UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MARLON DE SOUZA GAMA

ANÁLISE DE MODELOS ELETROSTÁTICOS PARA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS VIA EQUAÇÃO DE POISSON-BOLTZMANN MODIFICADA

RIO DE JANEIRO

2016

MARLON DE SOUZA GAMA

ANÁLISE DE MODELOS ELETROSTÁTICOS PARA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS VIA EQUAÇÃO DE POISSON-BOLTZMANN MODIFICADA

Dissertação de Mestrado submetida ao corpo docente da Escola de Química como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientadores:

Prof. Dr. Frederico Wanderley Tavares

Prof. Dr. Amaro Gomes de Barreto Jr.

RIO DE JANEIRO

2016

Gama, Marlon de Souza.
Análise de Modelos Eletrostáticos para Adsorção de Proteínas via Equação de Poisson-Boltzmann Modificada / Marlon de Souza Gama – 2016.
76, folhas f.: il.; 29,7cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2016.

Orientadores: Frederico Wanderley Tavares e Amaro Gomes Barreto Júnior.

1. Modelagem e Simulação de Processos. 2. Adsorção de Proteínas – Dissertação. I. Tavares, Frederico Wanderley (Orient.). II. Barreto Jr., Amaro Gomes (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. IV. Título.

MARLON DE SOUZA GAMA

ANÁLISE DE MODELOS ELETROSTÁTICOS PARA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS VIA EQUAÇÃO DE POISSON-BOLTZMANN MODIFICADA

Dissertação de Mestrado submetida ao corpo docente da Escola de Química como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Aprovada por:

_____

Prof. Eduardo Rocha de Almeida Lima, D. Sc.
IQ/UERJ

_____

Profª. Helen Conceição Ferraz, D. Sc.
PEQ/COPPE/UFRJ

_____

Profª. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D. Sc.
EQ/UFRJ

_____

Prof. Frederico Wanderley Tavares, D. Sc.
Orientador (EQ-UFRJ)

_____

Prof. Amaro Gomes de Barreto Jr., D. Sc.
Orientador (EQ-UFRJ)

RIO DE JANEIRO

2016

"Words are, in my not-so-humble opinion, our most inexhaustible source of magic." – J. K. Rowling

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades colocadas em minha vida e por me dar forças e discernimento no meu caminho. Obrigado Senhor pela virtude da paciência, não sei do que seriam das minhas amizades sem ela; agradeço também por abençoar meus orientadores com o dom da compreensão e sabedoria.

Agradeço pelo apoio recebido pela minha família dispersa por este mundo. Em especial, obrigado Stephanie Gama pelas horas no telefone conversando banalidades e por trazer a este mundo Monique, o bebê mais fofo que tive o prazer de conhecer.

Ao prof. Amaro G. Barreto Jr. por ter me aceito como pupilo e por ter me incentivado e acreditado em mim, mesmo nos momentos em que duvidei de minha própria capacidade intelectual. Obrigado pela amizade, ensinamentos e pela serenidade nestes últimos dois anos. Agradeço também ao prof. Frederico W. Tavares por ter sempre um tempo disponível para tirar minhas dúvidas. Graças ao senhor, eu, milagrosamente, entendi algo em termodinâmica.

Sou eternamente grato pela oportunidade de ter trabalhado no grupo ATOMS. Foi neste grupo que conheci as pessoas mais interessantes da UFRJ. Aqueles que tomam um café conosco depois do almoço sabem é possível incluir política, MPB, funk e termodinâmica em uma única linha de pensamento. Obrigado Ingrid Azevedo, Renata Gaioto, Fellipe Carvalho e Gabriel Duarte pela amizade, pela falta de respeito e pelo companheirismo.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos da república A Casa Lar. Nunca imaginei que conseguiria sobreviver dividindo uma casa com mais de dez pessoas. Isso tornou-se possível graças às pequenas bênçãos que habitam naquela casa: Ricardo de Santana (Eng. Química), Gabriela Mathias, Arthur Braga (do mundo), Henrique Auxêncio (Educação Física), Janini Suarez (Escola de Belas Artes) e Bianca Teixeira (Biomedicina). Amo vocês, seus lindos.

