração é geralmente fornecida em unidades de massa por volume (ZHAO et al., 2013). A concentração do adsorbato no sólido é expressa como massa adsorvida por unidade de massa do adsorvente ou em vários casos em base volumétrica: massa adsorvida por volume de esqueleto sólido.

A maior parte do conhecimento sobre o equilíbrio líquido-sólido permanece sendo de ordem empírica, devido à complexidade do fenômeno (Guiochon *et al.*, 2006). Vale destacar que a adsorção líquido-sólido é em princípio sempre competitiva, uma vez que o adsorbato precisa competir pelo menos com o próprio solvente por acesso à superfície (Guiochon *et al.*, 2006).

Características da natureza do sólido, como área específica (ou quando presentes de modo claro, sítios de ligação) e distribuição dos poros, e da natureza do adsorbato, como dipolos, forma e tamanho são determinantes para o equilíbrio (MASEL, 1996). Em situações de competição, a adsorção de um componente entre as fases não depende apenas da concentração local do componente em si, mas também de todos os outros componentes (WANG, 2020).

### 3.5.1 Modelo de Isoterma de Langmuir

Segundo Nascimento *et al.* (2014) a isoterma de Langmuir é uma das equações mais utilizadas para a representação do processo de adsorção. Foi proposta por Langmuir em 1918. Esse modelo parte da consideração que a adsorção é como uma reação reversível (Equação 1).



Na qual C é a concentração de uma espécie química e S a concentração de sítios ativos e CS é a ligação adsorvente/adsorbato. Dessa maneira, pode-se escrever a constante de equilíbrio da reação como uma função dessas concentrações (Equação 2).

$$b = \frac{[CS]}{[C][S]} \quad (2)$$

O coeficiente b (L.g<sup>-1</sup>) muda para cada par de adsorvente/adsorbato.

Esse modelo leva em conta outras duas simplificações. A primeira, considerar a adsorção como completamente reversível, e que a interação do componente químico com a matriz sólida não causa nenhuma alteração na solução. E a segunda, considerar a adsorção como "específica", ou seja, durante o processo ocorre uma ligação um para um nos sítios de adsorção, não havendo outra interação entre as moléculas e a superfície (HARRISON, 2003).

O modelo de Langmuir é expresso pela Equação 3.

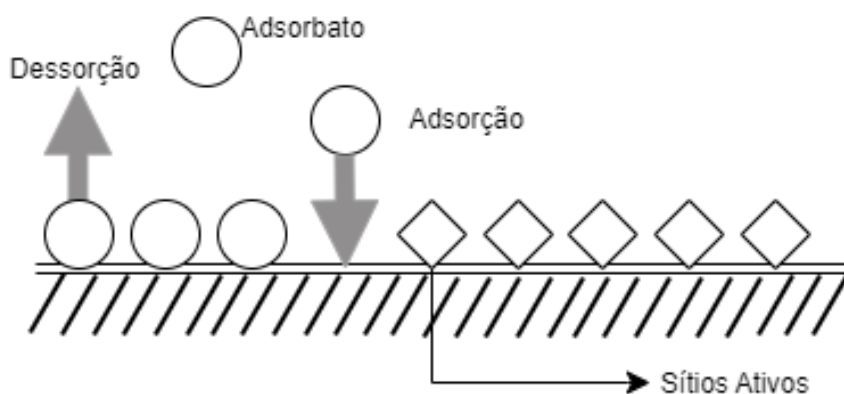
$$q = \frac{q_{max}bC_e}{1+bC_e} \quad (3)$$

Na qual,  $q$  ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) é a quantidade adsorvida e  $C_e$  ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) a concentração de em equilíbrio de adsorbato. O coeficiente  $b$  ( $\text{mL.mg}^{-1}$ ) representa a constante de equilíbrio, que muda para cada par de adsorvente/adsorbato e o  $q_{max}$  ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) é a capacidade máxima de adsorção na monocamada.

Por levar em consideração a saturação da matriz sólida, o modelo proposto por Langmuir se aplica melhor a cromatografias preparativas (HARRISON, 2003). Na cromatografia preparativa, onde as concentrações são mais altas, a curvatura e a capacidade de saturação das isotermas de adsorção são parâmetros importantes para modelagem do sistema cromatográfico como um todo (FORNSTEDT, 2013).

Na Figura 7, tem-se uma representação de um processo de adsorção “específica”. Nessa, observa-se que o processo é em monocamada, ou seja, não há sobreposição do adsorbato e cada sítio ativo pode comportar apenas uma molécula adsorvida.

Figura 7 - Representação esquemática do processo de adsorção para o modelo de isoterma linear.



Fonte: Adaptado de Wang (2020).

### 3.5.2 Modelo de Isoterma Linear

A isoterma Linear se baseia na mesma proposta da isoterma de Langmuir, portanto, as simplificações explicadas na seção 3.4.1 (soluções ideais e adsorção “específica”) também se aplicam a esse modelo. O modelo linear parte do pressuposto que a concentração de sítios ativos de adsorção é muito maior do que a concentração de espécies químicas em solução. Assim, o modelo linear, também conhecido como lei de Henry (WANG, 2020), pode ser expresso pela Equação 4.

$$q = aC_e \quad (4)$$

Onde  $q$  (mg. g<sup>-1</sup>) é a quantidade de um componente químico na FE e  $C_e$  (mg. L<sup>-1</sup>) a concentração de equilíbrio na FM desse mesmo componente.

No limite onde o valor de  $b.C_e$  (Equação 3) é pequeno em comparação com um, o denominador da Equação 3 tende a um. Assim, é possível agrupar os parâmetros  $q_{max}b$  do nominador em uma única constante “a” e a forma da adsorção linear é recuperada (Equação 4). Portanto, o modelo considera que essa adsorção é descrita por um único valor constante, a constante da lei de Henry (HARRISON, 2003).

Na cromatografia analítica, as concentrações das amostras são baixas fazendo com que o modelo linear descreva bem o processo, uma vez que, as isotermas de adsorção correspondentes são lineares nesta faixa de concentração (FORNSTEDT, 2013). Esse modelo enfatiza a diferença na constante de equilíbrio  $b$  entre as moléculas para separá-las, contudo quando falamos de moléculas similares essa constante pode ser muito parecida o que dificulta a aplicação desse modelo para um processo preparativo.

### 3.5.3 Métodos para Obtenção de Isotermas

Existem vários métodos para determinar isotermas de adsorção e pode-se dividir esses métodos em duas classes. Os métodos estáticos de medição e os dinâmicos. Os primeiros são aqueles que não analisam curvas de concentração no tempo, utilizados apenas as informações do estado de equilíbrio. Já os métodos dinâmicos, por sua vez, são realizados em colunas de cromatografia e baseiam-se na análise matemática das curvas de resposta correspondentes a alterações bem definidas das concentrações de entrada em uma coluna (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

#### 3.5.3.1 Método de Batelada

O método de batelada representa os métodos estáticos. Nesse método, volumes ou massas conhecidas de adsorventes,  $V_{ads}$  ou  $M_{ads}$ , são equilibrados em um recipiente fechado com uma solução de volume e concentração conhecida do soluto,  $V_{init}$  e  $c^{init}$ . O balanço de massa em função da massa de adsorvente para um soluto está descrito na Equação 5.

$$V^{init} C_i^{init} = V^{init} C_i(t) + M_{ads} q_i(t) \quad i = 1, \dots, N \quad (5)$$

Onde  $i$  representa o soluto. Para determinar as isotermas, apenas as concentrações de equilíbrio precisam ser mensuradas, ou seja,  $C_i^{eq} = C_i(t \rightarrow \infty)$  e  $q_i^{eq} = q_i(t \rightarrow \infty)$ . Na prática, não temos acesso ao  $q_i^{eq}$

Para estimar os parâmetros de isotermas, vários experimentos precisam ser realizados. Os fatores que podem ser variados são as concentrações iniciais de soluto, a quantidade de adsorvente e o volume de líquido na batelada. Estes parâmetros devem ser escolhidos cuidadosamente para cobrir uma ampla região das isotermas (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

Segundo Fornstedt (2013) o método de batelada requer uma quantidade significativa de trabalho repetitivo e geralmente não é muito preciso. As dificuldades estão relacionadas à determinação necessária da quantidade de adsorvente e à incerteza em relação ao tempo requerido para alcançar o estado de equilíbrio.

### 3.5.3.2 Método da Análise Frontal

Considerando os métodos dinâmicos, o de análise frontal é conhecido como o método de referência devido a sua acurácia para estimação de parâmetros em sistemas monocomponentes (FORNSTEDT, 2013). Nesse, geralmente são realizadas uma série de pulsos de concentração. Como a teoria do equilíbrio fornece uma ferramenta para prever características dos cromatogramas (concentração de platô e tempos de retenção) com estes dados determinados experimentalmente pode-se realizar o caminho inverso.

Os dados de isoterma para um sistema de um único componente são calculados integrando o balanço de massa para esses pulsos (Equação 6).

$$q = C^{eq} \frac{V_R - V_0}{V_s} \quad (6)$$

Na qual, o  $V_R$  é o volume no qual o cromatograma tem seu pico (*Breakthrough*) e  $V_0$  e  $V_s$  são os volumes parciais de fase móvel e estacionária, respectivamente.

Esse método, pode ser usado para qualquer tipo de isoterma de adsorção e não é afetado por efeitos de cinética lenta, sendo, portanto, considerado um método mais preciso para determinação de isotermas de adsorção. Contudo, a análise frontal consome uma grande quantidade de fase móvel e soluto puro sendo um método muito caro (FORNSTEDT, 2013).

### 3.6 TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO

Nos últimos anos, muitas indústrias adotaram o conceito de triagem de alto desempenho (TAD) para apoiar a necessidade cada vez maior de uma geração de dados mais rápida e de aceleração dos ciclos de desenvolvimento de produtos (VERVOORT, 2021). Na indústria de bioprodutos, a TAD tem sido adotada em diversas áreas, como uma ferramenta para acelerar a caracterização de novos compostos farmacêuticos, no desenvolvimento de processos químicos de pequenas moléculas e na escolha do método analítico (KRESGE, 2020).

A TAD exige técnicas analíticas igualmente rápidas, capazes de gerar dados analíticos com precisão em consonância com o aumento da taxa de experimentação. Para a maioria das técnicas analíticas, existe uma relação entre a velocidade com que os dados podem ser gerados e a qualidade dos mesmos, sendo necessário encontrar o equilíbrio certo entre estes dois aspectos (VERVOORT, 2021). Ademais, por conta da volumetria de experimentos que se prevê com essas técnicas projetos de ensaio compatíveis com automação, manuseio de amostras assistido por robótica e processamento automatizado de dados são essenciais.

Existem diversas técnicas de TAD recentemente desenvolvidas para purificação de proteína que utilizam equipamentos comerciais e consumíveis de cromatografia, podendo ser proibitivamente caras (MATTE, 2020). Também pode haver um problema no que diz respeito à disponibilidade de pessoal treinado para desenvolver e executar alguns desses fluxos de trabalho de purificação. Uma abordagem relativamente simples consiste em purificação baseada em batelada, um método que pode ser facilmente paralelizado com investimento mínimo em materiais (MATTE, 2020).

Ao longo de várias décadas, as técnicas de purificação de proteína em microescala foram divididas em quatro abordagens básicas descritas na Tabela 3. Contudo todas baseiam-se no mesmo princípio: alvos proteicos com diferentes afinidades a uma outra fase são misturados para incentivar a vinculação específica (KATES, 2020).

Tabela 3 - Principais métodos de TAD para separação de proteínas.

