



Avaliação de uma Nova Configuração de Hidrociclone para Separação de Células Animais

Felipe Valle do Nascimento

Sara Oliveira Toscano

Projeto Final em Engenharia de Bioprocessos

Orientadores

Prof^a. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.

Fevereiro de 2014

AVALIAÇÃO DE UMA NOVA CONFIGURAÇÃO DE HIDROCICLONE PARA SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ANIMAIS

Felipe Valle do Nascimento

Sara Oliveira Toscano

Projeto Final em Engenharia de Bioprocessos submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Aprovado por:

Alvio Figueredo-Cardero, D. Sc.

Rodrigo Coelho Ventura Pinto, D. Sc.

Prof^a. Suely Pereira Freitas, D. Sc.

Orientado por:

Prof^a. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Fevereiro de 2014

Nascimento, Felipe Valle; Toscano, Sara Oliveira.

Avaliação de uma Nova Configuração de Hidrociclone para Separação de Células Animais/ Felipe Valle do Nascimento e Sara Oliveira Toscano. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2014.

ix, 41 p.;il.

(Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2014.

Orientadores: Ricardo de Andrade Medronho e Leda dos Reis Castilho.

1. Hidrociclone. 2. Células animais. 3. Separação celular. 4. Projeto Final de Curso (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Ricardo de Andrade Medronho, Leda dos Reis Castilho. I. Avaliação de uma Nova Configuração de Hidrociclone para Separação de Células Animais.

Aos nossos pais, Maria de Fátima e Jailton, Marilda e Zanoni, por todo o apoio e dedicação.

Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los.

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Aos nossos pais, Maria de Fátima e Jailton, Marilda e Zanoni, por todo o apoio, dedicação, paciência e compreensão que tiveram conosco durante toda a vida.

Aos orientadores Ricardo Medronho e Leda Castilho, por todo o apoio, ensinamentos e disponibilidade.

A toda a equipe do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC) por toda a ajuda, companheirismo e momentos agradáveis passados durante a realização do projeto.

Ao Rodrigo Pinto pelos bons conselhos sobre a execução dos experimentos.

Aos nossos amigos pelo apoio e compreensão durante os momentos mais difíceis da graduação.

Resumo do Projeto Final apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

AVALIAÇÃO DE UMA NOVA CONFIGURAÇÃO DE HIDROCICLONE PARA SEPARAÇÃO DE CÉLULAS ANIMAIS

Felipe Valle do Nascimento

Sara Oliveira Toscano

Fevereiro, 2014

Orientadores: Prof^a.Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.
Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.

As células animais são cultivadas para a produção industrial de diversos biofármacos e vacinas. O modo de operação que proporciona maior produtividade volumétrica para o cultivo desse tipo de célula é a perfusão, modo no qual o cultivo é conduzido continuamente, retendo-se células no interior do biorreator. Assim, faz-se necessário a utilização de um equipamento de separação sólido-líquido para a retenção celular. Este trabalho apresenta o estudo de um hidrociclone projetado especialmente para a separação de células animais do meio de cultivo. Testes empregando células da linhagem CHO foram realizados para avaliar o hidrociclone com três configurações diferentes para a saída do *underflow* quanto às eficiências de separação total e granulométrica e à queda de viabilidade celular das células da corrente concentrada. Foram obtidas eficiências totais de separação superiores a 83,9 % e quedas de viabilidade menores que 16,5 % para as configurações testadas experimentalmente. Os valores de eficiências reduzidas encontrados foram baixos, indicando que o principal fator responsável pelos resultados obtidos para eficiência total é a divisão da corrente de alimentação em *underflow* e *overflow*, caracterizada pela razão de fluido (R_f), o que mostra que o funcionamento do equipamento em si não foi eficaz para a separação. Ainda, a descarga do tipo corda parece ter afetado a eficiência reduzida de separação, de forma que um aumento na razão de fluido (R_f) provoca a diminuição da eficiência reduzida.

Palavras-chave: Hidrociclone, Cultivo de Células Animais, Perfusão.

Abstract of a Final Project presented to Escola de Química/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Bioprocess Engineer.

EVALUATION OF A NEW HYDROCYCLONE CONFIGURATION FOR ANIMAL CELLS SEPARATION

Felipe Valle do Nascimento

Sara Oliveira Toscano

February, 2014

Supervisors: Prof^ª. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.
Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.

Animal cells are cultivated for industrial production of many biopharmaceuticals and vaccines. The operation mode that gives the highest volumetric productivities in animal cell processes is perfusion, which is conducted continuously with cell retention inside the bioreactor. Thus, a solid-liquid separation device for cell retention is required. This work presents a study of a hydrocyclone specially designed for animal cell separation from cell culture medium. Tests were performed using Chinese hamster ovary cells to evaluate the hydrocyclone with three different configurations for the underflow exit regarding its total and grade efficiencies and the cell viability in the concentrated underflow stream. Total separation efficiencies exceeding 83.9 % and viability drops of less than 16.5 % were obtained for the tested experimental conditions. Reduced efficiencies were quite low, indicating that the main factor responsible for the reasonably high total efficiencies was the feed flow split between underflow and overflow, characterized by the flow ratio (R_f), showing that the operation of the device was not effective for the separation. Furthermore, the rope discharge appears to have affected the reduced separation efficiency, so that an increase in the flow ratio (R_f) caused a reduced efficiency decrease.

Keywords: Hydrocyclone, Animal Cells Culture, Perfusion.

ÍNDICE

I.	Introdução	1
II.	Revisão bibliográfica	3
II.1.	Cultivo de células animais: características e aplicações	3
II.2.	Linhagens celulares	5
II.3.	Modos de operação de processos de cultivo celular	6
II.3.1.	Batelada simples	6
II.3.2.	Batelada alimentada	7
II.3.3.	Perfusão	8
II.4.	Equipamentos de retenção celular	10
II.4.1.	Sedimentador gravitacional	11
II.4.2.	Filtração	13
II.4.2.1.	Filtro de malha rotativa (<i>spin-filter</i>)	13
II.4.2.2.	Filtro com fluxo tangencial alternado (ATF)	14
II.4.3.	Hidrociclones	16
III.	Metodologia	19
III.1.	Projeto do hidrociclone	19
III.2.	Cultivo das células CHO	21
III.3.	Análise de viabilidade celular e distribuição de tamanho de células	22
III.4.	Testes de operação de bombas	22
III.5.	Testes de separação	23
III.6.	Ajuste de dados aos modelos de distribuição cumulativa e cálculos de eficiência de separação	23
III.6.1.	Modelos de distribuição de tamanho	23
III.6.2.	Cálculo de eficiência de separação	24
IV.	Resultados e Discussão	27
IV.1.	Geometria do hidrociclone e testes de R_f com água	27
IV.2.	Testes preliminares com bombas	27

IV.3. Eficiência de separação	28
IV.3.1. Eficiência total e reduzida de separação	28
IV.3.2. Eficiência granulométrica total e reduzida	31
V. Conclusão	35
Referências bibliográficas	36
Apêndice A1 – Desenho técnico do hidrociclone projetado	40

I. Introdução

Células animais vêm sendo empregadas, já há muitos anos, na obtenção de produtos farmacêuticos como vacinas e proteínas terapêuticas. Para isso, idealmente, essas células devem ser cultivadas em condições ótimas que garantam a adequada formação do produto em concentrações significativas para poderem ser comercializados.

Assim, ao longo do tempo, têm sido estudadas diferentes técnicas de cultivo variando-se meio de cultivo, tipo de biorreator, tempo de cultivo, entre outras condições de cultura, com o objetivo de alcançar maiores concentrações celulares e de produto. Outro parâmetro que também vem sendo estudado é o modo de operação. As células podem ser cultivadas em modo de batelada simples, batelada alimentada, contínuo ou perfusão. O último é um modo contínuo com retenção de células dentro do biorreator, o que faz com que grandes concentrações celulares possam ser obtidas, além de proporcionar uma maior facilidade no controle da operação, já que o cultivo pode ser conduzido em regime estacionário, com remoção controlada de células.

Em cultivos em perfusão, existe a necessidade de um equipamento de separação sólido-líquido para a retenção celular. Estes são dispositivos que agem separando as células principalmente por sedimentação (gravitacional ou centrífuga) ou por filtração e podem ser posicionados interna ou exteriormente ao biorreator. Esses equipamentos devem fornecer altas eficiências de separação e ser capazes de separar as células sem afetar a sua viabilidade, além de oferecer a possibilidade de serem operados ininterruptamente por longos períodos de tempo.

Os hidrociclones são equipamentos de separação celular cuja primeira patente data de 1891 (Bretney, 1891), porém que têm sido estudados para separação de células animais apenas desde a década passada. Não possuem partes móveis e não requerem manutenção durante a operação, sendo, portanto, adequados para operação sob condições assépticas e, por causa do reduzido tempo de residência das células no interior do equipamento, não afetam significativamente a viabilidade celular do cultivo (Castilho e Medronho, 2002; Castilho e Medronho, 2008).

O objetivo do presente trabalho foi estudar o desempenho de um hidrociclone projetado especialmente para a separação de células animais, com três configurações de saída de *underflow* diferentes, utilizando células da linhagem CHO (*Chinese hamster ovary*) nos testes de separação. O hidrociclone foi avaliado quanto às eficiências de separação total e granulométrica e aos efeitos que a operação do hidrociclone causa sobre a viabilidade celular de acordo com a influência da razão de fluido, da geometria e da queda de pressão no equipamento.

II. Revisão bibliográfica

II.1. Cultivo de células animais: características e aplicações

O cultivo de células animais é estudado há mais de cem anos, de quando são datados os primeiros experimentos com cultivos de fragmentos de tecidos em plasma. No entanto, o sucesso desses experimentos era limitado pela qualidade do fluido nutriente e pela esterilidade do material utilizado. Tais obstáculos foram ultrapassados através de pesquisas acerca do requerimento de nutrientes das células quando mantidas *in vitro*, do desenvolvimento de técnicas de esterilização e do início da utilização de antibióticos (Kretzmer, 2002).

Há sessenta anos, o primeiro processo industrial a partir de células animais foi concebido para a produção da vacina contra a poliomielite em células de rim de macaco, que cresciam aderidas (Griffiths, 2000 *apud* Kretzmer, 2002). Uma década depois, células BHK (*baby hamster kidney*) foram cultivadas em suspensão, da mesma maneira que microrganismos, o que alavancou o uso industrial de células animais.

Primeiramente, os produtos obtidos industrialmente a partir de células animais eram unicamente nativos, ou seja, substâncias produzidas naturalmente pelas células. Entre eles estão as vacinas, os interferons e os anticorpos monoclonais. Na década de 80, a partir dos avanços da tecnologia do DNA recombinante, foi possível a produção dos primeiros produtos não nativos, as proteínas recombinantes, através da expressão de genes heterólogos em células animais. O primeiro produto desse tipo a ser produzido industrialmente foi o tPA (ativador do plasminogênio tecidual humano), uma proteína que dissolve os coágulos do sangue no tratamento de infartos. Essa proteína, em organismos saudáveis, é excretada naturalmente por células animais em concentrações muito baixas, o que tornaria inviável a sua produção por meio da purificação a partir do fluido de doadores. Com a tecnologia do DNA recombinante, contudo, tornou-se possível a sua produção na forma recombinante para uso terapêutico. (Kretzmer, 2002). A Tabela 1 mostra alguns produtos oriundos da tecnologia do DNA recombinante licenciados até hoje.

Tabela 1 - Exemplos de produtos aprovados, obtidos pelo cultivo de células animais (Mellado e Castilho, 2008; Alves *et al.*, 2008).

