

SOLUCION DE ECUACIONES DIFERENCIALES PARCIALES APLICADAS A LA BIOTECNOLOGIA: DINAMICA DE SISTEMAS DE AFINIDAD

Rosa Ma. Montesinos Cisneros¹; Armando Tejeda Mansir² y Roberto Guzmán Zamudio³:

1 Departamento de Matemáticas. Universidad de Sonora. 2 Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora 3 Chemical and Environmental Engineering Department. University of Arizona.

Resumen

La cromatografía de afinidad es un método económico que es utilizado en la purificación de proteínas tales como anticuerpos monoclonales, hormonas, vacunas y factores de coagulación. Actualmente existe un gran interés en el desarrollo de modelos que describan la cromatografía de afinidad y su solución, mediante programas de computación, para el escalamiento y optimización de los bioprocesos donde participa este tipo de cromatografía. En esta investigación se desarrolló un modelo de transporte de tres resistencias consecutivas a la transferencia de masa. Este modelo fue utilizado para simular la adsorción por afinidad de una proteína en sistemas tipo tanque agitado. La solución del modelo fue obtenida utilizando el método numérico de líneas. La contrastación del modelo con datos experimentales sugiere que la metodología utilizada proporciona una descripción realista del comportamiento de sistemas de afinidad.

1 Introducción

Un gran número de productos proteicos de aplicación industrial y terapéutica como enzimas, hormonas, anticuerpos monoclonales, citocinas e interferones, son obtenidos actualmente mediante procesos biotecnológicos modernos. Los esquemas de purificación de estos productos generalmente requieren una o más operaciones cromatográficas debido a las especificaciones de pureza con que se requieren [1-4].

La cromatografía de afinidad es un método económico que es utilizado en la purificación de proteínas. En este tipo de cromatografía, la matriz de afinidad se prepara mediante la inmovilización de un ligando conocido que interactúa específicamente con la proteína de interés [5,6].

El escalamiento y optimización de las operaciones cromatográficas de afinidad para la recuperación de componentes bioquímicos es muy importante [7-9]. Una herramienta de la ingeniería que puede ayudar a alcanzar con éxito estas tareas de la ingeniería de bioprocesos, es el desarrollo de modelos matemáticos y programas de computadora para describir el comportamiento de esta operación [7-10].

Un requisito importante para el uso de esta metodología es la comprensión de los mecanismos fundamentales en que se basan las separaciones, que permita desarrollar modelos realistas basados en principios físicos y químicos básicos. Las ecuaciones obtenidas a través de este enfoque, generalmente involucran ecuaciones diferenciales parciales no lineales que no tienen solución analítica.

Se han realizado varios esfuerzos para modelar y simular operaciones de adsorción por afinidad en tanques agitados, sin embargo los resultados han sido limitados [1,11]. Arve y Liapis [12] y Horstmann y Chase [13] consideraron que la adsorción de un soluto sobre la superficie del adsorbente desde el seno del líquido, involucra tres pasos que contribuyen a la resistencia a la transferencia de masa: difusión en la película, difusión en el poro y cinética de reacción. Arve y Liapis resolvieron el modelo por el método de colocación ortogonal para discretizar las derivadas espaciales y un integrador Runge-Kutta de tercer orden para obtener la solución. Horstmann y Chase utilizaron diferencias finitas usando una aproximación de segundo orden para las derivadas espaciales. La solución ajustó bien a los datos experimentales en casi todo el rango experimental. Sin embargo, como los autores mencionan, el método es impráctico para resolver sistemas más complejos. Se requiere el uso de métodos numéricos avanzados para resolver estos modelos.

El método numérico de líneas (NUMOL) ha contribuido al desarrollo de algoritmos robustos para la solución de problemas de valor inicial de ecuaciones diferenciales ordinarias, aún cuando sean rígidas (stiff) [14,15]. Este método está siendo utilizado ampliamente en la solución de problemas tales como: flujos turbulentos con

transferencia de calor, dispersión de ondas electromagnéticas, transferencia de calor de radiación en regiones cerradas[16-18]. En el método NUMOL la solución de este tipo de ecuaciones se lleva a cabo en dos pasos: el problema de valor de frontera se resuelve mediante técnicas de discretización y el problema de valor inicial resultante se maneja mediante un integrador apropiado [19].