<b>Método</b>	<b>Descrição</b>
Extração em Batelada	Resina não empacotada é misturada com uma solução proteica
“Spin Column”	Solução proteica é adicionada a uma coluna com resina que então é centrifugada para separação das fases.
Esferas magnéticas	A proteína liga-se a esferas funcionalizadas e as propriedades magnéticas permitem fácil separação
Extração em pipetas de leito fixo	Resina comprimida entre duas membranas em uma ponteira, imitando uma coluna cromatográfica, fase móvel introduzida por pipetagem

Fonte: Adaptado de Kates, 2020.

Essas tecnologias variam em suas mecânicas de processamento, equipamentos necessários, investimento e qualificação do operador.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão descritos os procedimentos experimentais para a obtenção das isotermas de adsorção utilizando as ponteiras de pipetas recheadas com a matriz sólida. Serão detalhados os equipamentos e os materiais utilizados para tais experimentos. Ademais, serão mencionados os métodos quantitativos e estatísticos aplicados em todos os ensaios do trabalho.

### 4.1 MATERIAIS

- Resina Q-Sepharose™ High Performance, Sigma Aldrich
- Albumina sérica bovina (BSA), ≥96% de pureza, Sigma Aldrich
- PIPES, ≥99% (titration), Sigma Aldrich
- Cloreto de sódio, ACS reagente, ≥99.0%, Sigma Aldrich
- BCA Kit de quantificação de proteína, Sigma Aldrich

Outros insumos utilizados foram de grau analítico. Água destilada, ou tipo I foi

utilizada nos procedimentos e preparação.

#### 4.2 MONTAGEM DAS PONTEIRAS

Na montagem das ponteiras utilizou-se a resina Q-Sepharose (matriz de troca aniônica). Primeiramente, preparou-se uma suspensão de resina em água (100mg/mL). Para tal, foi pipetado um volume de Q-Sepharose em uma seringa com um filtro polimérico na ponta e filtrou-se a solução durante 5 minutos em um sistema à vácuo. Utilizou-se pressão manométrica de aproximadamente -0,5atm em sistema tipo *manifold* (Figura 8). No sistema utilizou-se a bomba de vácuo da Fisherbrand™ 230 V, 50/60 Hz, conectada ao *manifold* contendo 10 adaptadores para ponteiras com válvulas de nylon permitindo a passagem ou não do ar. Após a filtração, pesou-se 400 mg da resina em um frasco e foram adicionados 3,43mL de água destilada. Considerou-se nesse processo que a densidade aparente do material era de aproximadamente 0,7g/mL.

Figura 8 - Manifold – Aparato utilizado para filtração à vácuo.



Fonte: Acervo Pessoal, 2023.

Em seguida, adicionou-se a uma ponteira de pipeta de 1mL vazia um filtro polimérico sintético (retentor ou *'frits'*), garantindo que o mesmo ficasse reto e estivesse encaixado na sua ponta. A ponteira era então pesada. Para manipular volumes da suspensão de Q-sepharose, era necessário utilizar uma ponteira (de total de 1mL) cortada próximo ao bico. Assim, a entrada-saída da suspensão na ponteira

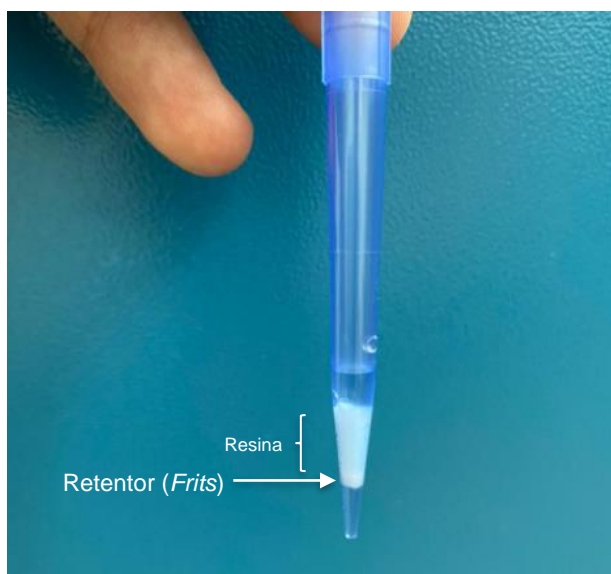
era realizada por um diâmetro maior do que o de fábrica, o que era necessário para evitar entupimento. Com o auxílio de uma pipeta com uma ponteira cortada na ponta, adicionou-se o volume da suspensão de resina correspondente à massa desejada na ponteira com o retentor:

$$m_s = \rho V \quad (7)$$

, em que  $\rho$  se refere a densidade da suspensão preparada (100mg/mL),  $V$  ao volume pipetado e  $m_s$  a massa de suspensão. Como a massa utilizada nos ensaios desse trabalho era de 50mg, o volume pipetado foi de 0,5mL.

As ponteiras empacotadas (Figura 9) foram filtradas no *manifold* por 5 minutos e pesadas para aferição da massa. Assim, era possível averiguar se a massa de resina (carga) se aproximava do objetivo ou destinar ao descarte as ponteiras com desvios maiores que 2% em massa do valor nominal (fixa em 50mg para as atividades desse trabalho). Para armazenamento em geladeira, adicionou-se as ponteiras 0,5mL de uma solução de etanol 20% (v/v). Antes da utilização, as ponteiras eram dez vezes lavadas com 1 mL de água em *manifold*.

Figura 9 - Ponteira de pipeta empacotada com 50mg de resina Q-Sepharose.



Fonte: Acervo Pessoal, 2023.

#### 4.3 ENSAIOS PARA DEFINIÇÃO DE PROTOCOLO DE LAVAGEM

Para os ensaios de lavagem utilizou-se a proteína BSA (*Bovine Serum Albumine*, >97%), PIPES (PIPES, ≥99%) para efeito tamponante e o cloreto de sódio

(NaCl) como sal (aumento de força iônica). A fim de garantir um protocolo de lavagem retirasse toda a proteína capturada na resina, foram realizados ensaios de adsorção com coletas sucessivas da solução de lavagem.

Para tal, foram utilizadas as ponteiros empacotadas de resina e preparou-se uma solução de BSA 10g/L em tampão PIPES 25mmol/L (pH = 6.1). A lavagem era realizada com uma solução preparada previamente de NaCl 1mol/L em tampão PIPES 25mmol/L (pH = 6.1), denominada de solução de lavagem. Nesse aspecto, é importante destacar que a condição de lavagem já havia sido testada para precipitação de BSA e corpo de fundo não foi identificado. Assim, foi possível utilizá-la sem riscos de precipitação. Em seguida, pipetou-se com a ponteira empacotada 1mL da solução com proteína, deixando essa em contato com a resina por 10 minutos para garantir que houvesse adsorção no sistema.

A ponteira a ser lavada era conectada ao *manifold* sob vácuo, em seguida cada etapa de lavagem era realizada ao inserir um volume pré-determinado com micropipeta pelo topo da ponteira recheada. Realizou-se 6 lavagens sucessivas com a ponteira sendo filtrada à vácuo no *manifold*. A primeira lavagem com 1 mL e as outras com 0,5mL de solução de lavagem. A primeira lavagem sendo feita com volume maior para garantir que toda resina depositada ao longo do corpo da ponteira fosse transferida para ponta da mesma. A cada etapa de lavagem, a válvula do *manifold* onde estava a ponteira era fechada, a ponteira era removida e inserida na válvula ao lado. Embaixo de cada válvula, em um suporte de tubos, havia um tubo de ensaio. Assim, ao realizar cada etapa de lavagem em bicos sucessivos do *manifold*, era possível coletar cada volume de lavagem separado. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

As amostras coletadas em tubo de ensaio eram então levadas para análise quantitativa (seção 4.9). Com auxílio das Equações 8 (balanço de massa na adsorção) e 9 (balanço de massa na lavagem), verificou-se a quantidade de proteína adsorvida e eluída para comparação.

$$M_{ads} = C_0V_0 - C_fV_f \quad (8)$$

$$M_{ads} = \sum_{i=1}^N C_{l,i}V_{l,i} , \quad i = 1, \dots, N \quad (9)$$

, em que  $C_0$  representa a concentração inicial de BSA,  $V_0$  o volume inicial de solução líquida,  $C_f$  a concentração após a adsorção e  $V_f$  o volume correspondente. O índice  $i$  corresponde ao número da lavagem.

Ademais, propôs-se um protocolo de lavagem que primeiramente retirasse toda a proteína retida na resina (lavagens sucessivas com solução salina). Em seguida, retirasse a concentração de sal do meio (lavagens com água destilada) e, por último, equilibrasse a ponteira para um novo ensaio de adsorção (1 mL de solução tampão sem proteína na mesma condição da adsorção a ser realizada).

#### 4.4 DEFINIÇÃO DOS CICLOS PARA ADSORÇÃO EM PONTEIRA RECHEADA

Maiores detalhes sobre o ensaio com temperatura controlada serão dados adiante. Porém, é necessário entender a definição de ciclo para continuar as discussões.

Em ensaios de adsorção, a ponteira recheada era conectada a uma micropipeta (de 200 $\mu$ L a 1000 $\mu$ L). Utilizou-se microplaca de 12 x 8 poços totais, que suportava cerca de 2mL por poço. Os ensaios eram em batelada com 700 $\mu$ L de solução de BSA nas condições de trabalho disposta em cada poço da microplaca (denominada *placa de trabalho*). A solução de BSA não era distribuída em todos os poços logo no início do ensaio para evitar a evaporação. Ao invés disso, ela era inserida com micropipeta a cada três ou cinco poços. Além disso, os poços eram selados com fita adesiva até iniciar os ciclos. Para iniciar o ensaio, o poço era descoberto. Cada ensaio consistia em aspirar 600 $\mu$ L do poço e depois retornar o volume para o mesmo poço sucessivas vezes. Cada sequência de aspiração e retorno da amostra ao poço foi chamada de ciclo. O retorno da porção de amostra aspirada era útil para promover agitação e mistura. O mesmo procedimento era utilizado em vários poços para variar condições operacionais (condição de trabalho distinta, variando força iônica, por exemplo) ou obter réplicas.

#### 4.5 CINÉTICA DE ADSORÇÃO NAS PONTEIRAS

Foram realizados ensaios de cinética para definição da quantidade de ciclos necessários para o equilíbrio. Nesse aspecto, é importante destacar que o equilíbrio foi considerado como tendo sido atingido a partir do momento que a concentração adsorvida na resina não mais variava com o número de ciclos.

Para tal, preparou-se uma solução de BSA 10g/L em tampão PIPES 25mmol/L (pH = 6.1). Em uma placa de 96 poços preencheu-se os poços necessários para o ensaio com 700 $\mu$ L da solução proteica e pipetou-se 600 $\mu$ L no esquema já explicado

de ciclos. O número de ciclos variou entre 1 e 30 entre poços distintos, assim, foi possível obter dados para construção de uma curva cinética. Naturalmente, poços para ensaios em réplica utilizavam o mesmo número de ciclos. Após adsorção, as soluções nos poços foram quantificadas e definiu-se a menor quantidade de ciclos necessários para obtenção do estado de equilíbrio, ou seja, para que não houvesse mais variação na quantidade de proteína adsorvida no sólido (Equação 8).