Produto	Proteína	Indicação	Célula	Ano de aprovação
Activase [®]	tPA	Infarto agudo do miocárdio	CHO	1986
Epogen [®]	Eritropoietina	Anemia	CHO	1989
Kogenate [®]	Fator VIII	Hemofilia A	BHK	1993
Gonal-f [®]	Hormônio folículo-estimulante	Infertilidade feminina	CHO	1995
Avonex [®]	Interferon- β	Esclerose múltipla	CHO	1996
BeneFIX [®]	Fator IX	Hemofilia B	CHO	1997
Herceptin [®]	Anticorpo monoclonal	Câncer de mama	CHO	1998
Simulect [®]	Anticorpo monoclonal humanizado	Rejeição aguda a transplante renal	Mieloma de rato	1998
Campath [®]	Anticorpo monoclonal humanizado	Leucemia	CHO	2001
Xolair [®]	Anticorpo monoclonal humanizado	Asma	CHO	2003
Avastin [®]	Anticorpo monoclonal humanizado	Carcinoma de colo ou reto	CHO	2004

Células animais são utilizadas como hospedeiras para a produção de proteínas heterólogas por sintetizarem e excretarem as proteínas diretamente para o meio, o que simplifica a sua recuperação e purificação e, principalmente, por serem capazes de sintetizar adequadamente complexas proteínas humanas. Isto ocorre porque as células animais são capazes de realizar, nas proteínas sintetizadas, modificações pós-traducionais como carboxilações, hidroxilações, sulfatações, fosforilações e glicosilações. Além disso, proteínas multiméricas podem ter suas subunidades devidamente ligadas entre si (Adamson, 1994). Células microbianas não são capazes de efetuar tais modificações pós-traducionais necessárias à correta formação das proteínas. (Bonham-Carter *et al.*, 2011).

Basicamente, as técnicas de cultivo de células animais apresentam similaridades àquelas empregadas para bactérias, fungos e leveduras, com algumas diferenças características (Léo *et al.*, 2008). Por exemplo, células animais não possuem parede celular, sendo protegidas apenas pela membrana celular. Assim, elas apresentam alta sensibilidade ao estresse mecânico e isto deve ser considerado no desenvolvimento dos processos de cultivo e separação das células (Castilho e Medronho, 2008). Além disso, apresentam baixas taxas de crescimento e requerem meios de cultivo complexos e substratos específicos (Augusto e Oliveira, 2001). Dessa maneira, cultivos de células animais devem ser realizados sob condições assépticas rigorosas, já que as células animais crescem mais lentamente que a maioria dos contaminantes usuais, como bactérias e fungos (Léo *et al.*, 2008).

II.2. Linhagens celulares

Um grande passo para o uso industrial de células animais foi a aceitação das linhagens celulares contínuas pelas agências regulatórias. Linhagens celulares contínuas podem crescer indefinidamente, têm requerimentos para crescimento menos rigorosos e podem, normalmente, ser cultivadas em suspensão. Além disso, a eliminação do requerimento de superfícies sólidas nos cultivos em suspensão permite o aumento de escala por volume e permite que as células cresçam em biorreatores usando métodos bem estabelecidos, similares aos usados para sistemas microbianos, facilitando o controle e o monitoramento do cultivo (Ozturk, 2006).

BHK (*baby hamster kidney*), CHO (*Chinese hamster ovary*), células de mieloma (SP2/0, NS0) e HEK (*human embryonic kidney*) são as linhagens mais utilizadas industrialmente na produção de biofármacos. (Ozturk, 2006; Shen *et al.*, 2006).

As linhagens celulares contínuas, quando comparadas a linhagens de crescimento finito, têm as seguintes vantagens: crescimento celular mais rápido, atingindo altas densidades celulares em biorreatores e a possibilidade de utilizar meios de cultura disponíveis no mercado, sendo especialmente interessantes os meios livres de soro e de proteínas (Alves *et al.*, 2008).

Não há restrições quanto ao tipo de célula hospedeira que pode ser usada para produção comercial desde que as células apresentem as seguintes características:

forneçam altos níveis de expressão do produto por um longo período em cultura; mantenham sua capacidade de produção em cultivos em larga escala; consigam alcançar e manter altos níveis de densidade de células viáveis durante um processo; apresentem capacidade de processamento pós-traducional apropriado; possam ser apropriadamente caracterizadas assegurando que a célula é livre de agentes adventícios, especialmente vírus (segurança relacionada a oncogenes) (Shen *et al.*, 2006).

II.3. Modos de operação de processos de cultivo celular

II.3.1. Batelada simples

Em processos conduzidos em batelada simples, como mostrado na Figura 1, as células são inoculadas em um determinado volume de cultura. Nele, as células são cultivadas de maneira descontínua, sem a adição de nutrientes após a inoculação (Chico-Véliz *et al.*, 2008). Quanto maior a necessidade de produto no final da batelada, maior deve ser o volume do sistema (Bonham-Carter *et al.*, 2011).

Os processos em batelada são caracterizados por um gradiente de concentração de nutrientes e metabólitos ao longo do processo, uma vez que os nutrientes são consumidos e metabólitos tóxicos produzidos são acumulados no sistema, levando à diminuição da taxa de crescimento e à queda da viabilidade celular por consequência da morte das células (Bonham-Carter *et al.*, 2011; Kretzmer, 2002). Esses processos são caracterizados pela alta simplicidade operacional, o que diminui os riscos de contaminação, e pela baixa produtividade, consequência da baixa concentração de células obtida num único cultivo (Chico-Véliz *et al.*, 2008).

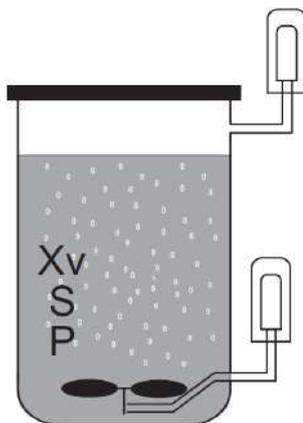


Figura 1 - Cultivo em batelada, onde X_v , S e P representam, respectivamente, as concentrações de células viáveis, de substrato e de produto no interior do reator.

(Chico-Véliz *et al.*, 2008).

Para contornar essa baixa produtividade, pode-se fazer uso de uma variante desse modo de operação, conhecida como “bateladas repetidas”. Essa variante consiste em, inicialmente, conduzir um cultivo em batelada até se obter dada concentração de produto. Nesse momento, apenas uma parte do conteúdo do biorreator é coletada (por exemplo, metade do volume do cultivo). O restante da suspensão de células que permanece no biorreator é usado diretamente como inóculo para uma nova batelada, completando o volume do biorreator com meio novo. Esse procedimento pode ser repetido várias vezes, de acordo com a estabilidade das células até que ocorra uma diminuição no crescimento celular ou na formação de produto. O uso das “bateladas repetidas” permite a redução do tempo não produtivo do biorreator acarretado pela limpeza e esterilização requeridas entre cada ciclo de batelada (Chico-Véliz *et al.*, 2008).

II.3.2. Batelada alimentada

Processos em batelada alimentada são caracterizados pela adição de nutrientes durante o cultivo, de maneira a substituir aqueles que foram consumidos pelas células (Figura 2). Culturas em batelada alimentada são iniciadas com um volume de trabalho menor do que o máximo, para que os nutrientes possam ser adicionados em forma de meio de cultivo novo ou de uma solução de nutrientes concentrada (Chico-Véliz *et al.*, 2008).

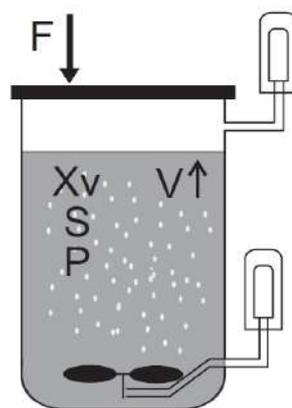


Figura 2 - Batelada alimentada, onde X_v , S , P , V e F representam, respectivamente, as concentrações de células viáveis, de substrato e de produto no interior do reator, o aumento do volume e a adição de nutrientes. (Chico-Véliz *et al.*, 2008).

Nesse modo de operação, a densidade e a viabilidade celulares, assim como a produtividade e o rendimento, podem ser aumentadas, quando comparados à batelada simples. No entanto, de qualquer maneira, ocorre um decaimento da taxa de crescimento celular ao longo do cultivo, consequência do consumo de nutrientes essenciais e do acúmulo de subprodutos que limitam o crescimento celular (Bonham-Carter *et al.*, 2011; Kretzmer, 2002).

Uma desvantagem dos cultivos em batelada alimentada é o longo tempo de residência do produto no biorreator. Nesse período, as moléculas de produto podem ser degradadas por proteases presentes no meio, liberadas de células mortas. Assim, produtos que são instáveis nas condições de cultivo ou susceptíveis ao ataque enzimático de proteases não devem ser produzidos por cultivos em batelada alimentada (Chico-Véliz *et al.*, 2008).

II.3.3. Perfusão

Em processos de cultivo em perfusão, as células são cultivadas em modo contínuo utilizando um equipamento de retenção celular para manter as células dentro do biorreator (Figura 3). Assim, é possível superar a maior limitação dos cultivos contínuos: a baixa produtividade devida à perda de células na saída do biorreator (Chico-Véliz *et al.*, 2008). Além disso, a viabilidade e a produtividade do cultivo são mantidas através da remoção contínua de subprodutos tóxicos (Bonham-Carter *et al.*, 2011).

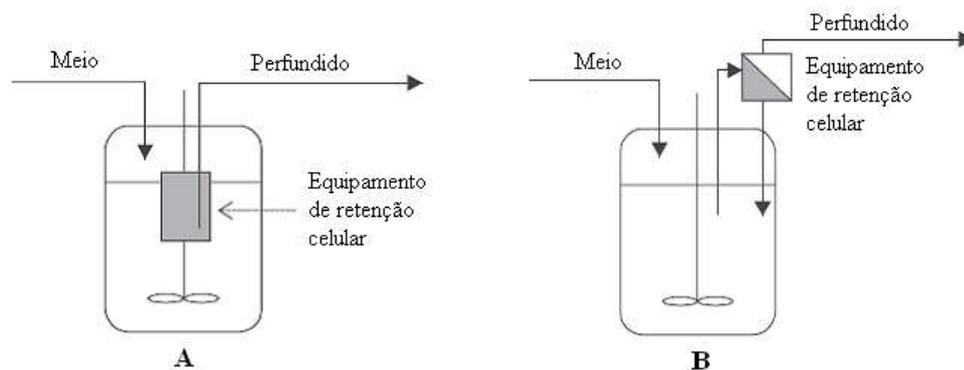


Figura 3 - Processos em perfusão com equipamento de retenção interno (A) e externo (B). Adaptado de Castilho e Medronho (2008).

Esse modo de operação permite manter um cultivo com alta densidade celular por um longo período de tempo (até meses) com uma elevada vazão de perfundido e elevada concentração de produto (Chico-Véliz *et al.*, 2008). Outra característica importante dos processos em perfusão é a sua estabilidade. O processo pode ser operado em estado estacionário por longos períodos de tempo, obtendo-se um produto de qualidade inalterada em diferentes tempos de cultivo (Kretzmer, 2002). Além disso, o reduzido tempo de residência do produto no biorreator faz desse modo de operação o ideal para a produção de moléculas lábeis (Chico-Véliz *et al.*, 2008).