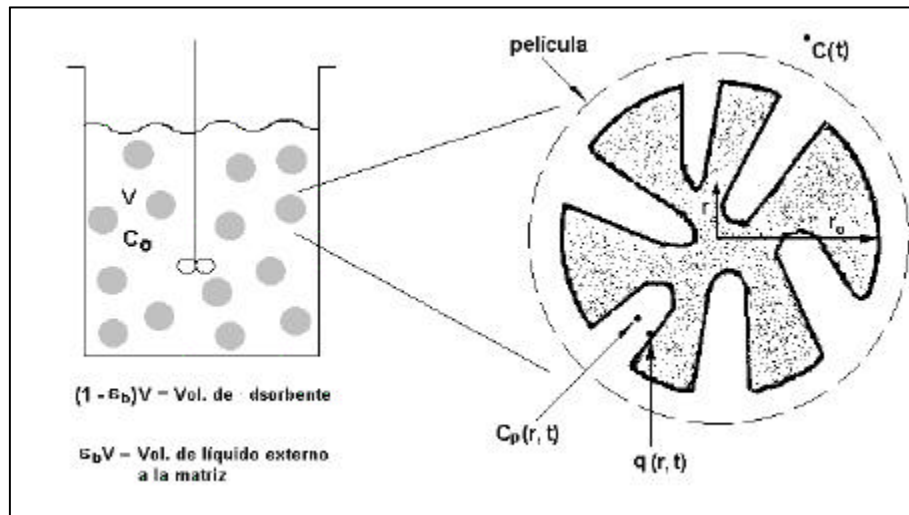
En este trabajo se considera un modelo de transporte de tres resistencias consecutivas para simular la adsorción por afinidad de proteínas en un sistema tipo tanque agitado. Las resistencias involucradas son: resistencia externa de la película, difusión interna en la partícula y velocidad de reacción química. La solución del modelo fue obtenida utilizando el método numérico de líneas (NUMOL). La solución numérica fue comparada con la solución analítica de un modelo simplificado que agrupa las resistencias a la transferencia de masa en una sola [11,20], y con datos experimentales obtenidos de la literatura de la adsorción de inmunoglobulina G a proteína A inmovilizada a una matriz de sefarosa [13].

2 Modelo de la adsorción por afinidad en un tanque agitado

2.1 Modelo físico

En esta investigación, se considera que la operación de afinidad se realiza en un tanque perfectamente agitado con un volumen total de sistema V (Figura 2.1). El volumen del líquido externo a la matriz adsorbente es $\beta_b V$ y el volumen de adsorbente es $(1 - \beta_b)V$; donde β_b es la razón de volumen de líquido a volumen del sistema tanque agitado. La concentración inicial de la solución es c_0 :

En la formulación del modelo se supone que la fase adsorbente está constituida por partículas esféricas de radio r_0 y porosidad β_p dentro de las cuales el soluto puede difundirse, en la forma descrita por la difusividad en el poro D . La transferencia de masa a la superficie del adsorbente está gobernada por un modelo de película caracterizado por un coeficiente de transferencia de masa k_f . La reacción de superficie entre el soluto y un sitio de adsorción está descrita por una reacción reversible de segundo orden. La reacción es isotérmica y su comportamiento en el equilibrio puede ser representado por la ecuación de Langmuir. Las partículas de adsorbente son de tamaño y densidad uniforme, y el ligando inmovilizado está bien distribuido en todo el interior de la partícula.



2.2 Modelo matemático

El proceso de adsorción por afinidad en un tanque agitado puede ser descrito mediante un balance de soluto en la partícula, un balance de soluto en el seno del líquido, una expresión cinética de la adsorción en la superficie y las condiciones iniciales y de frontera del sistema.

2.2.1 Balance de masa al interior de la partícula

El balance de masa realizado en el poro, toma en cuenta el flujo difusivo de soluto al interior de una partícula esférica de adsorbente, suponiendo únicamente dependencia radial, y la cinética de la adsorción. Bajo estas consideraciones, el balance de masa está dado por:

$$\epsilon_p \frac{\partial c_p}{\partial t} = \epsilon_p D \frac{\partial^2 c_p}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_p}{\partial r} \quad \text{y} \quad (1 - \epsilon_p) \frac{\partial q}{\partial t} \quad (1)$$

donde:

c_p : es la concentración de soluto en la fase líquida dentro de la partícula [mg/ml]

q : es la concentración puntual de soluto en el adsorbente [mg/ml de gel sólido].