#### 4.6 ENSAIOS DE ADSORÇÃO EM BATELA NAS PONTEIRAS RECHEADAS

Para a obtenção de uma isoterma de adsorção, foram realizados ensaios de batelada com as ponteiras de resina Q-Sepharose (50mg). Para tal, preparou-se soluções com diferentes concentrações iniciais de proteína BSA em tampão PIPES 25mmol/L descritas na Tabela 4. As várias concentrações tinham o objetivo de obter resultados experimentais para troca iônica em baixa e alta carga de proteína, mapeando a região linear e de saturação da isoterma de Langmuir. Todos os ensaios foram realizados em triplicata utilizando duas ponteiras.

Sabendo que o ponto isoelétrico da BSA é em torno de 4,7 a 5,6 (FERREIRA, 2009), para todos os ensaios, utilizou-se uma solução tamponante com sal de PIPES 25mmol/L em pH = 6.1. Dessa maneira, foi possível manter a carga líquida da proteína BSA em solução negativa, permitindo a troca com a resina

Várias ponteiras foram utilizadas, até mesmo para obter réplicas de ensaio. A necessidade de variar as ponteiras surgia para acelerar a obtenção de dados e por que depois de certo número de ensaios a ponteira poderia apresentar muita perda de carga, dificultando os ensaios. Possivelmente, o aumento de perda de carga ocorria por incrustação no retentor. Apesar de não ter sido realizada uma análise e acompanhamento rigoroso, estima-se que uma ponteira tenha se mantido funcional por pelo menos de 120 a 140 ciclos.

De modo a garantir a reprodução de resultados, sempre que uma nova ponteira entrava em uso, ela era utilizada em três réplicas de ensaio com tampão de trabalho (sem adição de sal extra) e concentração de BSA de 8 g/L e número de ciclos adequado. Os resultados eram comparados a 95% de probabilidade com distribuição t-student com a média e intervalo dos resultados anteriores. Nenhuma ponteira recheada precisou ser excluída por apresentar resultados não condizentes.

Tabela 4 - Condições iniciais dos ensaios em batelada para retirada da isoterma de adsorção sem a presença de modulador de fase.  $C_{sal}$  refere-se à concentração de NaCl adicionada ao tampão previamente preparado. Nesse caso, nenhum.

$C_{inicial,BSA}$ (g/L)	$C_{sal}$ (mol/L)
1,00	-
2,00	-
3,00	-
4,00	-
5,00	-
6,00	-
7,00	-
8,00	-
10,00	-

Fonte: Próprio Autor, 2023.

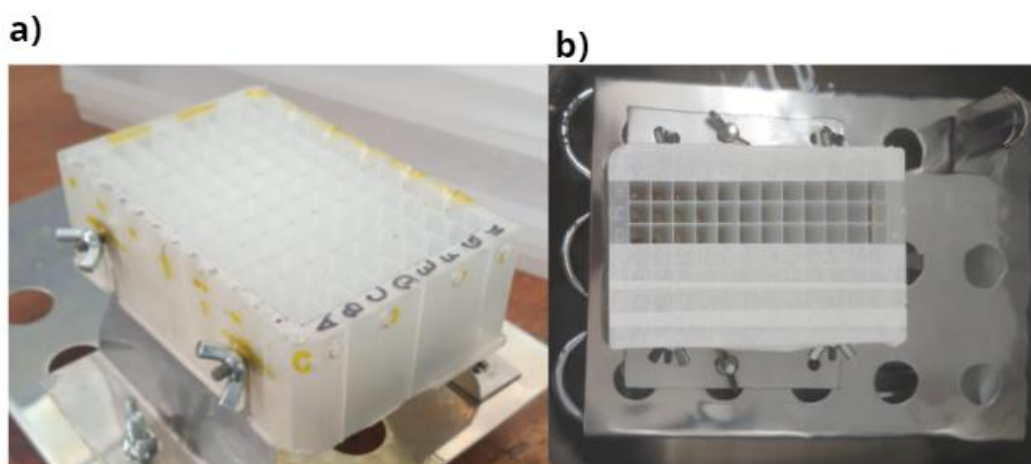
Primeiramente, a ponteira recheada e preparada para uso foi equilibrada com 1mL da solução de trabalho (sem proteína), com posterior filtração à vácuo no *manifold*. Em seguida, pipetaram-se 700 $\mu$ L da solução proteica de interesse em um poço na microplaca (de poços profundos, 2000 $\mu$ L cada) de 96 poços (12 x 8 poços) que se encontrava dentro da cuba de um banho para controle de temperatura com *set-up* de 20°C (Figura 10b). A Placa de 96 poços em questão foi denominada "placa de trabalho" e foi adaptada com perfurações em seu entorno para circulação de água por entre os poços e, portanto, maior área de troca térmica (Figura 10a).

Com a ponteira recheada pipetaram-se 600 $\mu$ L da solução presente no poço em 7 ciclos de aspiração-retorno - quantidade de ciclos estabelecida pela cinética (justificativas descritas nos resultados). Por último, regenerou-se as ponteiras seguindo o protocolo de lavagem estabelecido após os ensaios da seção 3.2 (maiores detalhes em resultados). O procedimento foi repetido para cada poço e cada um deles possuía ou uma réplica ou uma alteração das condições de processo. Os dados de equilíbrio foram obtidos em dias distintos de ensaio, com as condições definidas de modo distribuído nos poços a depender da necessidade de pontos experimentais.

Cada ponteira no procedimento de adsorção leva em torno de 6 minutos para execução dos 7 ciclos. O protocolo de lavagem pode ser realizado com as duas ponteiras em paralelo em cerca de 7 minutos, geralmente um pouco menos. Deste

modo, dois operadores conseguem alternar-se entre procedimento de lavagem e execução dos ciclos para acelerar o procedimento experimental. Ou seja, um deles realiza os ciclos na placa e o outro opera o procedimento de lavagem com as ponteiras previamente saturadas. Essa alternância funciona melhor com quatro ponteiras, sendo alternadas: duas para o ciclo de adsorção e duas previamente saturadas para regeneração. Deste modo, fica reduzido o tempo ocioso do operador dos ciclos.

Figura 10 – a) Placa de 96 poços vazada para circulação de água entre os poços. b) Aparato utilizado para o ensaio de adsorção em batelada com controle de temperatura.



Fonte: Acervo Pessoal, 2023.

As amostras que estavam dentro dos poços após completar os processos foram quantificadas. Partindo dos dados de concentração no sobrenadante medidos, através do balanço de massa descrito na Equação 8, juntamente com a Equação 10, pode-se obter a concentração de adsorbato no sólido ( $q$ ).

$$q = \frac{M_{ads}}{M_{resina}} = \frac{C_e V}{M_{resina}} \quad (10)$$

Em que  $q$  é expressa em  $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{resina}}$ ,  $M_{ads}$  (mg) refere-se a massa adsorvida e  $M_{resina}$  (g) a massa de resina utilizada no ensaio. Os dados de concentração no sólido  $q$  e concentração na solução  $C$  podem ser utilizados para ajustar dados de isoterma, por exemplo,  $q_{\text{máx}}$  e  $b$  da isoterma de Langmuir.

A fim de obter dados de equilíbrio referentes a etapa de eluição da proteína, realizou-se, também, ensaios em batelada mantendo a concentração de proteína constante e variando a concentração do modificador de fase (NaCl) presente no meio

de adsorção (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros iniciais dos ensaios de batelada para adsorção com modulador de fase.  $C_{\text{sal}}$  refere-se à concentração de NaCl adicionada ao tampão previamente preparado.

$C_{\text{inicial,BSA}}$ (g/L)	$C_{\text{sal}}$ (mol/L)
8,00	0,200
8,00	0,150
8,00	0,100
8,00	0,075
8,00	0,050
8,00	0,010

Fonte: Próprio Autor, 2023.

Por fim, escolheu-se a concentração de sal igual a 0,1 mol/L para retirada de dados de equilíbrio com distintas condições de concentração inicial de proteína. As condições desses ensaios estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições iniciais dos ensaios em batelada para retirada da isoterma de adsorção na presença de modulador de fase.  $C_{\text{sal}}$  refere-se à concentração de NaCl adicionada ao tampão previamente preparado.

$C_{\text{inicial,BSA}}$ (g/L)	$C_{\text{sal}}$ (mol/L)
1,00	0,100
3,00	0,100
5,00	0,100
6,00	0,100
8,00	0,100

Fonte: Próprio Autor, 2023.

#### 4.7 OBTENÇÃO DE PARÂMETROS DE ISOTERMA

A partir das isotermas obtidas experimentalmente, estimou-se valores para os parâmetros de  $q_{\text{máx}}$  e constante de equilíbrio da isoterma de Langmuir (Equação 4) e isoterma linear (Equação 3). Para tal, utilizou-se uma função em Python chamada de *curve\_fit* da biblioteca *scipy.optimize*, que se baseia no método numérico TRF (*Trust Region Reflected*) de otimização.

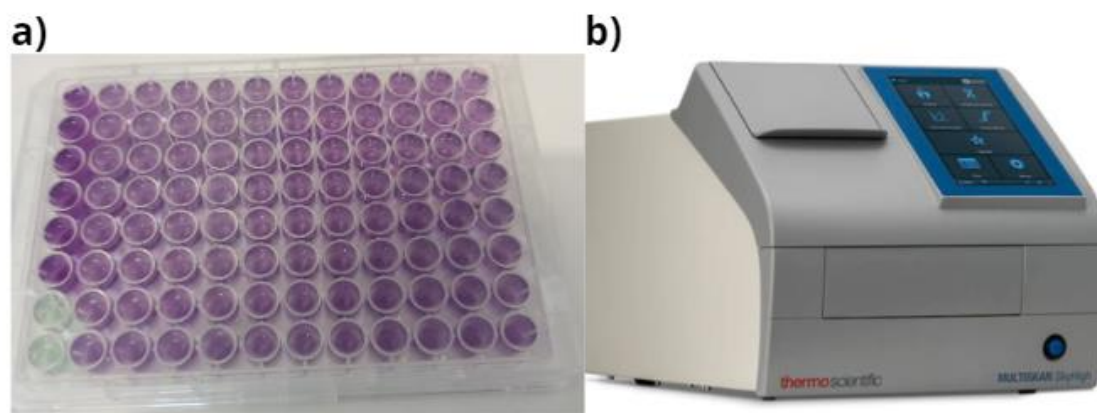
#### 4.8 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para os ensaios de lavagem e cinética, foi utilizado o método do ácido bicinconínico (BCA). Utilizou-se kit de medida de proteína comercial da Sigma-Aldrich contendo uma solução de ácido bicinconínico (reagente A) e uma solução 4% (m/v) de sulfato de cobre (II) pentahidratado (reagente B). As amostras dos poços foram diluídas 10 vezes (100µL de amostra para 900µL de água) em placa de diluição para não extrapolar a região linear da curva de concentração por absorbância e curvas de calibração foram realizadas com a proteína BSA. Essas diluições foram realizadas com micropipeta multicanal (8 canais) e em *placa de diluição* (microplaca de poços profundos, 96 poços de 2000 µL). Essa placa foi denominada “placa de diluição”. Após diluição, a pipeta era utilizada para misturar as soluções contidas nos poços, por aspiração e devolução nos poços. A cada protocolo de agitação, as ponteiras eram descartadas e novas ponteiras utilizadas.

Nas placas de trabalho, também eram adicionadas as soluções de trabalho (sem proteína) para serem utilizadas como branco no método de quantificação. Diluições da BSA também eram adicionadas para fornecer uma curva de calibração com três a cinco concentrações, a depender dos ensaios. Todas essas amostras eram diluídas com as soluções dos ensaios (poços de ensaio). Curvas de calibração em dias de ensaio distintos eram comparadas para analisar a reprodutibilidade do protocolo ou permitir identificar qualquer erro grosseiro.