Os cultivos em perfusão apresentam duas principais vantagens em relação aos cultivos em batelada. Primeiramente, o alto grau de controle do cultivo. Nos cultivos em perfusão, as condições ótimas sobre os componentes do meio podem ser mantidas constantes resultando em um estado estacionário. A segunda vantagem é a grande redução do volume de trabalho necessário para a obtenção de uma mesma quantidade de produto. As densidades celulares podem ser até trinta vezes maiores do que as obtidas em sistemas sem retenção de células, o que aumenta a quantidade de produto obtido, podendo-se então reduzir o volume de trabalho, o que, por sua vez, também facilita o controle do processo (Boedeker, 1992).

Uma desvantagem desse modo de operação é a maior complexidade na sua operação quando comparado aos outros citados neste trabalho, apresentando assim maiores riscos de contaminação (Chico-Véliz *et al.*, 2008).

II.4. Equipamentos de retenção celular

Após o cultivo celular, a etapa de separação celular é geralmente necessária para o processamento do meio de cultura para a posterior purificação do produto. Esta etapa é realizada tanto para obter um meio isento de célula, no caso de um produto extracelular, quanto para obter um concentrado de células, se o produto é intracelular (Castilho e Medronho, 2008).

Quando o cultivo é operado nos modos de batelada ou batelada alimentada, a separação celular é conduzida após o término do cultivo. Já nos cultivos em perfusão, o equipamento de retenção pode ser posicionado dentro ou fora do biorreator (Castilho e Medronho, 2008). Enquanto que equipamentos internos ao biorreator permitem uma operação mais simples e segura (Fenge *et al.*, 1993), equipamentos externos admitem que seus parâmetros de operação e escalonamento sejam completamente independentes da operação e do projeto do biorreator. Além disso, também é possível a substituição do equipamento de forma asséptica em caso de falha durante operações de longa duração, permitindo que o cultivo não seja interrompido (Castilho e Medronho, 2002).

No caso das células animais, a separação celular é uma operação delicada devido à alta sensibilidade desse tipo de células ao estresse mecânico. Ainda, quando cultivadas em suspensão, essas células tendem a aderir às superfícies do equipamento, o que pode gerar problemas de entupimento (Castilho e Medronho, 2008).

Idealmente, um equipamento de retenção celular deve operar satisfatoriamente durante o tempo de cultivo necessário sem haver necessidade de substituição ou manutenção do mesmo, de maneira a minimizar riscos adicionais de contaminação. O equipamento não deve afetar adversamente a viabilidade ou produtividade celulares e, independentemente da concentração celular, deve, de preferência, separar praticamente todas as células viáveis, deixando que as células não viáveis passem por ele, de forma a manter uma alta concentração de células viáveis no biorreator (Woodside, 1998). O equipamento também deve ser esterilizável, mantendo a assepsia do sistema (Roth *et al.*, 1997 *apud* Castilho e Medronho, 2002).

Os equipamentos de retenção celular são normalmente baseados na ação centrífuga (centrífugas, hidrociclones), sedimentação gravitacional, filtração (filtros de malha rotativa, tangenciais e dinâmicos) e nas separações ultrassônica e di-eletrorforética (Castilho e Medronho, 2002).

Neste trabalho, serão descritos com mais detalhes equipamentos de filtração e sedimentação, por serem os mais utilizados (Woodside, 1998). No entanto, apenas sedimentadores e filtros com fluxo tangencial alternado estão entre os equipamentos que podem ser utilizados industrialmente. (Kompala e Ozturk, 2006)

II.4.1. Sedimentador gravitacional

Em um sedimentador gravitacional, as células são separadas do meio pela ação do campo gravitacional. Assim, esse tipo de separação depende do tamanho das células e da diferença de densidade entre as células e o meio (Castilho e Medronho, 2002). No caso de células animais, essa diferença é muito pequena, já que, em geral, estas células apresentam densidade apenas 5% maior que a do meio líquido (Woodside *et al.*, 1998). Além disso, as células animais apresentam um reduzido tamanho, que varia entre 8 e 40 μm (Medronho, 2003). Essas duas características fazem com que as células animais apresentem baixas velocidades de sedimentação (de 1 a 15 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$ em um meio de cultura a 37°C) (Castilho e Medronho, 2002), resultando em longos tempos de residência da célula no separador, que não é um ambiente oxigenado, o que pode ser prejudicial para a manutenção da viabilidade celular (Woodside *et al.*, 1998). Outra consequência das baixas velocidades de sedimentação é a reduzida eficiência de separação causada pelo arraste de células. Assim, para contornar esse problema, a área do sedimentador deve ser grande o suficiente para evitar a perda de células pela corrente diluída (Castilho e Medronho, 2008).

Os sedimentadores são equipamentos simples e, na maioria dos casos, não apresentam partes móveis, o que facilita a operação sob condições assépticas (Castilho e Medronho, 2008). Existem dois tipos principais de sedimentadores: os verticais e os lamelados, ambos representados na Figura 4.

Os sedimentadores lamelados apresentam um grande número de placas inclinadas, chamadas lamelas, que são empacotadas no sedimentador de maneira

que a distância entre elas seja pequena. A gravidade faz com que as células sedimentem sobre a lamela imediatamente abaixo delas. As células deslizam pela lamela até a parte inferior do equipamento, deixando o mesmo por meio de uma corrente concentrada em células (Castilho e Medronho, 2008).

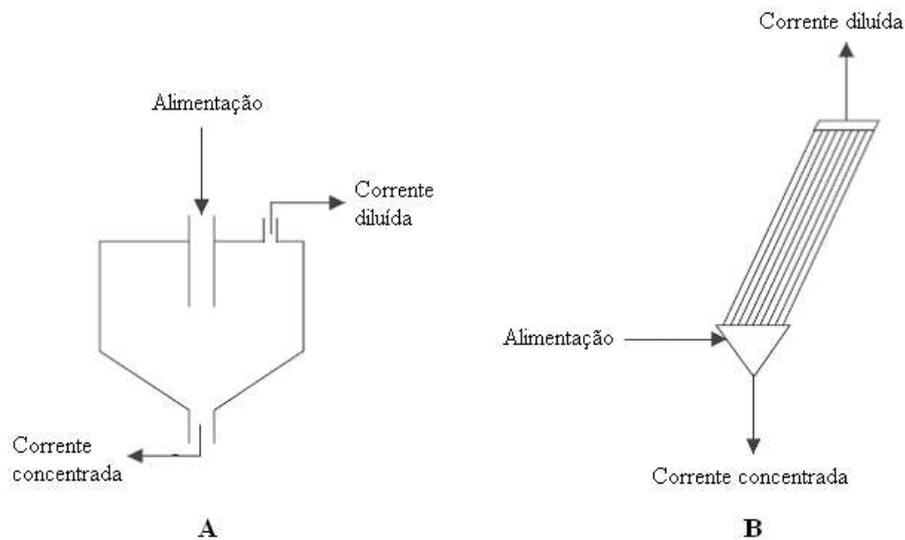


Figura 4 - Sedimentador vertical (A) e lamelado (B). Adaptado de Castilho e Medronho (2008).

Para uma mesma área de sedimentação, os sedimentadores lamelados são muito mais compactos que os verticais. O principal problema desses sedimentadores é a tendência das células a aderirem às lamelas. Contudo, um revestimento especial da superfície das lamelas e um aparelho auxiliar para vibração periódica do sedimentador podem minimizar esse problema (Castilho e Medronho, 2002).

Outra dificuldade em relação aos sedimentadores é o seu escalonamento, pois envolve o aumento da área de sedimentação, já que esta é diretamente proporcional à vazão a ser tratada, que cresce com o volume do biorreator (Woodsidet al., 1998; Castilho e Medronho, 2008).

Choo *et al.* (2007) testaram um sedimentador comercial lamelado durante cultivos em perfusão de células de mieloma (NS0) e obtiveram eficiências de separação superiores a 98%. O sedimentador em questão possuía lamelas revestidas com perfluoroalcoóxido, inclinadas em um ângulo de 30° com a vertical, e era equipado com um vibrador eletromagnético.

II.4.2. Filtração

Na filtração, as células são retidas usando uma barreira física, que normalmente retém células viáveis e não viáveis assim como fragmentos de células de maior tamanho (Voisard *et al.*, 2003). Filtros de membrana são comumente utilizados, assim como os filtros de malha rotativa (Castilho e Medronho, 2008). No entanto, o equipamento desenvolvido mais recentemente para fins de perfusão é o filtro com fluxo tangencial alternado.

II.4.2.1. Filtro de malha rotativa (*spin-filter*)

Os filtros de malha rotativa são cilindros com uma parede porosa (normalmente uma malha de aço ou uma membrana), que podem ser colocados dentro de biorreatores tanto montados no mesmo eixo do rotor quanto movidos por motor e eixo independentes. O meio de cultura é continuamente removido através da malha, sob vácuo, enquanto que meio novo é adicionado com a mesma vazão ao biorreator, como mostrado na Figura 5.

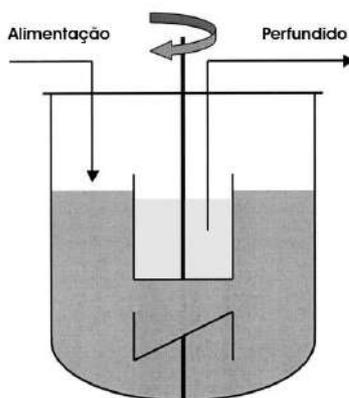


Figura 5 - Filtro de malha rotativa (Pinto, 2007).

O mínimo de incrustação e uma retenção celular ótima a altas taxas de perfusão são importantes para uma operação eficiente do filtro. Além disso, o desempenho de um filtro de malha rotativa pode ser considerado ótimo se seu projeto e condições de operação permitem que uma retenção seletiva ocorra, isto é, se debris e células mortas são removidos do biorreator enquanto que as células vivas são retidas (Castilho e Medronho, 2002).

Incrustações de células e biomoléculas na malha filtrante podem ser parcialmente compensadas aumentando a velocidade de rotação do filtro. No entanto, velocidades de rotação muito altas podem aumentar a perda de células. Logo, existe uma velocidade de rotação ótima que garante uma retenção celular efetiva e uma operação do filtro sem entupimentos (Yabannavaret *al.*, 1992).

Quando se trabalha com esse tipo de filtro, normalmente atingem-se eficiências entre 63 e 99% (Castilho e Medronho, 2002).

Nos filtros de malha rotativa ocorrem dois fenômenos: a migração lateral e o fluxo de troca. A migração lateral é caracterizada pela baixa concentração de células na superfície externa do meio filtrante. Já o fluxo de troca, é o fluxo radial bidirecional através da malha filtrante causado por vórtices presentes na região externa à malha que, por inércia, penetram o volume interno do filtro. Esse fluxo de troca é entre uma e duas ordens de grandeza maior que o fluxo de perfundido.

A rotação da malha afeta tanto a migração lateral de partículas quanto o fluxo de troca que também é influenciado pela taxa de filtração. Como o fluxo de troca cresce com o aumento da taxa de rotação, cuidado especial deve ser tomado evitando velocidades de rotação muito altas (Figueredo-Cardero *et al.*, 2009).

Além disso, Figueredo-Cardero *et al.* (2012) documentaram que os filtros de cilindro rotativo (FCR), os spin-filters externos, apresentam uma condição de velocidade de deslizamento tangencial que pode influenciar a formação da torta e também atestaram um regime turbulento na separação celular nesse tipo de sistema.