ϵ_p : es la porosidad de la partícula

[vol: de líquido intersticial=vol: total de partícula]

r : es la coordenada radial [m].

D : es la difusividad dentro del poro [m^2/s]:

2.2.2 Balance de masa en el seno del líquido

El balance de masa en el seno del líquido considera la concentración de soluto en el seno del líquido, c , y la concentración de soluto que se encuentra a la entrada del poro en la superficie de la partícula, $c_p|_{r=r_0}$. Toma en cuenta además, la resistencia a la transferencia de masa que presenta la película. La velocidad de cambio de la concentración en el seno del líquido está dada por:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{3k_f}{r_0} \frac{r_0^3}{r_b^3} (c_i - c_p)|_{r=r_0} \quad (2)$$

donde:

- c : concentración de soluto en el seno del líquido
- r_b = vol: líquido = (vol: líquido + vol: adsorbente)
- r_0 : es el radio de la partícula
- k_f : es la resistencia de la película: [m=s] $\text{L}^2 \text{b}^{-1}$

2.2.3 Cinética de adsorción

En la cinética de adsorción se considera una interacción monovalente, reversible, de segundo orden entre una proteína P y el ligando inmovilizado S. La interacción se puede describir por la relación:



donde PS representa el complejo proteína ligando.

La velocidad de adsorción de la interacción descrita por la ec.(3) está dada por:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 c_p (q_m - q) - k_{-1} q \quad (4)$$

donde:

- q_m : es la capacidad máxima del adsorbente [mg=ml].
- k_1 : es la velocidad específica de adsorción [ml=mg \cdot s]:
- k_{-1} : es la velocidad específica de desorción [1=s].

En el equilibrio, $\frac{dq}{dt} = 0$ y la ec.(4) adquiere la forma de la ecuación de Langmuir

$$q^e = \frac{q_m c^e}{K_d + c^e} \quad (5)$$

donde $K_d = k_{-1}/k_1$, es la constante de disociación de la interacción proteína - ligando.

El modelo de Langmuir dado por la ec.(5), se ha adoptado con frecuencia para explicar el proceso de adsorción de una proteína a un sitio específico sobre un adsorbente de actividad. En este modelo el adsorbente de actividad es visualizado como un material que tiene un número de sitios no interactuantes idénticos sobre su superficie el cual puede aceptar solamente una simple molécula de soluto. Una vez que estos sitios están llenos con soluto no puede ocurrir adsorción adicional. Este análisis permite relacionar la cantidad de soluto ligada al adsorbente, q^a , con la concentración de proteína en solución, c^a cuando se establece el equilibrio.

2.2.4 Condiciones iniciales y de frontera

Las condiciones iniciales están dadas por:

$$\text{para } t = 0 \quad c_p = 0; \quad (6)$$

$$\text{para } t = 0 \quad q = 0; \quad (7)$$

$$\text{para } t = 0 \quad c = c_0; \quad (8)$$

La condición frontera para el cambio de la concentración de soluto con el tiempo en el centro de la partícula está dada por:

$$\text{en } r = 0; \quad \frac{\partial c_p}{\partial r} = 0; \quad (9)$$

La velocidad de transferencia de masa a través de la película externa relaciona la concentración en el seno del líquido con la concentración del líquido en el poro en la superficie de la partícula, de acuerdo a la condición de frontera siguiente:

$$\frac{\partial c_p}{\partial r} \Big|_{r=r_0} = \frac{k_f}{D_p} (c_i - c_p) \Big|_{r=r_0} \quad (10)$$

Las ecs.(1, 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 2.10) constituyen el modelo completo para la adsorción del soluto en el adsorbente en un tanque agitado.

2.3 Solución analítica

Para obtener una solución analítica del fenómeno de adsorción se requiere simplificar su descripción. En el enfoque más utilizado se supone que todas las resistencias que limitan el proceso de transferencia de masa pueden ser agrupadas en una sola. Entonces las velocidades k_1 y k_{-1} representan además de las velocidades de adsorción y desorción, las contribuciones de las demás resistencias y el proceso de adsorción por afinidad se describe simplemente por la expresión de Lagergren:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_1(c - q) - k_{-1}q$$