Para quantificação, uma solução foi preparada misturando o reagente A ao reagente B na proporção 49:1 (v:v), solução denominada *mistura de BCA*. A quantificação era realizada na placa leitora, uma microplaca de 12 x 8 poços com 340µL de volume útil em cada poço e transparente ao visível e UV. Então, com micropipeta multicanais, pipetou-se 30µL de amostra já diluída (da placa de diluição) para cada poço da placa leitora. Em seguida e com pipeta multicanais, adicionou-se 340µL da *mistura de BCA* a cada poço da mesma placa de leitura (Figura 11.a). Para análise, foi utilizado um espectrofotômetro de microplacas Multiskan SkyHigh® da Thermo Scientific (Figura 11.b). O equipamento permite a configuração de métodos para placas com agitação interna e incubação em temperatura controlada. Assim, a amostra era incubada a 37°C por 30 minutos com agitação intermitente. Em seguida a leitura de absorbância era realizada em um comprimento de onda de 562 nm.

Figura 11 - a) Microplaca de leitura de absorvância com 96 poços com soluções quantificadas pelo método BCA. b) Leitor de microplacas Multiskan Skyhigh Thermo Scientific.

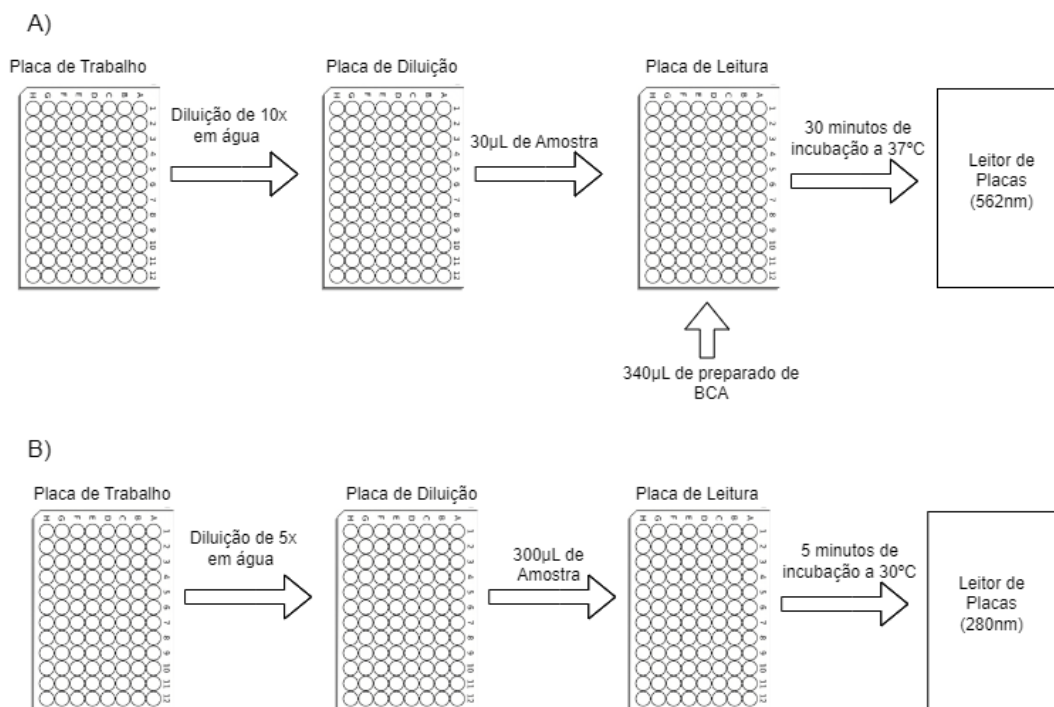


Fonte: a) Acervo Pessoal, 2023. b) Catálogo Thermo Scientific, 2023.

Os ensaios de adsorção, foram quantificados pelo método de quantificação de proteínas A280, no qual se faz a leitura das amostras diretamente no comprimento de onda de 280nm. Um esquema similar ao do BCA foi utilizado, mas nesse caso, após placa de diluição, as amostras em placa leitora eram direcionadas diretamente para o leitor de placas (Multiskan SkyHigh®). Nesse método as amostras foram diluídas 5 vezes, ou seja, 100µL de amostra para 400µL de água destilada. Também nesse método, brancos (tampões de trabalho) e amostras em distintas concentrações para obter curva de calibração eram introduzidas na placa de trabalho. Após agitação utilizando aspiração e retorno com micropipeta de multicanais, transferiu-se 300µL de amostra para a placa de leitura, para posterior medida de absorvância no leitor de microplacas. Não era necessária incubação, ainda assim preferiu-se controlar a temperatura da câmara interna do equipamento a 30°C e manter a amostra sob agitação de 5 minutos. Em seguida, ocorria a leitura da absorvância nos poços em comprimento de onda de 280nm.

O procedimento experimental para ambos os métodos analíticos está esquematizado na Figura 12.

Figura 12 – Procedimentos analítico de quantificação de proteínas utilizando microplacas. A) Método de BCA. B) Método A280.



Fonte: Próprio Autor (2023).

Por não ser necessária incubação das amostras nem mistura com outro reagente, o A280 se torna um método mais rápido e mais barato de análise quando comparado ao método de BCA. Para validação do método A280, realizou-se medidas de concentração em soluções conhecidas mostradas na Tabela 7, em que o procedimento também utilizava esquemas de placas. Os intervalos com 95% de confiança foram calculados pelo método descrito na seção 3.6 e mostram que os dados não têm diferença estatística entre si.

Tabela 7 – Comparação entre os métodos de quantificação de proteínas utilizados nos ensaios.

$C_{\text{NOMINAL}}$ (g/L)	$C_{\text{BCA}}$ (g/L)	$C_{\text{A280}}$ (mol/L)
10,00	$9,73 \pm 1,18$	$10,08 \pm 0,97$
8,00	$8,05 \pm 0,58$	$7,87 \pm 0,65$
2,00	$1,99 \pm 0,60$	$2,02 \pm 0,95$

Fonte: Próprio Autor, 2023.

#### 4.9 MÉTODO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os cálculos de intervalo de confiança presentes nesse trabalho, utilizou-se a distribuição de *Student*. O intervalo de confiança é importante para indicar a margem de incerteza frente a uma variável medida. Esse cálculo usa a amostra do estudo para estimar o tamanho real do resultado na população de origem.

O intervalo é calculado com base na Equação 11.

$$CI = X \pm t_{N-1} \frac{SD}{\sqrt{N}} \quad (11)$$

Onde CI representa o intervalo de confiança, X a média da amostra, SD o desvio padrão amostral e N o número de experimentos realizados. O valor de  $t_{N-1}$  é tabelado e depende do grau de liberdade do ensaio (grau de liberdade N-1, sendo N o número de amostras) e do nível de confiança desejado. Todos os intervalos nesse trabalho referem-se a 95% de nível de confiança.

No protocolo de definição de lavagem, todos os ensaios na mesma condição foram considerados réplicas. Ainda é importante destacar que todas as *placas de trabalhos* (na definição da cinética e processo com 7 ciclos) passaram pelo procedimento de quantificação (da seção 4.8) em réplica de medida experimental, refazendo todos os procedimentos desde a diluição, seja para o BCA ou A280. Precisamente, as placas de trabalho tiveram as soluções quantificadas em triplicata de medida, com raras exceções em que duplicata foi utilizada. De modo geral, tanto no método BCA, como no método A280, não foram obtidos muitos *outliers*, que passaram a ser identificados comparando os valores medidos das réplicas diretamente, ou seja, por inspeção. Ao final, a média das medidas no poço foi considerada a variável mensurada, ou seja, a concentração de BSA em solução líquida após protocolo de adsorção no poço. Porém, réplicas de medida experimental não são réplicas de ensaio. A cada poço era atribuída uma concentração no líquido (média das réplicas de medida), uma massa de proteína adsorvida e uma concentração no sólido (obtida do balanço). Foram consideradas réplicas para o intervalo de confiança todos os ensaios em poços distintos e realizados na mesma condição, ou seja, mesma concentração inicial e mesma concentração de sal (e mesmo número de ciclos, no caso da cinética). Estando em poço distinto, considerou-se um ensaio independente, mesmo que realizado na mesma placa (mesmo dia de ensaio). Ainda assim, a maioria dos poços em condição de réplica foram distribuídos em dias distintos de ensaio.

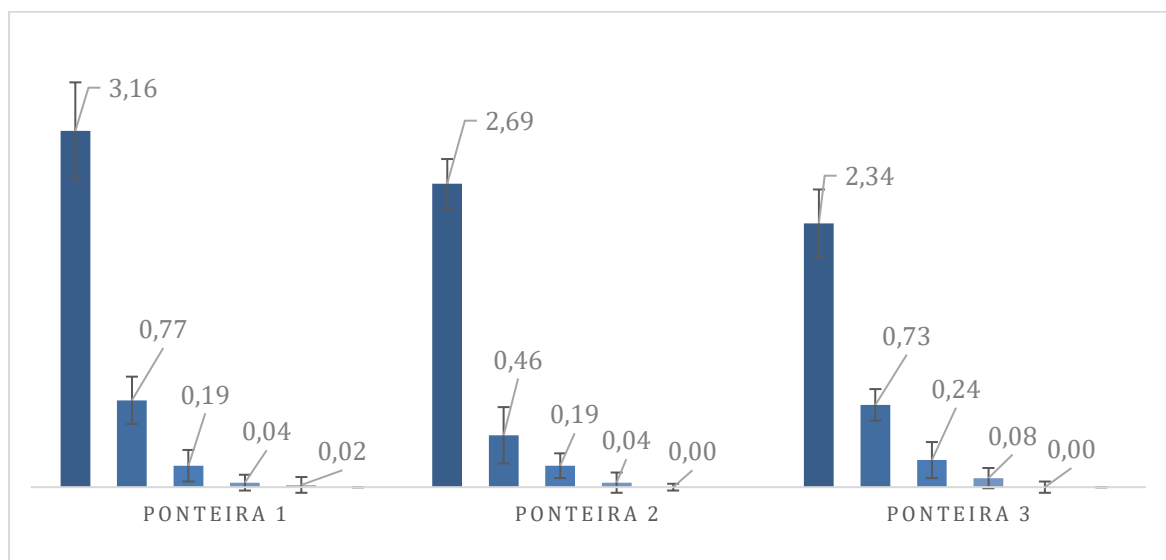
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados dos ensaios para definição da metodologia da batelada em ponteira recheada, assim como as isotermas de adsorção obtidas experimentalmente. Será realizado uma discussão sobre os resultados após a análise desses dados.

### 5.1 ENSAIOS DE LAVAGEM DA PONTEIRA EMPACOTADA

As massas de BSA em mg após cada lavagem nas três ponteiras utilizadas na fase de definições do protocolo de regeneração da resina estão dispostas na Figura 13.

Figura 13 – Massa de proteína na saída das lavagens consecutivas para cada ponteira recheada.



Fonte: Próprio Autor, 2023.