II.4.2.2. Filtro com fluxo tangencial alternado (ATF)

Nos sistemas de filtração com fluxo tangencial alternado, conhecido como ATF (do inglês “Alternating Tangential Filtration”), o meio filtrante (um cartucho de membranas de fibras ocas) fica dentro de um módulo cilíndrico que é acoplado ao biorreator e a um dispositivo com diafragma em sua extremidade inferior, como ilustrado na Figura 6.

O diafragma, por sua vez, está acoplado a um controlador ligado a uma linha de ar comprimido, alternando-se ciclos de pressão e de vácuo, que causam o escoamento periódico de suspensão celular do biorreator para o filtro e de volta.

Uma bomba acoplada ao espaço extracapilar do módulo causa a permeação de parte da fase líquida através das membranas, para retirada de perfundido. A ação repetida de arraste da suspensão para dentro e para fora da bomba gera um fluxo tangencial alternado através do filtro, evitando a incrustação e colmatação progressivas das membranas de fibras ocas.

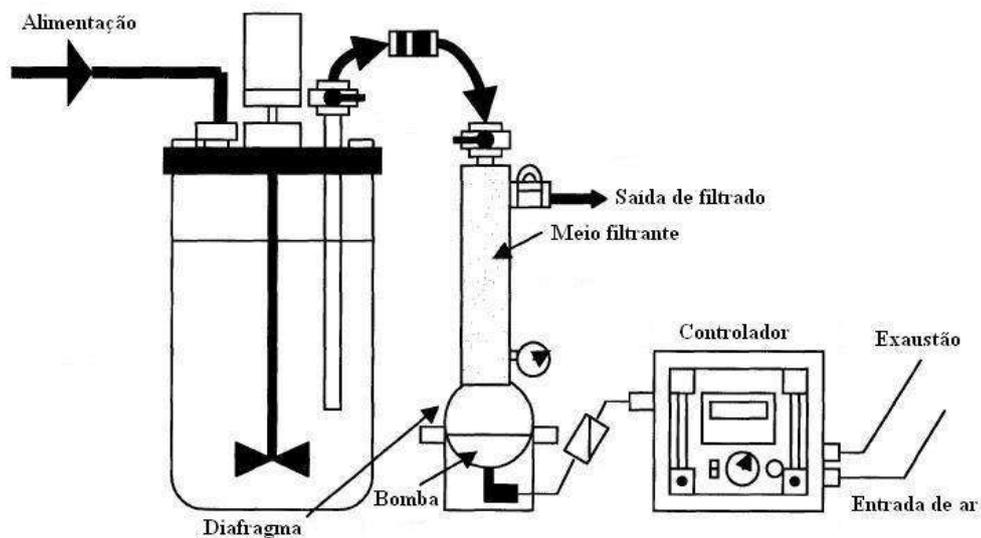


Figura 6 - Sistema ATF acoplado a um biorreator. Adaptado de Hufford (2007).

Crowley *et al.* (2008) estudaram um cultivo de células em perfusão, utilizando como equipamento de separação um módulo de filtração de fibras ocas com fluxo tangencial alternado. Foi descoberto que tal processo de perfusão leva a uma menor agregação celular e até a um cultivo que consiste em uma suspensão de células individuais, sem agregados visíveis. A desagregação de células se deveu, provavelmente, à tensão de cisalhamento baixa, porém presente no interior das fibras. Assim, foi observado que o sistema ATF não apenas evita a incrustação das fibras ocas, mas também evita a agregação de células que apresentam uma tendência inerente a formar agregados celulares.

Crowley *et al.* (2008) concluíram então que os experimentos contínuos em perfusão usando uma unidade de ATF mostram potencial significativo para atingir altas densidades celulares (10^8 células/mL) e altas produtividades volumétricas (0,9 g/L/dia), ao mesmo tempo em que nenhum agregado celular foi observado.

II.4.3. Hidrociclones

Os hidrociclones utilizam o mesmo princípio de separação das centrífugas: a sedimentação das células em um campo centrífugo. Eles são equipamentos muito simples que consistem de uma seção cônica ligada a outra cilíndrica, à qual estão conectados os tubos com os orifícios de entrada da alimentação e de saída da corrente diluída (“*overflow*”). Na extremidade inferior (“*underflow*”) da parte cônica existe um orifício de saída da corrente concentrada. Uma elevada eficiência de separação pode ser alcançada através da seleção precisa do tamanho do hidrociclone e do projeto apropriado de suas dimensões geométricas (Deckwer *et al.*, 2005) (Figura 7).

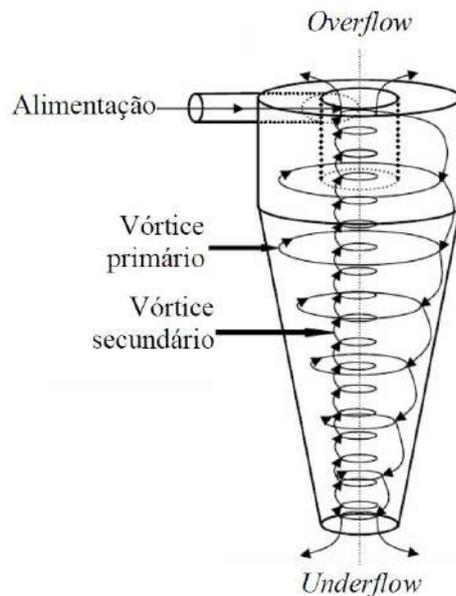


Figura 7 - Esquema de um hidrociclone, com indicação do escoamento interno. Pinto (2007).

Quando a suspensão entra no hidrociclone pelo tubo de entrada, ele próprio adquire um movimento rotacional descendente, criando um vórtice primário. Como o orifício de saída da corrente concentrada normalmente não é grande o suficiente para a passagem de toda a corrente de alimentação, apenas parte dela consegue deixar o equipamento por essa saída, levando consigo a maior parte das células na corrente concentrada. O restante de fluido que não consegue passar pelo orifício inferior inverte o seu movimento, formando agora o vórtice secundário, em sentido ascendente. Essa parte do fluido consegue deixar o hidrociclone pelo orifício

superior, carregando células menores e *debris* na corrente diluída (Castilho e Medronho, 2002; Castilho e Medronho, 2008).

Dessa maneira, é possível obter na parte inferior do hidrociclone um aumento na concentração celular em relação à concentração da corrente de alimentação. Apesar de serem sensíveis ao estresse mecânico, células animais são capazes de suportar os efeitos da tensão de cisalhamento no interior de hidrociclones, dado que certa queda de pressão crítica entre a alimentação e a saída superior do equipamento não seja ultrapassada (Jockwer *et al.*, 2001). Como os danos às células são resultado da intensidade e do tempo de exposição a tensões de cisalhamentos, os poucos efeitos deletérios provavelmente se devem ao fato de que o tempo de residência das células dentro do hidrociclone é muito curto. Como os hidrociclones não apresentam partes móveis e não requerem manutenção durante a operação, eles são ideais para o uso em condições assépticas como equipamentos de retenção celular em processos em perfusão, já que essas características reduzem os riscos adicionais de contaminação (Castilho e Medronho, 2002; Castilho e Medronho, 2008).

Elsayed *et al.* (2006) reportaram que um hidrociclone especialmente projetado para a separação de células animais (Deckwer *et al.*, 2005) era capaz de efetivamente separar células Hela e BHK. Para a primeira linhagem, foram atingidas eficiências de separação totais entre 94 e 97%, com viabilidades celulares na corrente concentrada de, no mínimo, 98,9%. Já para a segunda linhagem, as eficiências de separação totais foram entre 77 e 96%, com viabilidades celulares na corrente concentrada entre 96,3 e 98%.

Pinto *et al.* (2008) verificaram que outros hidrociclones testados com células CHO, porém também projetados com base em Deckwer *et al.* (2005), resultaram em eficiências de separação entre 97,9 e 99,9% e quedas de viabilidade celular (diferença entre a viabilidade celular na alimentação e na corrente concentrada) entre 2,9 e 14,4%.

A eficiência de separação de um hidrociclone pode ser influenciada pelo perfil de descarga na corrente de *underflow*. A forma de descarga pode ser definida a partir do ângulo formado entre a velocidade axial e radial na saída da corrente de *underflow*, podendo ser do tipo “guarda-chuva”, “corda” ou de transição (Neesse *et al.*, 2004). A descarga do tipo “corda” reduz a eficiência de separação, pois altera a

R_f do hidrociclone (Nowakowski e Doby, 2008). Neesse *et al.* (2004) também afirmaram que, para correntes de alimentação diluídas, a descarga do tipo “guarda-chuva” favorece a recuperação de sólidos e a obtenção de um menor diâmetro de corte e que, para altas concentrações de sólidos, a descarga do tipo “corda” favorece a presença de concentrados com menos partículas finas. Estes autores estudaram condições operacionais nas quais ocorriam mudanças no tipo de descarga na corrente concentrada e observou que há uma região de transição entre os dois tipos de descarga, na qual a recuperação é máxima.

No que diz respeito a mudanças na geometria convencional de hidrociclones, Yang *et al.* (2010) estudaram, experimentalmente e através de fluidodinâmica computacional, o comportamento dos perfis de pressão e valores de queda de pressão para hidrociclones com diferentes combinações de ângulos da seção cônica na separação de sólidos obtidos do sistema de dessulfurização de gás de combustão de uma usina de energia. Os resultados indicaram que a mudança de angulação não afetava significativamente a maneira como os perfis de pressão se apresentavam dentro do equipamento, mas sim o valor da queda de pressão, de forma que quanto maior fosse a diferença nos valores dos ângulos, maior seria a queda de pressão.

Yang *et al.* (2010) também avaliaram a influência de mais de um ângulo na seção cônica e verificaram que o hidrociclone com maior diferença de angulação possuía maiores velocidades tangencial e radial. Isso corresponderia a um aumento do campo centrífugo formado, que é responsável pela separação das fases

III. Metodologia

III.1. Projeto do hidrociclone

O projeto de uma nova geometria para um hidrociclone para separação de células animais foi realizado tomando-se como base hidrociclones usados em separações líquido-líquido entre fluidos com densidades semelhantes e sensíveis ao cisalhamento, resultando em dimensões reduzidas para o comprimento total do hidrociclone, assim como diferentes ângulos de inclinação do corpo cilíndrico do mesmo em relação aos anteriormente utilizados para esta aplicação (Deckwer *et al.*, 2005). A Tabela 2 contém as dimensões do hidrociclone (ilustradas na Figura 8) que foi projetado e posteriormente construído em acrílico. A construção do hidrociclone, idealmente, deveria ser feita utilizando aço inoxidável 316, que atende às regulamentações específicas para produção de biofármacos. Entretanto, como o projeto aborda inicialmente a criação de um novo hidrociclone, para realização dos primeiros testes em batelada, sem necessidade de assepsia, optou-se pela construção do mesmo em acrílico (PMMA, polimetil-metacrilato). Além do custo, o fato do mesmo ser transparente possibilita a observação do comportamento da suspensão dentro do hidrociclone, fornecendo informações muitas vezes importantes ao andamento do projeto.

Tabela 2. Dimensões do novo hidrociclone para células animais.

Dc (mm)	10,0	L1 (mm)	6,0
D (mm)	6,0	$\Theta 1$ (grau)	2,5°
Di (mm) *	1,1	$\Theta 2$ (grau)	1°
Do (mm)	2,8	L2 (mm)	45,8
Du (mm)	3,5	L3 (mm)	71,6
VF (mm)	1,0	LT (mm)	123,4

*Entrada dupla.