La solución analítica de este modelo es la siguiente [20]:

$$c = c_0 + \frac{1}{b} \left[\frac{2}{3} \frac{(b+a)}{b+a} \exp\left(-\frac{2a(1-q/b)}{b} k_1 t\right) - \frac{1}{3} \frac{(b+a)}{b+a} \exp\left(-\frac{2a(1-q/b)}{b} k_1 t\right) \right] \quad (11)$$

donde:

$$a^2 = b^2 \left(\frac{c_0 - q_m}{1 - q/b} \right) \quad \text{y} \quad b = \frac{1}{2} \left(\frac{c_0 - q_m}{1 - q/b} + q_m + \frac{K_d q_m}{1 - q/b} \right)$$

2.4 Solución numérica del modelo matemático

En esta investigación, para resolver el modelo matemático de tres resistencias se utilizó el método numérico de líneas [14]. Se empleó una malla espacial para representar el valor de la variable dependiente con respecto a la variable de posición (Figura 2.2). En la malla, la posición se denota por el índice i ; el número de puntos es n ; y la longitud del sistema x_L . De esta forma $i = 1$ e $i = n$ corresponden a los extremos físicos del sistema en estudio.

El método NUMOL consiste en discretizar las derivadas espaciales del modelo en cada uno de los puntos de la malla, utilizando una aproximación por diferencias finitas; de tal manera que como se muestra en la Figura 2.2, no es necesario incluir a la variable x como argumento de la función. Entonces, el problema se reduce

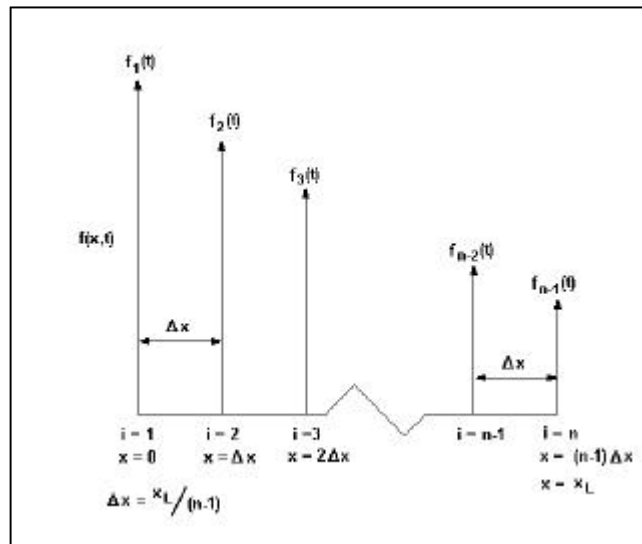


Figure 1: Discretización por el método de líneas.

a resolver un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias. Este sistema puede integrarse mediante diferentes métodos de integración (Euler, Runge-Kutta, etc.).

En este trabajo, la aproximación de las derivadas espaciales del modelo se llevaron a cabo utilizando una aproximación de cuarto orden tanto para la primera como para la segunda derivada espacial. La aproximación de la derivada se realizó tomando cinco puntos de la malla, de tal manera que la aproximación de cuarto orden para la primera derivada puede escribirse en notación matricial como:

$$\frac{dC}{dx} = \frac{1}{4! \Delta x} [A][B] + O(\Delta x)^4 \quad (12)$$

donde:

Table 1: Datos del caso base utilizados en los estudios de simulación de adsorción de I_gG a proteína A inmovilizada a una matriz de Sepharose, en un tanque agitado [13]

Variable	Valor
Concentración inicial de proteína en el tanque	$c_o = 0.5 \text{ mg/ml}$
Capacidad máxima de adsorción	$q_{ms} = 40 \text{ mg/ml}$
Constante de equilibrio	$K_d = 0.019 \text{ mg/ml}$
Constante cinética de adsorción agrupada	$k_1 = 0.001 \text{ ml=mg j s}$
Diámetro de la partícula	$d_p = 90 \text{ }^1\text{m}$
Coe...ciente de transferencia de masa de la película	$k_f = 4 \text{ } \text{E} 10^i \text{ }^6 \text{ m=s}$
Difusividad intrapartícula de la proteína	$D = 6 \text{ } \text{E} 10^i \text{ }^{12} \text{ m}^2=\text{s}$
Porosidad de la partícula	$\epsilon_p = 0.96$
Porosidad del lecho por adsorbente sedimentado	$\epsilon = 0.35$
Capacidad máxima de adsorción por gel sólido	$q_m = 1538.46 \text{ mg/ml}$
Volumen inicial de líquido en el tanque	25 ml
Suspensión de adsorbente agregada en 1:1 (v/v)	0.5 ml
Razón de volumen de líquido a volumen del sistema	$\epsilon_b = 0.9936$

3 Datos de entrada del sistema experimental

En este trabajo, para conducir los estudios de simulación en un tanque agitado se utilizaron los datos experimentales de la literatura que aparecen en la Tabla 3.1. Estos datos corresponden a la adsorción por afinidad de inmunoglobulina G a proteína A inmovilizada a una matriz de sefarosa [13].