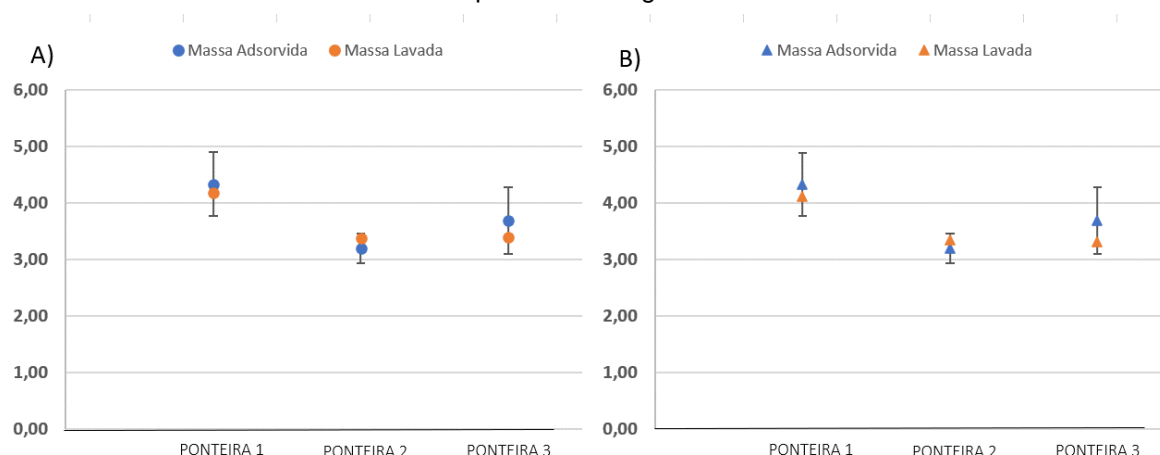
Ao analisar os resultados fica evidente que após a terceira lavagem a quantidade de proteína na solução de lavagem não era estatisticamente mensurável. Ademais, a absorbância da etapa 5 e 6 de lavagem era indistinta daquela obtida pelo branco no método de quantificação (massa eluída nula). A partir daí, podemos pressupor que não havia mais proteína na solução coletada para todas as ponteiras, ou seja, não havia mais proteína adsorvida nas resinas para ser eluída. Para corroborar a hipótese, o balanço de massa foi calculado no sistema.

Avaliou-se o balanço de massa (Equação 8 e 9) para cada uma das ponteiras, de maneira a garantir que toda a massa de proteína adsorvida fosse retirada pela

lavagem. Em todos os casos, a massa inicial de BSA foi de 10mg (total de massa na solução a ser aspirada, ou seja, em 1mL). Os resultados foram dispostos na Figura 14.a), considerando um intervalo com 95% de confiança na concentração de massa adsorvida. A partir desses resultados, verificou-se que as lavagens eram eficientes, visto que estatisticamente toda a massa adsorvida foi eluída no procedimento de lavagem. Como a massa eluída nas etapas de lavagem 5 e 6 foram mensuradas como nulas, o balanço de massa leva a conclusão de que quatro lavagens com a solução salina seriam suficientes.

Ademais, como apresentado na Figura 14.b), ao considerar apenas as 3 primeiras lavagens o processo de lavagem ainda é eficiente e garante toda a eluição da proteína. O erro do balanço de massa considerando 4 lavagens é de 5,8% enquanto o mesmo erro considerando 3 lavagens é de 6,2%.

Figura 14 - Balanço de massa para os ensaios de lavagem. A) Massa adsorvida e eluída na lavagem, considerando 4 lavagens sucessivas. B) Massa adsorvida e eluída na lavagem, considerando as 3 primeiras lavagens.



Fonte: Próprio Autor, 2023.

Portanto, definiu-se um protocolo de regeneração como iniciando com 4 lavagens sucessivas com solução 1 mol/L de NaCl em tampão de trabalho (PIPES, pH 6,1). Depois das 4 lavagens nessa solução, foram incluídas duas lavagens com água para remoção do excesso de NaCl, totalizando quatro etapas para remoção de proteína e duas para remoção de sal. Esse protocolo está descrito na Tabela 8.

Tabela 8 - Protocolo de lavagem das ponteiras empacotadas.

<b>Lavagem</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Solução</b>
1 <sup>a</sup>	1,00	1 mol/L de NaCl em PIPES 25mmol L <sup>-1</sup> / pH=6.1
2 <sup>a</sup>	0,50	1 mol/L de NaCl em PIPES 25mmol L <sup>-1</sup> / pH=6.1
3 <sup>a</sup>	0,50	1 mol/L de NaCl em PIPES 25mmol L <sup>-1</sup> / pH=6.1
4 <sup>a</sup>	0,50	1 mol/L de NaCl em PIPES 25mmol L <sup>-1</sup> / pH=6.1
5 <sup>a</sup>	1,00	Água destilada
6 <sup>a</sup>	1,00	Água destilada
<b>Para utilização em um ensaio de adsorção</b>		
7 <sup>a</sup>	1,00	Solução tampão na condição do próximo ensaio
<b>Para armazenamento em geladeira</b>		
7 <sup>a</sup>	0,50	20% (v/v) de etanol em água destilada

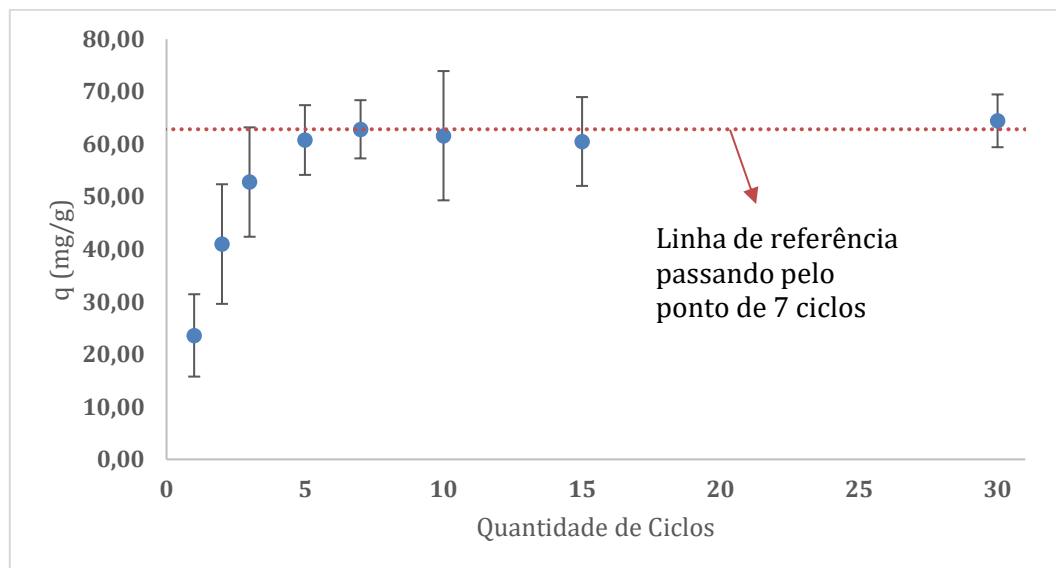
Fonte: Próprio Autor, 2023.

A lavagem inicial, com 1 mL, foi definida porque garante o preenchimento total da ponteira, levando partículas dispersas ou retidas na parede da ponteira para o fundo da mesma. Dessa maneira, após a lavagem, foi possível reutilizar a ponteira para outros ensaios ou prepará-la para o armazenamento. No caso de um novo ensaio para obtenção de dados de equilíbrio o propósito da etapa 7 seria o equilíbrio da resina na condição desejada. Em outras palavras, a resina era equilibrada na condição do poço onde a adsorção seria realizada, através do contato com o tampão de trabalho. Nesse caso, o tampão de trabalho era a condição da solução diluente para proteína a ser utilizada no poço durante a aplicação de ciclos (etapa seguinte, de adsorção). Por exemplo, tampão PIPES 25mmol L<sup>-1</sup> sem adição de sal, na situação de baixa força iônica.

## 5.2 ENSAIOS DE CINÉTICA NA ADSORÇÃO EM PONTEIRAS

A Figura 15 apresenta a curva de cinética retirada para o processo de adsorção nas ponteiras empacotadas com 50mg de Q-Sepharose. Para tal, foi calculada a massa adsorvida no sólido em mg de BSA por grama de resina em função da quantidade de ciclos de contato da solução de BSA 10g/L com a matriz sólida.

Figura 15 - Ensaio de cinética de adsorção para as ponteiras empacotadas com resina.



Fonte: Próprio Autor, 2023.

Com base nesses ensaios, foi possível observar que havia variação estatisticamente relevante na massa retida pela matriz sólida até 5 ciclos. Portanto, a partir dessa quantidade de ciclos as fases estariam em equilíbrio e não haveria mais transferência de soluto entre elas, pelo menos no que se refere às precisões de medida desse trabalho. Contudo, para garantir que o equilíbrio fosse atingido, optou-se por utilizar 7 ciclos como o padrão para realização dos ensaios posteriores.

### 5.3 ENSAIOS DE ADSORÇÃO PARA OBTENÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO

Para os ensaios de adsorção até o equilíbrio, definiu-se o número de ciclos em 7, conforme justifica a seção anterior. Em relação tempo de obtenção de uma curva de equilíbrio utilizando 7 ciclos mensurou-se um tempo de 6 minutos para o ensaio e 7 minutos para lavagem (13 minutos para obtenção de um dado). Dessa maneira, considerando uma isoterma com 9 pontos realizados em triplicata, como feito nesse trabalho, o tempo de obtenção da uma curva de equilíbrio é de aproximadamente 6 horas sem considerar a análise de quantificação de proteínas. Contudo esse tempo pode ser reduzido trabalhando com dois operadores e duas ponteiras, de maneira que a lavagem e a batelada ocorrem em paralelo, totalizando apenas 3 horas de ensaio.

Obter várias condições de equilíbrio de modo mensurável é importante para

ajustar parâmetros da isoterma. Ou seja, é desejável obter vários pares (C, q) no equilíbrio. Com essa finalidade, tinha-se duas opções: variar a massa de resina ou a concentração inicial de BSA; uma vez que a variação de volume de solução líquida é uma opção restrita devido ao volume da ponteira recheada (máximo 1 mL).

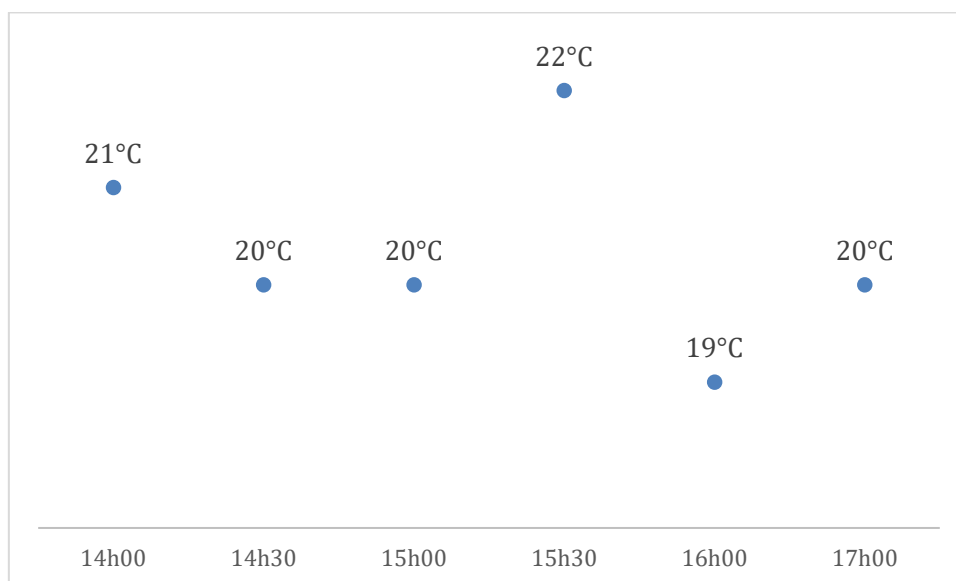
Aumentar a massa de resina para além de 50mg poderia ocasionar problemas em relação a cinética do processo, umedecimento da matriz sólida com a solução de adsorção e limitação física da própria ponteira. Testes com mais que 50 mg (75 mg, particularmente) indicaram que de fato o sólido apresentava maior dificuldade em molhar e se espalhar no líquido, mantendo-se mais aglomerado por mais tempo. Ademais, o erro experimental associado ao q (no equilíbrio) era menor conforme maior a massa de resina, mantendo o volume de solução constante. Isso pode ser verificado, através da derivada do balanço de massa (Equação 5) apresentada pela Equação 12.

$$\frac{\partial q_e}{\partial C_e} = -\frac{V}{M_{ads}} \quad (12)$$

Observe que varrer várias condições experimentais no equilíbrio poderia exigir ampla faixa de  $-\frac{V}{M_{ads}}$ . Assim, a redução da massa de resina pode comprometer o resultado através de incertezas na massa pesada e, também estaria limitada à no mínimo cerca de 10mg, pois passaria a dificultar a pesagem e preparo da ponteira. Portanto, optou-se por variar a concentração inicial de BSA no sistema como descrito na Tabela 4.