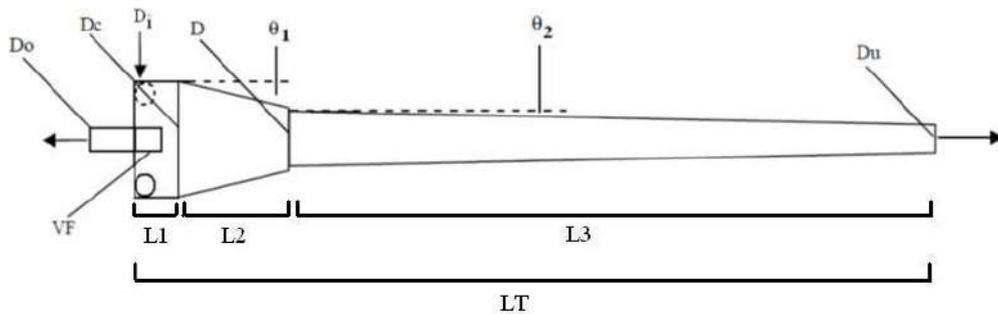


Figura 8 - Dimensões típicas de um hidrociclone

Foram projetadas também duas extensões inferiores, que poderiam ser acopladas à saída de *underflow* do hidrociclone, resultando em duas novas configurações de hidrociclone a serem testadas. Estas extensões tinham como objetivo aprimorar a forma de coleta da corrente concentrada, sem afetar a descarga do tipo guarda-chuva típica de hidrociclones e permitindo sua conexão asséptica e idealmente isenta de espuma ao biorreator.

A nomenclatura escolhida para referência à configuração do hidrociclone é composta por HCXXYY, onde XX e YY correspondem aos algarismos do diâmetro da saída do *underflow* e *overflow*, respectivamente. Ainda, adiciona-se à nomenclatura a letra A ou B, para denotar o acoplamento destas peças a saída do hidrociclone. Assim, as três configurações possíveis neste trabalho são HC3530, HC3530-A e HC3530-B. A Figura 9 abaixo mostra fotos das três configurações de hidrociclone avaliadas. O desenho técnico elaborado para construção do equipamento é mostrado no apêndice A.



Figura 9 - Configurações do hidrociclone projetado: HC3530, HC3530-A e HC3530-B, respectivamente.

III.2. Cultivo das células CHO

Para realizar os ensaios de separação, o cultivo de células CHO foi preparado previamente e diluído com tampão PBS (*phosphate buffer saline*) com o propósito de obter o volume mínimo suficiente para garantir que a operação do hidrociclone pudesse ocorrer sem quaisquer perturbações (garantir que atingisse estado estacionário após um minuto de operação) e que pudessem ser feitos todos os testes para cada hidrociclone com uma mesma batelada.

Para tal, o cultivo foi realizado em bateladas repetidas, utilizando um biorreator APPLIKON, em vaso de 7 L com volume de trabalho variando de 4 a 5 L. A cada teste com hidrociclone, o volume de suspensão de células a ser coletado era calculado através de uma fórmula de diluição simples, com o objetivo de fazer um novo inóculo com concentração pré-estabelecida, diminuindo o tempo necessário para obter o volume pré-definido de suspensão de células novamente. Para aeração do sistema, foi utilizado um aspersor de ar do tipo L com injeção de ar a uma taxa de aeração de 0,1 vvm. O controlador da torre de controle do biorreator fazia a injeção adicional de CO₂ ou O₂ quando houvesse necessidade de ajuste nos valores de pH e OD (oxigênio dissolvido) do sistema, respectivamente. Para a agitação, foi utilizado um impelidor com duas pás do tipo hélice marinha, a 150 rpm. As células foram cultivadas em meio comercial POWER CHO-2 (Lonza), o qual contém insulina recombinante, com suplementação de HT (mistura hipoxantina-timina) e glutamina (8 mM), a 37°C. Os valores definidos para operação do biorreator foram pH 7,1 e OD de 30 %.

Ainda, foram necessários alguns cultivos em frascos *erlenmeyer* para complementação dos experimentos. Estes possuíam chicanas e tampa com membrana de 0,2 µm (Corning), de volume variável, conforme a necessidade de volume de suspensão de células (125 a 500 mL de volume de trabalho). Estes cultivos foram realizados em estufa com atmosfera a 5 % de CO₂, 37°C e agitação orbital variando de 120 a 180 rpm, conforme o volume útil de trabalho do frasco utilizado.

III.3. Análise de viabilidade celular e distribuição de tamanho de células

A análise de viabilidade das células foi feita utilizando o contador Vi-Cell (Beckman Coulter), que se baseia no método de exclusão do azul de trypan. Dados foram obtidos para amostras das correntes de alimentação, *overflow*, *underflow* e para cálculos de diluição para reinóculo no biorreator. Além da viabilidade celular, outros dados como a distribuição de tamanho de células foi obtida, permitindo cálculos posteriores de eficiência granulométrica. Como o foco do estudo era determinar a eficiência do equipamento de retenção abordado, dados referentes ao cultivo das células não serão apresentados.

III.4. Testes de operação de bombas

Antes da operação dos hidrociclones com suspensão de células, testes foram efetuados para avaliar a extensão da queda da viabilidade celular devido ao bombeamento da suspensão. Dessa forma, três diferentes bombas foram avaliadas: duas bombas peristálticas, com e sem pulsação (Watson Marlow, modelos 520 U com cabeçote simples e 520 Du com cabeçote duplo 505L, respectivamente), e uma bomba centrífuga movida por campo magnético, feita para utilização em cultivos assépticos de células animais (Levitronix).

Durante o procedimento, 900 mL de suspensão de células com concentração de $0,87 \cdot 10^6$ cel/mL e viabilidade de 91,1 %, diluídas em PBS (*phosphate buffer saline*), foram bombeadas continuamente em modo de recirculação e amostras foram coletadas em tempos pré-determinados, resultando em um tempo total de bombeamento de uma hora. A vazão utilizada para as bombas foi determinada com base nas vazões máximas obtidas a partir dos testes para razão de fluido dos hidrociclones. Assim, foram escolhidos os maiores valores possíveis, que conseqüentemente causariam mais danos mecânicos às células. As vazões de operação utilizadas foram de aproximadamente $1,3 \text{ L min}^{-1}$ para a bomba centrífuga e para a bomba peristáltica com cabeçote duplo e $0,4 \text{ L min}^{-1}$ para bomba peristáltica de cabeçote simples. Esta diferença de vazões se deve ao fato de que a bomba peristáltica com cabeçote simples ser usada na corrente de saída de *overflow*

do hidrociclone, razão pela qual sua vazão máxima foi menor, enquanto as outras duas bombas foram utilizadas na alimentação.

III.5. Testes de separação

Previamente aos testes efetuados com a suspensão de células, testes iniciais utilizando água foram feitos para obter valores correspondentes à razão de fluido (R_f) dos hidrociclones, utilizando água como fluido de teste. A R_f pode ser calculada por meio da equação 1:

$$R_f = \frac{Q_u}{Q} \quad (1)$$

Onde Q_u corresponde à vazão obtida no *underflow* e Q à vazão de alimentação no hidrociclone.

Após diluição da suspensão de células oriunda do biorreator com PBS para o volume e concentração planejados, procedeu-se a etapa de execução dos testes com os diferentes hidrociclones e geometrias possíveis. Após 1 min de bombeamento de células pelo hidrociclone, amostras foram coletadas e analisadas, conforme mencionado anteriormente.

III.6. Ajuste de dados aos modelos de distribuição cumulativa e cálculos de eficiência de separação

Um importante parâmetro a ser calculado quando um equipamento de retenção celular é utilizado é a eficiência de separação. Para o cálculo da eficiência, um importante dado a ser conhecido das correntes de entrada e saída do equipamento é a distribuição de tamanhos nas mesmas. Esta pode ser apresentada de diversas maneiras, como em frequência ou distribuições cumulativas menor ou maior que um dado diâmetro d (Svarovsky, 2000). Ressalta-se que, a distribuição de tamanhos cumulativa é a função integral da frequência de tamanhos e, portanto, deve ser diferenciada para a obtenção da frequência de tamanhos (Svarovsky, 2000).

III.6.1. Modelos de distribuição de tamanho

Para a função de distribuição cumulativa, diversos são os modelos de distribuição de partículas encontrados na literatura, como os modelos log-normal,

sigmoide, RRB (Rosin-Rammler-Bennett) e modelo de Weibull, entre outros. Neste trabalho, inicialmente os dados de distribuição de tamanho foram ajustados para dois diferentes modelos: ao modelo sigmoide e ao modelo de Weibull. O primeiro é visto na equação 2 abaixo:

$$y = \frac{1}{1 + \left(\frac{k}{d}\right)^m} \quad (2)$$

Onde m e k são parâmetros da equação. O parâmetro k representa o diâmetro no qual 50% das partículas são menores que ele, quando seu valor é igual ao valor de d .

O modelo de Weibull, que é uma variação do modelo RRB, que acrescenta um parâmetro a que representa o tamanho mínimo das partículas, como visto na equação 3, abaixo:

$$y = 1 - \exp\left[-\left(\frac{d-a}{k}\right)^m\right] \quad (3)$$

A obtenção dos parâmetros k e m das equações deve ser feita a partir dos gráficos gerados das linearizações de tais equações. As linearizações das equações são apresentadas em seguida, para os modelos sigmoide e de Weibull, respectivamente:

$$\ln\left(\frac{1}{y} - 1\right) = -m \ln d + m \ln k \quad (4)$$

$$\ln\left(\frac{1}{1-y}\right) = m \ln(d - a) - m \ln k \quad (5)$$

De posse da equação gerada por regressão linear para os modelos, uma comparação baseada nos valores de R^2 é feita. Neste caso, para os dados obtidos, o modelo que descreveu melhor os dados foi o modelo sigmoide. Portanto, todos os cálculos de eficiência foram baseados no ajuste ao modelo sigmoide.

III.6.2. Cálculo de eficiência de separação

A eficiência total de separação (E_T), calculada a partir das concentrações de células medidas nas correntes de saída do hidrociclone, é definida como:

$$E_T = \frac{Q_u X_u}{Q_u X_u + Q_o X_o} \quad (6)$$

Onde os índices u e o representam as correntes de *underflow* e *overflow* do hidrociclone, Q é a vazão da corrente e X é a concentração de células medida na corrente. Ainda, é importante medir a eficiência de separação do equipamento descontando o efeito de arraste das partículas, pois o equipamento também funciona como um divisor de correntes. Este efeito é dado pela razão de fluido. A chamada eficiência total reduzida (E'_T), é calculada a partir da equação 7:

$$E'_T = \frac{E_T - R_f}{1 - R_f} \quad (7)$$

Outra forma de medir a eficiência diz respeito a um determinado tamanho de partícula. Este parâmetro, chamado de eficiência total granulométrica (G_T), é calculado com base na função de distribuição cumulativa y menor que dado diâmetro d , das correntes de *overflow* e *underflow*, de acordo com a equação 8.

$$\frac{1}{G_T} = 1 + \left(\frac{1}{E_T} - 1 \right) \frac{dy_o}{dy_u} = 1 + \left(\frac{1}{E_T} - 1 \right) \frac{dy_o/dd}{dy_u/dd} \quad (8)$$

Neste caso, duas abordagens foram estudadas. Primeiramente, realizou-se o cálculo dos valores das derivadas da função em relação ao diâmetro da partícula, que pode ser obtido analiticamente, conforme a equação 9.

$$\frac{dy}{dd} = \frac{m \left(\frac{k}{d} \right)^m}{d \left[1 + \left(\frac{k}{d} \right)^m \right]^2} \quad (9)$$

Alternativamente, foi feito o cálculo da derivada da função de distribuição do *overflow* em função do *underflow* usando a equação obtida por meio do ajuste polinomial do gráfico de y_o versus y_u .