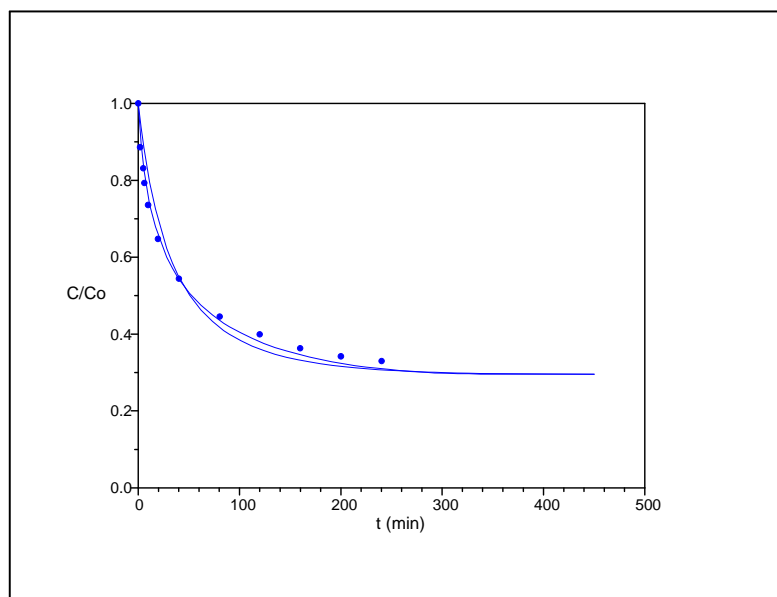


Figure 2: Adsorción por afinidad de inmunoglobulina G a proteína A-Sepharose CL-6B en un tanque agitado: \bullet datos experimentales; _____ simulación NUMOL; - - - - - solución analítica.

4 Resultados y discusión

En esta investigación, la solución al modelo de transporte para la adsorción por afinidad de inmunoglobulina G a proteína A inmovilizada a una matriz de sefarosa en un tanque agitado, fue obtenida mediante el método NUMOL. Esta solución fue comparada con la solución analítica del modelo de parámetros agrupados y con los datos experimentales.

La Figura 4.1 muestra que la predicción del comportamiento de la adsorción por afinidad obtenida tanto con la solución del método de líneas como con la solución analítica, se ajusta muy bien a los datos experimentales en la parte inicial de la curva. Una vez transcurrido el proceso de adsorción y que la resistencia a la difusión en el poro es más significativa, el ajuste sigue siendo bueno sólo con la solución obtenida mediante el método de líneas. Esta diferencia es explicable debido a que en el modelo analítico el efecto de la difusividad en el poro y la resistencia de la película están agrupados en la constante cinética k_1 . La curva obtenida con la solución por el método de líneas se ajustó bien a los datos experimentales cuando se usaron los valores base de los parámetros que se presentan en la Tabla 3.1, excepto el valor

tomado para el coeficiente cinético de adsorción que fue $k_1 = 0.03 \text{ ml}=\text{mg} \text{ j } \text{ s}$, puesto que en el modelo de transporte éste no es un parámetro agrupado. Este resultado sugiere que la adsorción está controlada únicamente por las resistencias de poro y película.

5 Conclusiones

Mediante esta investigación se logró analizar y predecir el comportamiento de procesos de adsorción de a...nidad en sistemas tipo tanque agitado para conducir las operaciones de a...nidad en el procesamiento de proteínas de importancia industrial.

El proceso de adsorción por a...nidad fue descrito mediante un modelo de transporte que considera tres resistencias controlantes en el mecanismo de transferencia de masa. Este modelo fue utilizado para describir y predecir el comportamiento de la adsorción por a...nidad de inmunoglobulina G a proteína A inmovilizada en una matriz de sefarosa, mediante la simulación del proceso de adsorción en programas de computadora. El modelo matemático fue resuelto utilizando el método numérico de líneas. La solución obtenida fue comparada con la solución analítica encontrada con el modelo de resistencias agrupadas y con datos experimentales tomados de la literatura para este sistema. La dinámica del sistema fue descrita más adecuadamente mediante el modelo de transporte considerando sólo dos resistencias limitantes. Los resultados obtenidos sugieren que el enfoque desarrollado puede ser utilizado como marco para obtener una descripción general realista para casi todos los sistemas de interés práctico, cuando se utilizan parámetros precisos y una solución numérica apropiada para el modelo.