Para garantir da estabilidade de temperatura durante os ensaios, foi monitorada a temperatura no interior de um poço da placa de trabalho (poço E6) preenchido com 1mL de água durante 4 horas. Os dados estão dispostos na Figura 16. Em relação ao tempo de resposta do sistema, ao pipetar 700 $\mu$ L de água em temperatura ambiente, levava cerca de 40 segundos para a temperatura estabilizar no valor definido de 20°C.

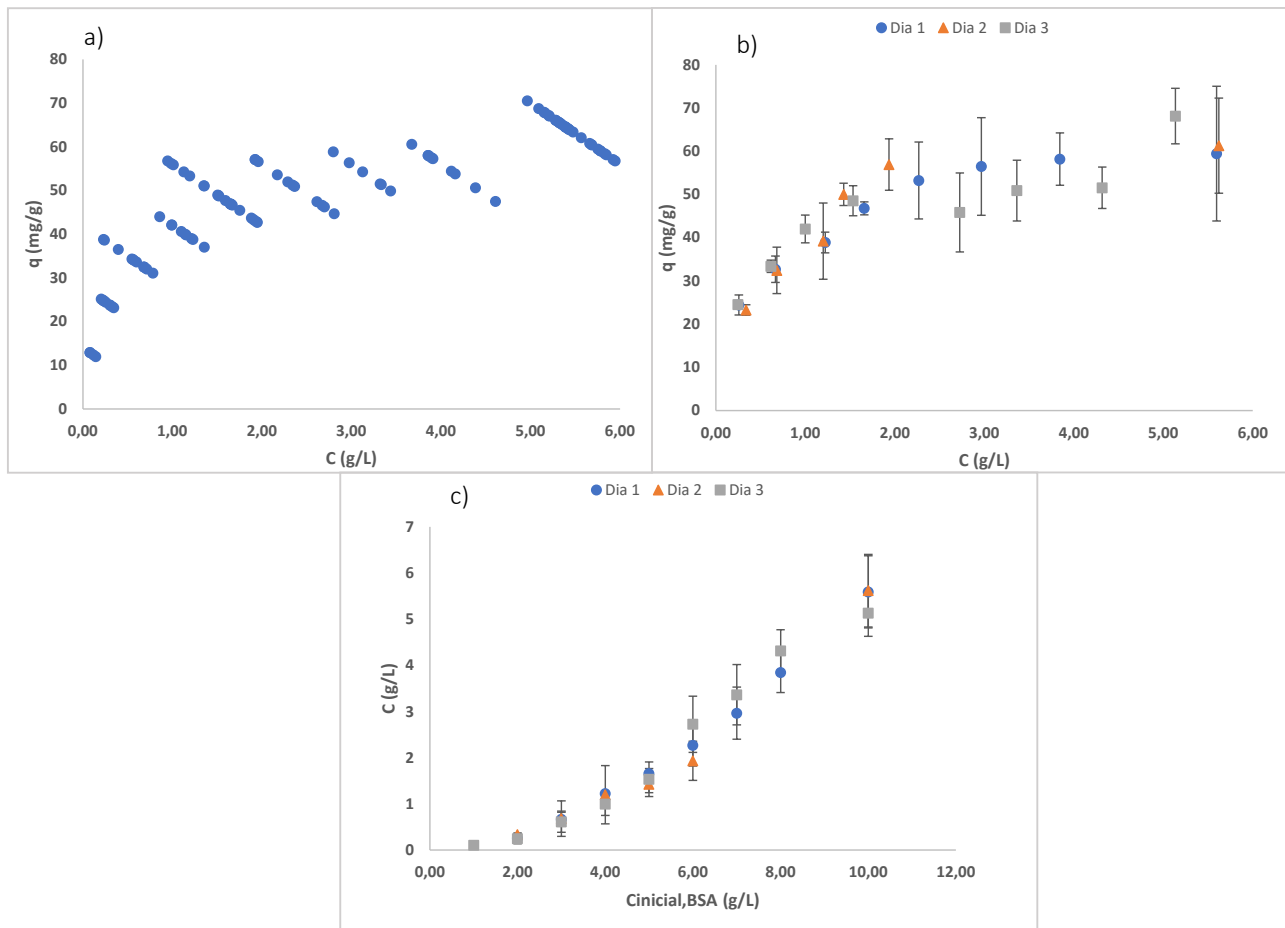
Figura 16 - Monitoramento da temperatura de um poço na placa de trabalho em banho a 20°C.



Fonte: Próprio Autor, 2023.

A Figura 17 apresenta os resultados desse ensaio em diferentes tratamentos a fim de explicitar a variância e a reprodutibilidade do método proposto. Na qual, o eixo das abscissas refere-se à concentração de equilíbrio na fase líquida e o eixo das ordenadas à concentração de equilíbrio no sólido.

Figura 17 – Dados de equilíbrio de troca iônica da BSA em Q-Sepharose a 20°C. Resultados obtidos por ensaios com ponteira recheada com 50mg de resina. a) Todos os dados de equilíbrio retirados nos ensaios. b) Dados de equilíbrio agrupados por dia de ensaio em função do  $C_{eq}$ . c) Dados de equilíbrio agrupados por dia de ensaio em função da concentração inicial de proteína.



Fonte: Próprio Autor, 2023.

Na Figura 17.a) e b), observa-se que a curva apresenta o comportamento de isoterma favorável, aparentando o formato de curva dado pela isoterma de Langmuir. Em baixas concentrações, a curva tende ao linear seguido de uma saturação da mesma para concentrações elevadas de proteína.

Na Figura 17.a), é possível analisar a dispersão dos pontos experimentais. O alinhamento dos pontos em várias retas de coeficiente angular negativo é somente um indicativo das concentrações iniciais utilizadas, uma vez que o cálculo pelo balanço de massa (Equação 8) garante que pontos obtidos a partir da mesma concentração inicial e com a mesma relação  $\frac{V}{M_{ads}}$  estejam sobre a reta definida pelo próprio balanço de massa. Em outras palavras, a correlação entre  $q$  e  $C$  para a mesma

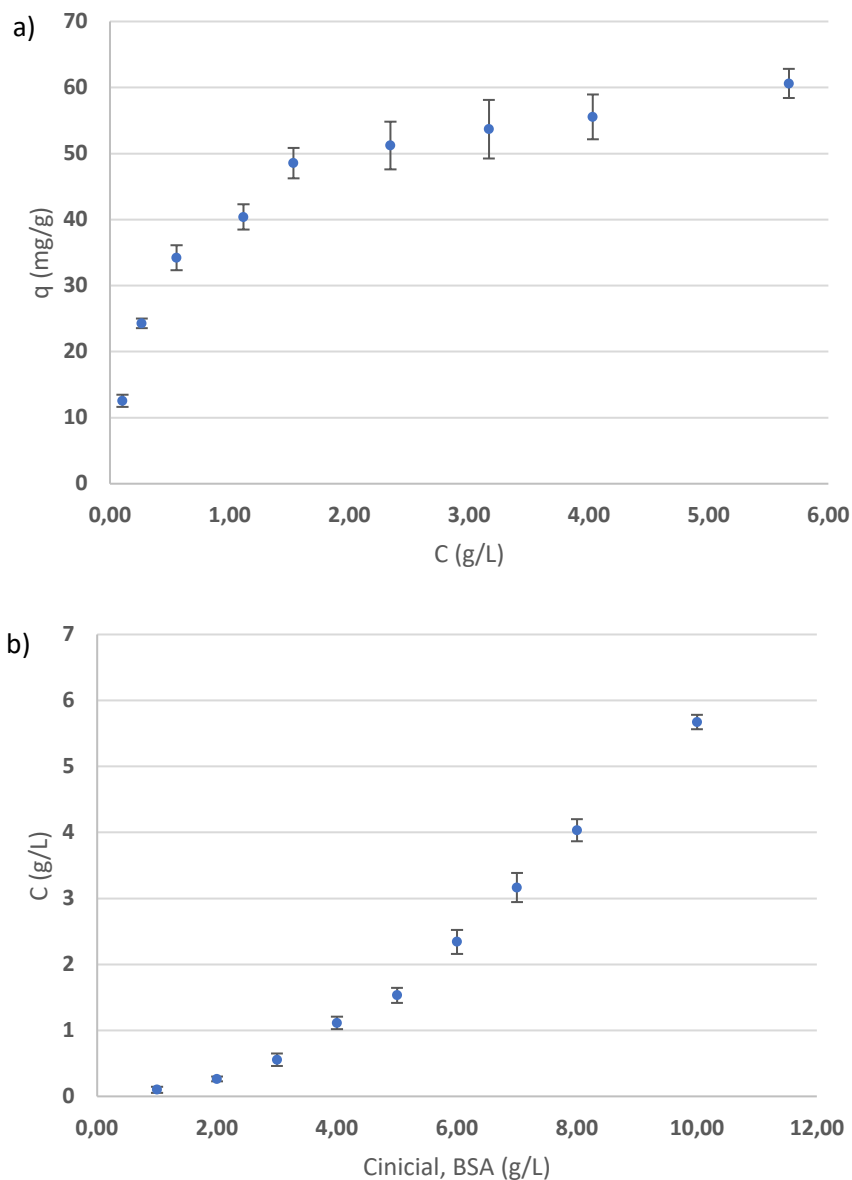
concentração inicial não representa um problema operacional, mas sim um reflexo da escolha pelo procedimento experimental adotado, que fixou  $\frac{V}{M_{ads}}$  em todos os ensaios de poços. Ademais, como o valor de  $q_e$  é calculado a partir do valor de  $C_e$ , as incertezas das variáveis estão correlacionadas, já que o decréscimo em  $C$  medido acarretará em um aumento em  $q$ .

Já na Figura 17.b) estão apresentadas as médias dos pontos agrupados por dia de ensaios. Dessa maneira, é possível verificar que o ensaio de adsorção em ponteiras é reproduzível entre distintos dias. Isso porque, os valores de concentração de adsorbato na fase sólida são estatisticamente iguais independente do dia de ensaio. Entre os dias, variou-se as ponteiras utilizadas e o preparo de soluções. Como os erros das variáveis estão correlacionados, optou-se por colocar o intervalo de confiança apenas para a concentração na fase sólida.

Por fim, na Figura 17.c) optou-se por incluir a concentração de equilíbrio na fase líquida em função da concentração inicial de BSA. Assim, o erro se dá apenas na variável associada ao eixo das ordenadas, de maneira que os pontos só se dispersam nessa direção. Portanto, essa figura é a que melhor reflete a reprodutibilidade dos ensaios, comparando também distintos dias de ensaio.