Analogamente à E'_T , a eficiência granulométrica reduzida total (G'_T) é definida matematicamente como:

$$G'_T = \frac{G_T - R_f}{1 - R_f} \quad (10)$$

Traçando o gráfico de G'_T por em função de d , foram obtidos os valores de d'_{50} , que correspondem ao diâmetro da partícula ou, neste caso, da célula, que foi separado com 50 % de eficiência. Traçando novamente um gráfico de G'_T por d/d'_{50} , obtém-se o valor de n , parâmetro restante para completar a equação de G' abaixo.

$$G' = 1 - \exp \left[-0,693 \left(\frac{d}{d'_{50}} \right)^n \right] \quad (11)$$

Com base na equação 11 acima e na equação 12 abaixo, é possível prever a desempenho da separação das células quando são conhecidas a distribuição de tamanhos das células e a função da eficiência granulométrica da corrente de alimentação.

$$E' = \int_0^1 G' d_y \quad (12)$$

Com isso, foi feito um estudo comparativo do desempenho esperado com o resultado obtido experimentalmente para as eficiências. A Figura 10 mostra esquematicamente a montagem do aparato experimental utilizado para os testes com os hidrociclones.

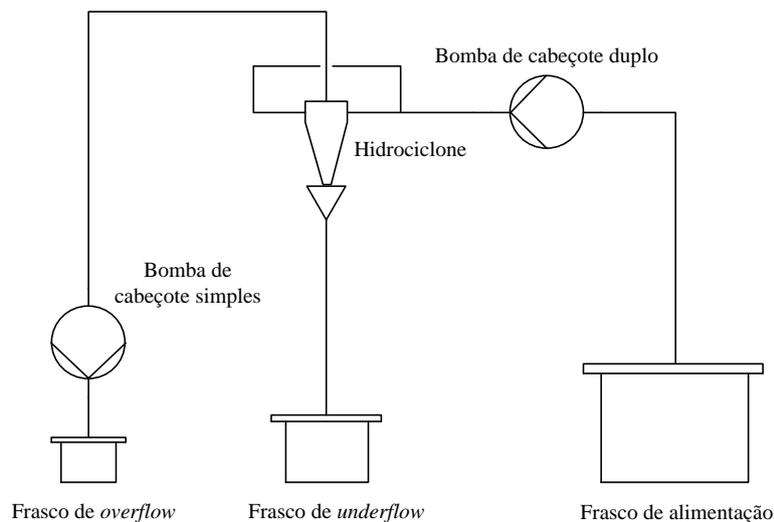


Figura 10 - Representação esquemática de como foi montado e executado os experimentos com os hidrociclones. A razão de fluido foi alterada manipulando a rotação da bomba de cabeçote simples montada na corrente de overflow do hidrociclone.

IV. Resultados e Discussão

IV.1. Geometria do hidrociclone e testes de R_f com água

De posse do hidrociclone construído em PMMA (polimetil-metacrilato), testes foram realizados para verificar o funcionamento do mesmo nas condições operacionais que eram desejadas. Os testes iniciais, realizados com água, indicaram que para todas as condições de vazão de entrada de água testadas, não foi observada a saída de fluido pela corrente de overflow, indicando valores de R_f iguais a um. Assim, decidiu-se modificar o hidrociclone por aumentar o diâmetro do *overflow*, de 2,5 para 3,0 mm. No entanto, posteriormente, foi observado que o diâmetro final do *overflow* era de 2,8 mm. Adicionalmente, optou-se por operá-lo com uma bomba peristáltica acoplada à saída da corrente de *overflow* com o objetivo de melhor controlar as condições de operação do equipamento e permitir que a divisão do fluido fosse obtida para todas as geometrias nas faixas de operação pré-definidas.

IV.2. Testes preliminares com bombas

Em relação à queda de viabilidade celular, a bomba peristáltica com cabeçote simples e a bomba centrífuga apresentaram desempenho semelhante. Ao final do tempo de experimento, quedas de viabilidade de 4,5% e 2% foram observadas, respectivamente. Por outro lado, a bomba peristáltica com cabeçote duplo apresentou uma queda de viabilidade de 27% ao final do experimento, como mostrado na Figura 11. Ressalta-se que a diferença de desempenho obtido para as bombas peristálticas é justificada pela diferença de vazão aplicada em cada caso, de $0,4 \text{ L min}^{-1}$ e $1,3 \text{ L min}^{-1}$, respectivamente.

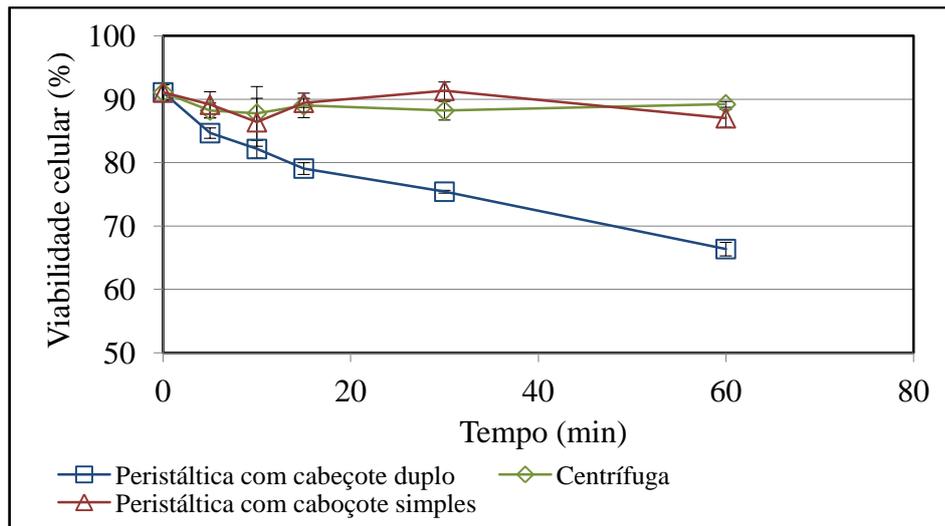


Figura 11 - Viabilidade celular ao longo do período de bombeamento.

Kaiser e Eibl (2011) avaliaram o estresse mecânico causado por uma bomba centrífuga semelhante à estudada no presente trabalho, comparando-a com outras duas bombas peristálticas e concluíram que, em geral, a bomba centrífuga causa menor queda de viabilidade celular do que as bombas peristálticas, com uma queda mínima de 2%, mesmo resultado observado no presente trabalho.

Assim, a bomba centrífuga parece ser a mais adequada para o bombeamento de células em sistemas em perfusão. No entanto, não foi feito o uso da bomba para os testes com os hidrociclones. Quando eram desejadas menores vazões, a altura da coluna d'água dentro do frasco recipiente diminuía rapidamente conforme ela era bombeada e, por isso, os valores medidos variavam de forma que inviabilizavam a correta calibração da mesma.

IV.3. Eficiência de separação

IV.3.1. Eficiência total e reduzida de separação

A eficiência total reduzida de separação de células é o principal fator a ser avaliado para que este equipamento possa ter aplicação industrial. De fato, no caso do uso como equipamento de retenção celular para cultivos em perfusão, espera-se que este possa reter a grande maioria das células dentro do biorreator, de forma a manter uma alta densidade celular e, se possível, eliminar as células não viáveis do mesmo. De forma a investigar o desempenho do hidrociclone, a eficiência foi

avaliada variando a razão de fluido (com o uso de uma bomba peristáltica) e a queda de pressão de operação do equipamento. Para obtenção dos valores de eficiência, como citado anteriormente na metodologia, foram quantificadas as viabilidades e as concentrações celulares das correntes de alimentação, *overflow* e *underflow*. As amostras foram medidas em triplicata. A Tabela 3 resume as condições experimentais utilizadas assim como os resultados obtidos.

Antes de discutir quaisquer resultados referentes à eficiência de separação, é conveniente ressaltar que Pinto *et al.* (2008), que obtiveram altas eficiências de separação com hidrociclones, empregaram geometrias menos suscetíveis a alterações nos valores de queda de pressão. Para operação de um hidrociclone com configuração 3020 (o mais similar ao estudado no presente trabalho), uma vazão de alimentação correspondente a $1,44 \text{ L min}^{-1}$ gerou uma queda de pressão de 1 bar. Para o novo hidrociclone projetado, na condição 4, uma vazão de $1,38 \text{ L min}^{-1}$, que é menor que a encontrada no estudo referenciado, gerou uma queda de pressão de 1,5 bar. Tal fato pode ser atribuído à geometria do hidrociclone: primeiramente, os diâmetros de saída no *overflow* e *underflow* foram diferentes, o que já modifica os perfis de queda de pressão; além disso, houve a inserção de uma mudança de angulação na seção cônica. Mesmo que tenha sido usado para um sistema não biológico, os resultados de Yang *et al.* (2010) mostrando que a queda de pressão cresce com o aumento da diferença nos valores dos ângulos podem ser usados como base para justificar o fato de pequenas mudanças na vazão de operação do hidrociclone projetado influenciarem mais fortemente a queda de pressão.

Tabela 3 - Condições experimentais para execução dos testes e resultados obtidos com os três diferentes hidrociclones projetados variando a razão de fluido (R_f) com auxílio de bombas peristálticas de cabeçote simples e duplo para as correntes de *overflow* e *underflow*, respectivamente. Os valores entre parênteses indicam os erros de cada parâmetro. ΔP : queda de pressão; Q: vazão de alimentação; V_A : viabilidade da alimentação; X_U : concentração de células viáveis no *underflow*; V_U : viabilidade no *underflow*; X_O : concentração de células viáveis no *overflow*; V_O : viabilidade no *overflow*; E_T : eficiência total de separação; E'_T : eficiência total reduzida de separação; ΔV : queda de viabilidade entre a alimentação e o *underflow*.

Condição	Formação de núcleo de ar	Nome	ΔP (bar)	R_f (%)	Q (L min ⁻¹)	V_A (%)	X_U (10 ⁶ cel/mL)	V_U (%)	X_O (10 ⁶ cel/mL)	V_O (%)	E_T (%)	E'_T (%)	ΔV (%)
1	Sim	HC3530	0,950	77,7 (0,8)	1,121 (0,009)	90,59 (2,04)	1,2 (0,02)	90,11 (0,82)	0,77 (0,01)	90,68 (1,54)	84,3 (0,5)	29,5 (2,2)	0,5 (2,2)
2			0,975	83,2 (0,5)	1,117 (0,006)	90,59 (2,04)	1,1 (0,03)	85,05 (1,10)	0,67 (0,03)	91,17 (2,24)	87,9 (0,5)	28,1 (3,0)	5,5 (2,3)
3			1,000	91,6 (1,6)	1,110 (0,013)	90,59 (2,04)	1,1 (0,03)	74,05 (0,20)	0,78 (0,01)	72,10 (1,59)	93,3 (0,3)	20,0 (3,1)	16,5 (2,0)
4			1,500	90,7 (0,4)	1,381 (0,004)	94,39 (0,07)	1,2 (0,01)	87,64 (0,50)	0,86 (0,02)	87,80 (0,32)	93,0 (0,1)	24,9 (0,6)	6,8 (0,5)
5	Não	HC3530-A	1,000	74,1 (0,8)	1,189 (0,008±)	92,32 (0,68)	1,3 (0,01)	88,15 (1,07)	0,58 (0,01)	85,52 (1,66)	83,6 (1,7)	36,8 (6,5)	4,2 (1,3)
6			1,000	82,8 (0,1)	1,179 (0,001)	92,32 (0,68)	1,0 (0,02)	88,89 (0,39)	0,57 (0,03)	85,64 (1,37)	88,7 (0,5)	34,5 (2,7)	3,4 (0,8)
7			1,000	91,6 (0,7)	1,176 (0,007)	92,32 (0,68)	1,0 (0,04)	89,57 (0,56)	0,75 (0,02)	87,22 (1,05)	93,5 (0,1)	22,7 (1,5)	2,7 (0,9)
8	Não	HC3530-B	1,500	91,5 (2,1)	1,255 (0,019)	89,63 (0,66)	1,1 (0,06)	81,04 (1,21)	0,69 (0,03)	81,29 (0,47)	94,4 (0,1)	33,8 (1,0)	8,6 (2,1)

A partir dos resultados da Tabela 3, observa-se que foram encontrados valores de eficiência de separação variando entre $83,6 \pm 1,7\%$ e $94,4 \pm 0,1\%$, assim como quedas de viabilidade variando de $0,5 \pm 2,2\%$ até $16,5 \pm 2,0\%$. Ainda, é importante ressaltar que os valores de eficiência reduzida obtidos foram relativamente baixos, indicando que a eficiência promovida pelo equipamento se deve majoritariamente ao efeito de separação de correntes. A queda de viabilidade encontrada para a condição experimental 3, correspondente a $16,5\%$, ainda que significativamente grande, é comparável aos resultados obtidos por Jockwer *et al.* (2001) para separação de células CHO.