Referencias

1. Arnold, F.H.; Blanch, H.W. and Wilke, C.R.(1985). I. Predicting the performance of affinity adsorbers. II. The characterization of affinity columns by pulse techniques. *Chem. Eng. J.* 30 B9-B36.
2. Clonis, Y.D. (1990). Process affinity chromatography. En: *Separation Processes in Biotechnology*. (Ed.: Asenjo, J.A). Marcel Dekker, New York. pp 401-445.
3. Steinberg, F.M. and Raso, J. (1998). *Biotech pharmaceuticals and biotherapy*. American Council on Science and Health. New York. 1-31.
4. Liapis, A.I. (1990). Modelling affinity chromatography. *Sep. Purif. Meth.* 19, 133-210.
5. Boschetti, E. (1994). Advanced sorbents for preparative protein separation purposes. *J. Chromatogr. A.* 658, 207-236.
6. McCoy, B.J. (1991). Theory of affinity chromatography, in *Chromatographic and Membrane Processes in Biotechnology*. (Ed. Acosta, C.A. and Cabral, J.S). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp 297-308.
7. Kempe, H.; Axelsson, A.; Nilsson, B. and Zacchi, G. (1999). Simulation of chromatographic processes applied to separation of proteins. *J. Chromatogr. A.* 846, 1-12
8. Fahrner, R.L.; Iyer, H.V. and Blank, G.S. (1999). The optimal flow rate and column length for maximum production rate of protein A affinity chromatography. *Bioprocess Eng.* 21, 287-292
9. Tejeda, A.; Noriega, J.A.; Ortega, J. and Guzmán, R. (1998). Modelling regeneration effects on dye-ligand affinity chromatography. *Biotechnol. Prog.* 14, 493-495.
10. Liapis, A.I. and Unger, K.K. (1994). The chemistry and engineering of affinity chromatography, in *Highly Selective Separations in Biotechnology*. (Ed. Steet, G.). Chapman and Hall. Glasgow, N.Z. pp. 121-162.
11. Chase, H.A. (1984). Predictions of the performance of preparative affinity chromatography. *J. Chromatogr.* 297, 179-202.
12. Arve, B.H. and Liapis, A.I. (1987). Modelling and analysis of bio-specific adsorption in a finite bath. *AIChE J.* 33, 179-193.

13. Horstmann, B.J. and Chase, H.A. (1989). Modelling the affinity adsorption of immunoglobulin G to protein A immobilised to agarosa matrices. *Chem. Eng. Res. Des.* 67, 243-254.
14. Silebi, C.A. and Schiesser, W.E. (1992). Dynamic modeling of transport process systems. Academic Press Inc. San Diego, Ca. p. 518.
15. Schiesser W.E. and Silebi, C.A. (1997). *Computational Transport Phenomena: Numerical methods for the solution of transport problems.* Cambridge University Press. Cambridge, U.K. p. 457.
16. Campo, A. (2001). Numerical study of turbulent flow with heat removal from a plate using the finite volume-based method of lines. *International Journal of numerical methods for heat and fluid flow.* 11, 5/6, 511-523.
17. Ma, J.G.; Chia, T.K.; Tan, T.W.; See, K.Y. (2000). Electromagnetic wave scattering from 2-D cylinder by using the method of lines. *Microwave and optical technology letters.* 24, 4, 275-277.
18. Selcuk, N; Kirbas, G. (2000). The method of lines solution of the discrete ordinates method for radiative heat transfer in enclosures. *Numerical heat transfer. Part B, fundamentals.* 37, 3, 379-392
19. Costa, C. and Rodrigues, A. (1986). Numerical methods for the solution of adsorption models, in *Adsorption: Science and Technology.* (Ed. Rodrigues, A.). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 257-265.
20. Skidmore, G.L.; Horstmann, B.J. and Chase, H.A. (1990). Modelling single component protein adsorption to the cation exchanger Sepharose FF. *J. Chromatogr.* 498, 113-128.