A Figura 18 sumariza todos os dados de equilíbrio obtidos, na qual compilou-se todos os pontos a partir da concentração inicial de BSA.

Figura 18 - Isoterma de adsorção para proteína BSA em resina Q-Sepharose a 20°C.



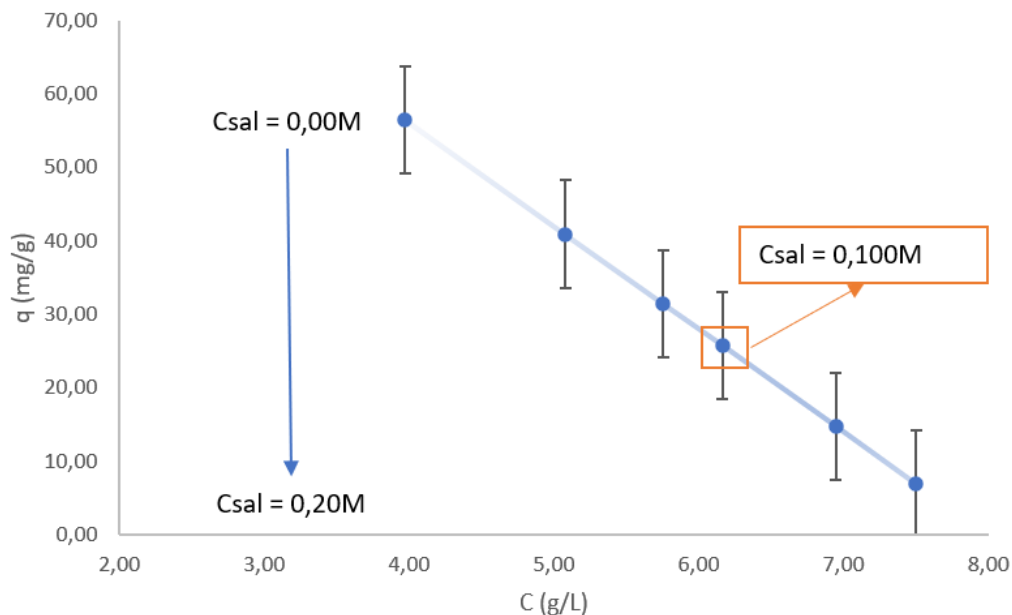
Fonte: Próprio Autor, 2023.

## 5.6 ENSAIOS DE ADSORÇÃO PARA OBTENÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO NA PRESENÇA DE UM MODIFICADOR DE FASE

Para definição de uma concentração de sal (NaCl) adicionado ao tampão de modo a promover distinção dos dados sem adição de sal e ainda assim permitir alguma retenção no sólido, realizou-se ensaios variando a concentração de NaCl (Tabela 5). Os resultados foram dispostos na Figura 19, na qual a força iônica do meio está sendo

representada pela intensidade da cor no gradiente.

Figura 19 - Análise de sensibilidade da concentração de sal na adsorção de BSA.

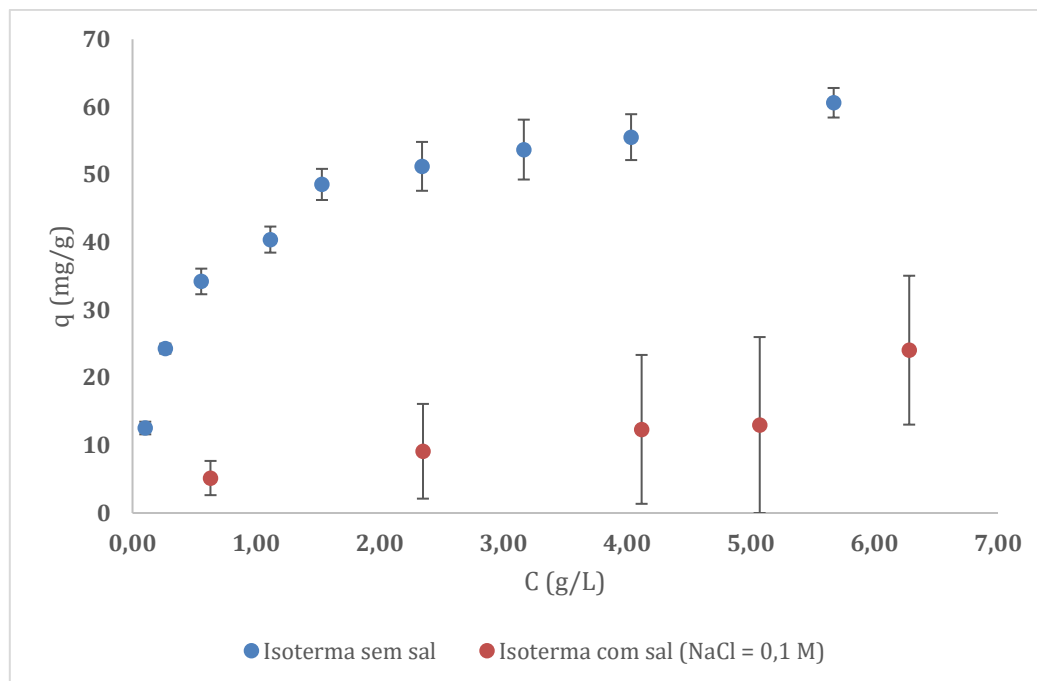


Fonte: Próprio Autor, 2023.

Na Figura 19, verificou-se que a concentração na fase líquida aumentava com o aumento da força iônica no meio. Assim, menos BSA era retida no sólido, o que era esperado, já que mais íons na solução fazem com que a proteína se desloque para o líquido. Corroborando a observação, o aumento da concentração de íons é o modo clássico para eluição de proteínas em ensaios de troca iônica em coluna. Para retirar mais dados de equilíbrio, agora mantendo fixa a força iônica, mas variando a concentração inicial de BSA optou-se por trabalhar com uma concentração de sal de 0,100 mol/L. A escolha ocorreu com o objetivo de que ainda houvesse adsorção passível de medida no sistema, porém, a retenção da proteína fosse significativamente menor do que a observada sem adição direta de sal. Lembrando que a obtenção de várias condições de equilíbrio é importante para ajustar parâmetros da isoterma.

A Figura 20 apresenta os dados de equilíbrio obtidos nas condições propostas pela Tabela 6, para fins de comparação, os dados retirados sem a adição extra de sal também são apresentados.

Figura 20 – Dados de equilíbrio para troca iônica de BSA em Q-Sepharose a 20°C na presença e ausência de NaCl.



Fonte: Próprio Autor, 2023.

Dessa maneira, podemos observar que para valores de modificador de fase (adição extra de sal) de somente 100 mmol L<sup>-1</sup> quase não há adsorção de proteína no sólido quando comparados ao sistema sem adição de NaCl. Isso se deve ao fato dos íons do sal competirem com a proteína pela superfície da resina, deslocando o equilíbrio no sentido de desfavorecer a adsorção da BSA.

### 5.5 AJUSTE DE PARÂMETROS DE ISOTERMA

A partir dos dados de equilíbrio obtidos experimentalmente foi possível estimar os valores dos parâmetros de equilíbrio. Esses valores estão dispostos na Tabela 9.

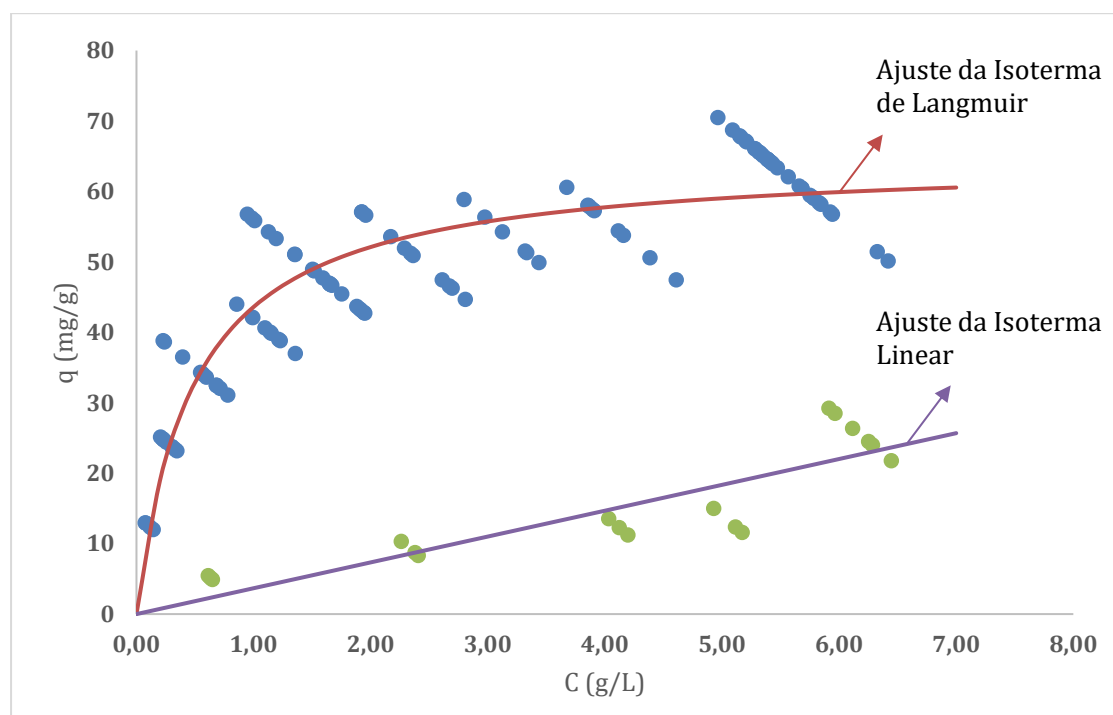
Tabela 9 - Parâmetros de isotermas estimados a partir dos dados experimentais.

	<b>q<sub>máx</sub> (mg/g)</b>	<b>b (L/g)</b>
<b>Isoterma sem sal</b>	64,75 ± 3,62	2,06 ± 0,42
	-	<b>a (L/g)</b>
<b>Isoterma com sal</b>	-	3,67 ± 0,72

Fonte: Próprio Autor, 2023.

Desses resultados, verificou-se que é possível ajustar o modelo de isoterma de Langmuir para o caso sem modulador de fase, onde a saturação da resina fica próxima ao valor de  $64,7 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{resina}}$  e o coeficiente  $b = 2,06$ . Contudo, para a isoterma com modificador de fase em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , o método de ajuste utilizado não convergia para parâmetros positivos da isoterma de Langmuir. Assim, ao analisar os dados experimentais, realizou-se o ajuste para uma isoterma linear. O parâmetro ajustado foi de  $a = 3,67 \text{ L/g}$ . A Figura 21, explicita os dados experimentais e o ajuste paramétrico para ambos os casos.

Figura 21 - Ajuste de parâmetros realizados via programa em Python para as isotermas obtidas experimentalmente a  $20^{\circ}\text{C}$ .



Fonte: Próprio Autor, 2023.

Os parâmetros ajustados indicam a interação proteína-resina do sistema proposto. Ao analisarmos o caso sem modificador de fase, temos um coeficiente de interação de 133,3, já quando analisamos o caso com NaCl temos um coeficiente de 3,67, cerca de 36 vezes menor. Esse comportamento é representado pela inclinação inicial (anterior a saturação) das isotermas, onde vemos uma interação proteína-resina maior no caso sem modificador de fase.