Os experimentos 1/5 e 2/6, realizados sob condições similares para os modelos HC3530 e HC3530-A, indicam que as quedas de viabilidade são iguais para ambas as configurações. No entanto, ao observar os valores de queda de pressão para os experimentos, verifica-se que estes eram menores para os experimentos 1 e 2. Assim, pode-se pensar que, mesmo com viabilidades iguais, acoplado a peça A ao hidrociclone houve um efeito benéfico sobre a ΔV , uma vez que mesmo aumentando a queda de pressão (que é prejudicial às células), a viabilidade se mantém. Já os experimentos 3 e 7, relativos aos mesmos modelos HC3530, foram executados sob as mesmas condições operacionais ($\Delta P = 1,0$ bar e $R_f = 91,6\%$), tendo a queda de viabilidade sido significativamente maior para a condição 3. Observou-se que, durante a execução dos testes com a peça A, não houve a formação de cilindro de ar no vórtice secundário gerado no interior do hidrociclone. De fato, a peça inferior acoplada ao hidrociclone permaneceu inundada durante a operação do equipamento. A ausência de ar durante a operação do hidrociclone pode diminuir os danos causados devido à presença de bolhas e ao cisalhamento, levando a uma menor queda de viabilidade no mesmo.

Quando comparadas as condições 4 e 8, ambas com quedas de pressão maiores e valores de R_f próximos, mas agora com os modelos HC3530 e HC3530-B, ambos proporcionaram o mesmo efeito (resultados no mesmo intervalo de confiança) sobre a queda de viabilidade.

Para o hidrociclone HC3530-A, os três diferentes testes executados em condições equivalentes (5, 6 e 7), variando somente a razão de fluido por meio da utilização da bomba peristáltica na saída do *overflow*, apontam que maiores

eficiências de separação são obtidas para maiores valores de razão de fluido, como esperado. O mesmo tipo de comportamento é observado para o hidrociclone HC3550, nas condições 1, 2 e 3. Ainda, quando são observados os valores de eficiência reduzida, ambos apresentam o mesmo padrão de resposta às variações na R_f , sendo observada uma tendência de aumento da eficiência total reduzida conforme ocorre a diminuição da R_f .

Esperava-se que, com os valores de ângulos propostos através da geometria dos novos hidrociclones testados (2° e 5° para os ângulos sólidos das partes cônicas inferior e superior, respectivamente), altas eficiências totais reduzidas fossem atingidas no presente trabalho. De acordo com Yang *et al.* (2010), a presença de mais de um ângulo na seção cônica seria responsável por uma melhor separação das fases. Entretanto, como altos valores de E'_T não foram observados, descartou-se a hipótese de uma possível influência do ângulo sobre os resultados encontrados.

Embora a comparação entre condições similares de operação (1/5, 2/6 e 3/7) mostrem que a peça A não propiciou nenhum efeito sobre a E'_T (todos os valores analisados par a par pertencem ao mesmo intervalo de 95% de confiança), os resultados obtidos para as condições 4/8 mostram que houve um aumento de aproximadamente 36 % no valor de E'_T ao acoplar a peça B. Uma possível justificativa para tal fato é que, ao acoplar-se a peça B no *underflow*, os padrões de descarga da corrente concentrada tenham sido alterados, o que é esperado, pois também houve a inundação da peça. Pode-se supor que, a utilização da peça B auxiliou, de fato, a formação do escoamento do tipo guarda-chuva na corrente de *underflow* (como foi pensado durante a etapa de projeto), sendo responsável então pelo aumento da eficiência reduzida, como descrito por Neesse *et al.* (2004).

IV.3.2. Eficiência granulométrica total e reduzida

A partir dos dados de distribuição de frequência obtidos para as correntes de *underflow* e *overflow*, foi realizado o ajuste dos dados para o modelo sigmoide, como citado na metodologia. A Tabela 4 mostra os valores dos parâmetros do modelo encontrados para as diferentes condições experimentais (as mesmas citadas no item anterior).

Tabela 4 - Parâmetros referentes ao modelo sigmoide para distribuição cumulativa de tamanhos das células nas correntes de *underflow* e *overflow*. Todos os valores de coeficiente de correlação obtidos para os ajustes foram maiores que 0,99.

Condição	<i>Overflow</i>		<i>Underflow</i>	
	m	k	m	k
1	8,14	11,43	7,93	11,57
2	8,14	11,58	7,79	11,47
3	7,07	10,81	7,07	11,03
4	7,27	13,76	6,93	13,77
5	7,60	12,11	7,58	12,23
6	7,87	12,10	7,81	12,39
7	7,79	12,30	7,72	12,42
8	6,35	12,16	6,21	12,46

Observa-se que, a partir dos parâmetros obtidos, os modelos condizem com o arraste das células que deveriam ser separadas pela corrente concentrada do hidrociclone para o topo. O parâmetro k que, quando é igual ao valor de d , representa o diâmetro no qual 50% das partículas são menores que ele, deveria apresentar valores consideravelmente diferentes nas correntes de *overflow* e *underflow* para uma separação eficiente, o que não ocorreu.

De posse dos modelos de distribuição cumulativa de tamanho das células nas correntes, foram calculadas as eficiências granulométricas total e reduzida, tanto pelo método analítico quanto pelo ajuste polinomial dos dados experimentais plotados no gráfico de y_o versus y_u . A Figura 12 mostra as curvas obtidas para as diferentes condições experimentais.

A partir dos gráficos, nota-se que a obtenção das curvas por ambos os métodos de cálculo geram, como esperado, resultados semelhantes, exceto para condição 4. Uma possível justificativa para tal fato pode ser atribuída a uma menor quantidade de dados obtidos para essa condição e por isso, o ajuste dos mesmos não foi tão eficiente quanto para as outras condições. As condições 3, 5, 6 e 7 foram as únicas que geraram curvas do tipo “S”, que são esperadas para o comportamento de G e G’ em função do diâmetro da partícula.

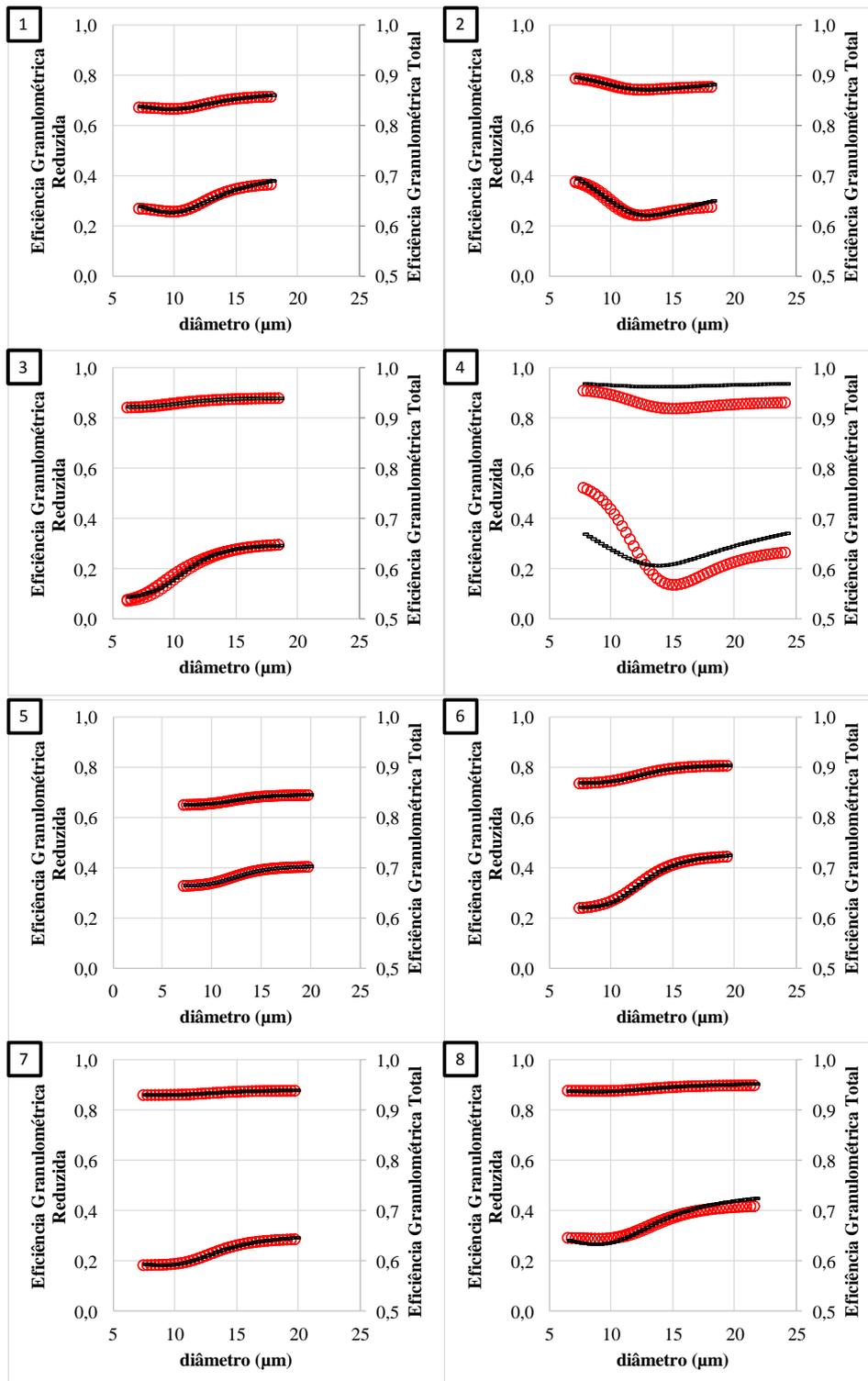


Figura 12 - Eficiências granulométricas total e reduzida (par de séries localizadas na parte superior e inferior dos gráficos, respectivamente) para as condições 1 a 8 calculadas através dos métodos de ajuste polinomial (círculos vermelhos) e analítico (linhas pretas).

As condições 1, 2, 4, e 8 geraram curvas com o fenômeno conhecido como Fish Hook, também encontrado por outros autores como Finch e Matwijkeno (1977) e Kilavuz e Gulsoy (2011), no qual a separação de partículas pequenas aumenta com a diminuição do tamanho da partícula até um diâmetro de partícula crítico (Wang, 2009). Verifica-se também que não foi observado este fenômeno para a geometria HC3530-A e que o efeito encontrado para a geometria HC3530-B é menos pronunciado, quando comparado como observado nas condições 2 e 4. Logo, pode-se supor que a alteração do escoamento promovida por essas peças foi benéfica no sentido de cancelar ou diminuir a presença do fenômeno..

Inicialmente, foi proposta a obtenção dos diâmetros de corte do equipamento (d'_{50}) para condição. Entretanto, tais valores não puderam ser obtidos, o que condiz com os baixos valores de E'_T obtidos. Ainda, as curvas não apresentam a tendência de atingir o valor máximo de eficiência igual a 1. Mais uma vez, o comportamento dos gráficos pode ser um reflexo do tipo de descarga inadequado para promover a separação efetiva das células, afetando assim as eficiências granulométricas.

V. Conclusão

As diferentes configurações testadas para o novo hidrociclone e peças adicionais permitiram a obtenção de eficiências totais de separação variando entre $83,6 \pm 1,7$ até $94,4 \pm 0,1\%$ e eficiências totais reduzidas relativamente baixas, entre $20,0 \pm 3,1$ a $36,8 \pm 6,5\%$, incompatíveis com uso em cultivos de células animais em perfusão, uma vez que sua utilização provocaria o *wash-out* do biorreator. Comparativamente, o acoplamento da peça A não influenciou a eficiência de separação (experimentos 1/5, 2/6 e 3/7), porém a peça B, associada a uma maior queda de pressão, pareceu contribuir para uma maior eficiência total reduzida. A manutenção da viabilidade celular pode ser observada tanto para a peça A, quando os valores de queda de pressão eram maiores, quanto para a peça B.

No entanto, os baixos valores de eficiência total reduzida obtidos indicam que a separação efetiva pela ação do campo centrífugo gerado no interior do hidrociclone não ocorreu como esperado, uma vez que a E'_T foi baixa. Com isso, obtiveram-se curvas de distribuição de tamanho da saída concentrada e diluída que condiziam com o efeito majoritariamente da divisão de correntes, ou seja, muito parecidas entre si, o que não permitiu a obtenção de curvas do tipo “S” comumente observadas para eficiência granulométrica nem a obtenção dos diâmetros de corte do equipamento.

Embora o uso de diferentes angulações de hidrociclones tenha sido reportado na literatura para promover alto desempenho para separação de fases de densidade muito próximas, como no caso da separação água e óleo, tal resultado esperado não foi obtido, possivelmente por efeito do tipo inadequado de descarga da corrente concentrada.

Por fim, conclui-se que, para que este equipamento seja utilizado como um dispositivo de retenção celular seguro e eficaz em cultivos de células animais em perfusão, o estudo com as ferramentas de fluidodinâmica computacional pode ser importante para melhor compreender o fenômeno de separação das fases dentro do hidrociclone, auxiliando na tomada de decisões sobre os parâmetros geométricos a serem modificados para aumento de eficiência (total e reduzida) do equipamento, como por exemplo, o aumento do diâmetro do *underflow* ou a diminuição dos ângulos do hidrociclone.

Referências bibliográficas

- Adamson, R. (1994), Design and operation of a recombinant mammalian cell manufacturing process for rFVIII, *Annals of Hematology*. 68, S9-S14.
- Alves, P.M., Carrondo, M.J.T., Cruz, P.E. (2008), Introduction to animal cell technology. Em: Castilho, L.R., Moraes, A.M., Augusto, E.F.P., Butler, M. (eds.), *Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, cap. 1, pg. 1-12, Taylor & Francis Group, New York.
- Augusto, E.F.P., Oliveira, M.S. (2001), Processos com células animais. Em: Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W., *et al* (eds.), *Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos*, vol. 3, pg. 547-582, Editora Edgard Blücher LTDA, São Paulo.
- Boedeker, B.G.D. (1992), The manufacturing of the recombinant factor VIII, Kogenate. *Transfusion Medicine Reviews*, vol. 6, n. 4, 256-260.
- Bonham-Carter, J., Weegar, J., Nieminem, A., Shevitz, J., Eliezer, E. (2011), The use of the ATF system to culture chinese hamster ovary cells in a concentrated fed-batch system, *BioPharm International* v. 24, n. 6, 42-48.
- Bretney, E. (1891), Water purifier. Patente: n. US 453105, concedida em 26/05/1891.
- Castilho, L.R., Medronho, R.A. (2002), Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 74, 129-169.
- Castilho, L.R., Medronho, R.A. (2008), Animal cell separation. Em: Castilho, L.R., Moraes, A.M., Augusto, E.F.P., Butler, M. (eds.), *Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, cap. 11, pg. 274-293, Taylor & Francis Group, New York.
- Chico-Véliz, E., Rodríguez, G., Figueredo-Cardero, A. (2008), Bioreactors for animal cells. Em: Castilho, L.R., Moraes, A.M., Augusto, E.F.P., Butler, M. (eds.), *Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, cap. 9, pg. 221-258, Taylor & Francis Group, New York.

- Choo, C., Tian, Y., Kim, W., Blatter, E., Conary, J., Brady, C. (2007), High-Level Production of a Monoclonal Antibody in Murine Myeloma Cells by Perfusion Culture Using a Gravity Settler, *Biotechnology Progress*, 23, 225-231.
- Crowley, J., Wubben, M., Martin, J.M.C., (2008), Process for cell culturing by continuous perfusion and alternating tangencial flow. Patente: n. US 2008/0131934 A1, concedidaem 05/06/2008.
- Deckwer, W., Medronho, R.A., Anspach, B., Luebberstedt, M., (2005), Method for separating viable cells from cell suspensions. Patente: n. US 6878545 B2, concedidaem 12/04/2005.
- Elsayed, E.A., Medronho, R.A., Wagner, R., Deckwer, W.D. (2006), Use of hydrocyclones for mammalian cell retention: separation efficiency and cell viability (part 1), *Engineering in Life Sciences*, vol. 6, n. 4, 347-354.
- Fenge, C., Klein, C., Heuer, C., Siegel, U., Fraune, E. (1993), Agitation, aeration and perfusion modules for cell culture bioreactors, *Cytotechnology*, 11, 233-244.
- Figueredo-Cardero, A., Chico, E., Castilho, L. R., Medronho, R.A. (2009), CFD simulation of an internal spin-filter: evidence of lateral migration and exchange flow through the mesh, *Cytotechnology*, 61, 55-64.
- Figueredo-Cardero, A., Chico, E., Castilho, L., Medronho, R.A. (2012), Particle image velocimetry (PIV) study of rotating cylindrical filters for animal cell perfusion processes, *Biotechnology Progress*, vol. 28, n.6, 1491-1497.
- Finch, J. A., Matwijkenko, O. (1977), Individual mineral behaviour in a closed grinding circuit. Anais da Annual Meeting of SME of AIME, Pre-print No 77-B-62, Atlanta, USA.
- Hufford, K. (2007), Comparison of the growth and monoclonal antibody production of suspended mammalian cells in three perfusion systems, Tese de Mestrado, Biological Engineering Division/Massachusetts Institute of Technology, Massachusetts, United States, 141p.
- Jockwer A, Medronho RA, Wagner R, Anspach FB, DeckwerWD (2001) The use of hydrocyclones for mammalian cell retention in perfusion bioreactors. In: Olsson

EL, ChatzissavidouN, Lu'llau E (eds) Animal cell technology:from target to market. Kluwer Academic Publishers,Dordrecht, pp 301–305

Kaiser, S., Eibl, D. (2011), Mechanical stress analysis of transfected CHO suspension cells in different pumps, Part A, Project Report, Zurich University of Applied Sciences.

Kilavuz, F. Ş., Gülsoy, Ö. Y.(2011),The effect of cone ratio on the separation efficiency of small diameterhydrocyclones. International Journal of Mineral Processing, 98(3), 163-167.

Kompala, D. S., Ozturk, S. S. (2006), Optimization of high cell density perfusion bioreactors. Em: Ozturk, S. S., Hu, W. (eds.), Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies, cap. 11, pg. 387-416, Taylor & Francis Group, New York.

Kretzmer, G. (2002), Industrial processes with animal cells, AppliedMicrobiologyAndBiotechnology, 59, 135-142.

Léo, P., Galesi, A.L.L., Suazo, C.A.T., Moraes, A.M. (2008),Animal cells: basic concepts. Em: Castilho, L.R., Moraes, A.M., Augusto, E.F.P., Butler, M. (eds.), Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy, cap. 2, pg. 13-38, Taylor & Francis Group, New York.

Medronho, R.A. (2003), Solid-liquid separation.Em: Mattiasson, B., Hatti-Kaul, R. (eds.), Isolation and Purification of Proteins, cap. 5, pg. 131–190, Marcel Dekker, New York.

Mellado, M.C.M., Castilho, L.R. (2008), Proteínas recombinantes terapêuticas. Em: Castilho, L.R., Moraes, A.M., Augusto, E.F.P. (eds.), Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica, cap. 16, pg. 384-402, Editora Roca, São Paulo.

Neesse, T., Schneider, M., Dueck, J., Golyk, V., Buntenschach, S., Tiefel, H. (2004), Hydrocyclone operation at the transition point rope/spray discharge, Minerals Engineering, 17, 733-737.

- Nowakowski, A.F., Doby, M.J. (2008), The numerical modeling of the flow in hydrocyclones, *KONA Powder and Particle Journal*, 26, 66-80.
- Ozturk, S. S. (2006), Cell culture technology – an overview. Em: Ozturk, S. S., Hu, W. (eds.), *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies*, cap. 1, pg. 1-14, Taylor & Francis Group, New York.
- Pinto, R. C.V. (2007), Separação de células CHO utilizando hidrociclones, Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 100p.
- Pinto, R.C.V., Medronho, R.A., Castilho, L.R. (2008), Separation of CHO cells using hydrocyclones, *Cytotechnology*, 56, 57-67.
- Svarovsky, L. (2000), Characterization of particles suspended in liquids. Em: Svarovsky, L. (ed.), *Solid-liquid Separation*, cap. 2, pg. 30-65, Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Svarovsky, L. (2000), Efficiency of separation of particles from fluids. Em: Svarovsky, L. (ed.), *Solid-liquid Separation*, cap. 3, pg. 66-103, Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Shen, A.Y., Van de Goor, J., Zheng, L., Reyes, A.E., Krummen, L.A. (2006), Recombinant DNA technology and cell line development. Em: Ozturk, S. S., Hu, W. (eds.), *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies*, cap. 2, pg. 15-40, Taylor & Francis Group, New York.
- Wang, B. (2009), Modelling the multiphase flow in cyclones, Tese de Doutorado, School of Materials Science and Engineering/Faculty of Science/The University of New South Wales, Sydney, Australia, 306p.
- Woodside, S.M., Bowen, B.D., Piret, J.M. (1998), Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors, *Cytotechnology*, 28, 163–175.
- Yabannavar, V.M., Singh, V., Connelly, N.V. (1992), Mammalian Cell Retention in a Spin filter Perfusion Bioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 925-933.
- Yang, Q., Wang, H., Liu, Y., Li, Z. (2010). Solid/liquid separation performance of hydrocyclones with different cone combinations, *Separation and Purification Technology*, 74, 271-279.

Apêndice A1 – Desenho técnico do hidrociclone projetado