## 6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho propôs a utilização de ponteiras de pipetas empacotadas com resina para obtenção de dados de equilíbrio para adsorção. Como teste de prova, utilizou-se a troca iônica com Q-sepharose. As ponteiras foram recheadas com a resina em esquema de leito fluidizado e a BSA foi utilizada para os ensaios. Os resultados experimentais indicaram que ponteiras recheadas com sólido podem ser utilizadas na definição de condições operacionais e, também seriam uma alternativa viável para obtenção de isotermas.

Para tal, foi necessário definir um protocolo de montagem das ponteiras, regeneração para reutilização das resinas e quantidade de ciclos de contato entre a solução e a matriz sólida para atingir o equilíbrio. Em relação ao protocolo de lavagem, verificou-se, que após 4 enxagues sucessivos com solução de lavagem (um de 1 mL e 3 de 0,5mL) toda proteína presente no sólido já haveria eluído. Já para a quantidade de ciclos de contato, definiu-se que 7 ciclos seriam suficientes para obtenção do equilíbrio, já que não havia mais variação significativa de massa adsorvida.

Para obtenção das isotermas, foram selecionadas duas condições de operação, uma sem a adição extra de sal e outra com adição suficiente para obter concentração de 0,1 mol/L de NaCl. Dessa maneira, foi possível analisar experimentalmente o comportamento da molécula na fase de adsorção e na etapa de eluição. Verificou-se, através de tratamentos estatísticos, que os ensaios eram reprodutíveis, independentemente da ponteira utilizada, do dia do ensaio e do preparo das soluções.

Dados de equilíbrio foram obtidos em duas concentrações de sal distintas: 0 e 0,1 mol/L. Realizou-se o ajuste de duas isotermas de Langmuir para encontrar os parâmetros de interesse, contudo, para o caso da isoterma com concentração elevada de sal, um ajuste linear foi mais apropriado. Por fim, proposto um método funcional para retirada de isotermas com pouco gasto de resina cromatográfica e proteína, é possível aplicar o mesmo para diferentes combinações molécula-resina para obtenção de parâmetros.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos pelo presente trabalho, sugere-se as seguintes análises para trabalhos futuros:

- aplicar a metodologia utilizada para diferentes combinações de moléculas e resinas;
- realizar a estimativa de parâmetros de isoterma com base na proposta de análise da concentração de equilíbrio na fase líquida pela concentração inicial do analito;
- automatizar os ensaios propostos com auxílio da robótica.

## REFERÊNCIAS

ALBERTINA G. RIOS, ANA M. RIBEIRO, ALÍRIO E. RODRIGUES, ALEXANDRE F. P. FERREIRA, **Bovine Serum Albumin and Myoglobin Separation by Ion-Exchange SMB**, Industrial & Engineering Chemistry Research, 10.1021/acs.iecr.3c01613, 62, 35, (13932-13942), 2023.

ARCANJO, MARIA ROSIENE ANTUNES. **Estudo da adsorção de ácido láctico por cromatografia de troca iônica**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, Ceará, 2014.

BBC RESEARCH. **Biorefinery Products: Global Markets**. Jan 2021. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/market-research/energy-and-resources/biorefinery-productsmarkets-report.html>. Acesso em: novembro de 2023

BELTER, P. A., CUSSLER, E. L., HU, W.-H. (1988). **Bioseparations**, Wiley Interscience, New York.

BÜRGER R.; MULET P.; RUBIO L.; SEPÚLVEDA M. **Linearly implicit-explicit schemes for the equilibrium dispersive model of chromatography**. Elsevier, 2017.

BURGUESS R.R.; DEUTSCHER M.P. **Guide to protein purification**. Second Edition, Methods in Enzymology, Science Direct, vol. 463: 1-851, 2009.

COLLINS, C.; L. BRAGA, G.; S. BONATO, P. **Introdução a métodos cromatográficos**, Editora da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, 1997.

COLLINS, C.; L. BRAGA, G.; S. BONATO, P. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora UNICAMP, 2006.

CREMASCO, M.A. **Operações Unitárias em sistemas particulados e fluidomecânicos**. Blucher, 2012.

CUNICO, R.L.; GOODING, K.M.; WEHR, T. **Ion-exchange chromatography**. In **Basic HPLC and CE of Biomolecules**; Bay Bioanalytical Laboratories: Richmond, VA, 1998.

FEBRIANTO J., KOSASIH A. N., SUNARSO J., JU Y., INDRASWATI N., ISMADJI S., **Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies**, Journal of Hazardous Materials, Volume 162, Issues 2–3, 2009, Pages 616-645, ISSN 0304-3894,

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.042>.

FORNSTEDT, T. **Liquid Chromatography || Modeling of Preparative Liquid Chromatography**, (), 407–425. 2013. doi:10.1016/B978-0-12-415807-8.00018-3

GE HEALTHCARE. **Affinity chromatography, principle and methods**. 2007.

GE HEALTHCARE. **Strategies for Protein Purification Handbook**. p. 167, 2010.

GRAND VIEW RESEARCH: **Preparative and Process Chromatography Market Size**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/preparative-process-chromatographymarket>. 2022. Acesso em: 15/11/23.

GUIOCHON G.; ATTILA F.; SHIRAZI D. G.; KATTI A. M. **Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography**. Second Edition, Elsevier, 2006.

GUIOCHON G., **Preparative liquid chromatography**, Journal of Chromatography A, Volume 965, Issues 1–2, 2002, Pages 129-161, ISSN 0021-9673, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01471-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01471-6).

HALL, MCCORD. **The analysis of mono- and divalent cations present in explosive residues using ion chromatography with conductivity detection**. Journal of Forensic Sciences, v. 38, p. 928-934, 1993.

HARRISON, Roger G. **Liquid chromatography and adsorption**. Em: **Bioseparations science and engineering**. New York: Oxford University Press, Inc, 2003. cap. Capítulo 7, p. 191-220.

HOUDE, DAMIAN J.; BERKOWITZ, STEVEN A. **Biophysical characterization of proteins in developing biopharmaceuticals**. 2nd Editio. [S. I.]: Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-03008-2>.

JUNGBAUER, A. **Preparative chromatography of biomolecules**. J. Chromatogr. 2009.

JUN-XIONG HUANG; GEORGES GUIOCHON. **Applications of preparative high-performance liquid chromatography to the separation and purification of peptides and proteins**. 1989. doi:10.1016/s0378-4347(00)84477-1

KASTNER, M. **Protein liquid chromatography**. Elsevier Science, 2000. Capítulo 1.

KATES P., TOMASHEK J., MILES D., LEE A., . BioTechniques, 2020.

KAWAJIRI, Y. **Model-based optimization strategies for chromatographic**

**processes: a review.** Adsorption, 2020. doi:10.1007/s10450-020-00251-2

KRESGE GA, GROSSE S, ZIMMER A, et al. **Strategies in developing high throughput liquid chromatography protocols for method qualification of pharmacopeial monographs.** J Sep Sci.2020; 43:2964-2970.

KYZAS G. **Sorption - From Fundamentals to Applications.** 2022 IntechOpen. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.98007>.

MASEL, R.L. **Principles of Adsorption and Reaction on Solid Surfaces.** John Wiley & Sons, New York. 1996.

MARKETS AND MARKETS. **Preparative and Process Chromatography Market by Type (Preparative (Chemicals and Reagents, Resin (Affinity, Ion Exchange), Column, Systems (Liquid Chromatography), Services), Process), End User (Research Laboratories) - Global Forecasts to 2026.** Jan 2022. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/MarketReports/preparative-process-chromatography-market-151748164.html>. Acesso em: novembro de 2022.

MATTE A., **Chapter 9 - High-throughput, parallelized and automated protein purification for therapeutic antibody development, Approaches to the Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics,** Elsevier, 2020, Pages 181-198, ISBN 9780081030196, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103019-6.00009-6>.

MITCHEL, T. **Machine learning** (Mcgraw-Hill international edit). International ed. New York: McGraw-Hill Education. 1997

NASCIMENTO, R. F. DO et al. **Adsorção: Aspectos teóricos e aplicações ambientais.** Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014. p. 256

NELSON D.L.; COX M.M. LEHNINGER. **Principles of Biochemistry.** Seventh Edition. W.h. freeman, Macmillan Learning, 2016.

RUTHVEN, D. M. **Principles of Adsorption and Adsorption processes.** New York: John Wiley & Sons, 1984. 432 p.

RUTHVEN, D. M. **Physical Adsorption and the Characterization of Porous Adsorbents.** In: Principles of Adsorption and Adsorption Processes. v. 19p. 433, 1985.

SHELLINGER P.A; CARR W. P. **Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation.,** 1109(2), 253–266. 2006 doi: 10.1016/j.chroma.2006.01.047

SEIDEL-MORGENSTERN A. **Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms.**, 1037(1-2), 255–272. 2004 doi: 10.1016/j.chroma.2003.11.108

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons; Hoboken, 2010.

SONG, X; LIU, X; LIU, F; WANG, C. **Comparison of machine learning and logistic regression models in predicting acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis**. 2011. doi: 10.1016/j.ijmedinf.2021. 104484

SUSANTO, A., TREIER, K., KNIEPS-GRÜNHAGEN, E., VON LIERES, E. AND HUBBUCH, J. **High Throughput Screening for the Design and Optimization of Chromatographic Processes: Automated Optimization of Chromatographic Phase Systems**. Chem. Eng. Technol., 32: 140-154. 2009 <https://doi.org/10.1002/ceat.200800350>

TAN, K.; HAMEED, B. **Insight into the adsorption kinetics models for the removal of contaminants from aqueous solutions**. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, v. 21, n. 0, p. 47–0, mar. 2017.

TANGIR AHAMED, BECKLEY K. NFOR, PETER D.E.M. VERHAERT, GIJS W.K. VAN DEDEM, LUUK A.M. VAN DER WIELEN, MICHEL H.M. EPPINK, EMILE J.A.X. VAN DE SANDT, MARCEL OTTENS. **pH-gradient ion-exchange chromatography: An analytical tool for design and optimization of protein separations**, Journal of Chromatography A, Volume 1164, Issues 1–2, 2007.

VERVOORT N, GOOSSENS K, BAETEN M, CHEN Q . **Recent advances in analytical techniques for high throughput experimentation**. Anal Sci Adv. 2021; 2: 109–127. <https://doi.org/10.1002/ansa.202000155>

VIDAKOVIC, B. **Statistics for bioengineering sciences. With MATLAB and WinBUGS support**. 1st ed. New York, NY: Springer Science+Business Media, LLC (Springer. Texts in Statistics), 2011.  
VOGLIS C., LAGARIS I. E. **A Rectangular Trust Region Dogleg Approach for Unconstrained and Bound Constrained Nonlinear Optimization** WSEAS International Conference on Applied Mathematics, Corfu, Greece, 2004.

WANG J.; GUO X. **Adsorption isotherm models: Classification, physical meaning, application and solving method**. Chemosphere, Volume 258, 2020, 127279, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127279>.

WALTHER, C, VOIGTMANN, M, BRUNA, E., ABUSNINA, A., TSCHELIEßNIG, A.-L., ALLMER, M., *et al.* **Smart process development: Application of machine-learning and integrated process modeling for inclusion body purification processes**. Biotechnol. Prog. 38, e3249. 2022. doi:10.1002/btpr.3249

ZHAO D.; WAN Y.; ZHOU W. **Ordered mesoporous materials**. Wiley-VCH, 2013.  
ZHURAVLEV, L. T. 16. The surface chemistry of amorphous silica. v. 173, p. 1–38, 2000.