Agradeço também a você querido leitor. Espero que minha contribuição com a comunidade científica possa ajudá-lo em sua jornada.

RESUMO

GAMA, Marlon de Souza. Análise de Modelos Eletrostáticos para Adsorção de Proteínas via Equação de Poisson-Boltzmann Modificada. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Cromatografia de troca-iônica tem sido amplamente utilizada como procedimento de purificação e análise de proteínas. A adsorção no leito cromatográfico tem como base as interações eletrostáticas atrativas entre a superfície da fase estacionária e a proteína. Apesar da variedade de modelos e considerações existentes na literatura, há necessidade de modelos adequados visando melhorar a predição do comportamento de proteínas na adsorção. Aqui é apresentada uma metodologia para a resolução da equação de Poisson-Boltzmann (PB) modificada aplicada a adsorção de anticorpos monoclonais (mAbs). Considerou-se uma geometria biesférica e inclusões dos termos de dispersão entre íons-proteína e íons-superfície, o que possibilitou a descrição dos efeitos de Hofmeister. Da resolução da equação de PB modificada em coordenadas biesféricas, obtém-se o cálculo do potencial de campo médio entre o par proteína-superfície. O modelo mostrou-se capaz de predizer o comportamento adsortivo para anticorpos monoclonais em diferentes fases estacionárias. Uma análise de sensibilidade do modelo para os mAbs foi realizada, na qual verificou-se o comportamento de diferentes tipos de sais e sua relação com a série de Hofmeister. Com a finalidade de avaliar as limitações das hipóteses do modelo, as resoluções da equação de PB, na sua forma linear e em sistemas de coordenadas biesféricas, foram analisadas para a lisozima. Para esta última análise, necessita-se para ambos os modelos uma melhor representação da densidade de carga para casos em que a carga da proteína não é homogênea em sua superfície, como avaliado para a lisozima.

ABSTRACT

GAMA, Marlon de Souza. Electrostatic Models Analysis for Protein Adsorption by Modified Poisson-Boltzmann Equation. Dissertation (Master of Science) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Ion Exchange Chromatography has been widely used as strategy of purification and protein analysis. The bed adsorption chromatography is based on electrostatics attractive interactions between the surface of the stationary phase and the protein. Different kind of models and considerations is found at the literature, however, is a necessity of accurate models to improve the prediction behavior of protein adsorption. Here, a methodology for the resolution of the modified Poisson-Boltzmann (PB) equation applied for monoclonal antibodies (mAbs) adsorption is showed. A bispherical geometry was considered and the dispersion terms between ions-protein and ion-support was included, allowing the account of Hofmeister's effect. From the modified PB resolution in bispherical geometry, the calculus of potential of mean force between protein-surface is obtained. The model was capable to predict the adsorption behavior for mAbs in different stationary phases. A sensibility model analysis was performed for the mAbs where the behavior of different type of salts and its relationship with the Hofmeister's series was confirmed. In order to evaluate the limitations of the model hypotheses, the PB resolution at the linear and bispherical coordinates were compered for a singular protein-support system for lysozyme adsorption. For this latter analysis, a better representation of charge density is required for both models in cases where the protein charge is not homogeneous on its surface, as evaluated for lysozyme.

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Valores das densidades dos grupos amina, histidina e carboxílicos calculados para a proteína e para as fases estacionárias..... 29

Tabela 5.2. Comparação dos valores adotados para as constantes de dissociação dos grupos iônicos e associação dos sais de acordo com a literatura e com a predição feita pelo software online ACD/I-Lab. 30

Tabela 6.1. Valores dos R^2 determinados visando a comparação entre os pontos experimentais com o modelo de predição. 44

Tabela 7.1. Comparação entre os números de grupamentos iônicos estimados com os reportados na literatura para a lisozima..... 49

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura geral dos aminoácidos. A prolina é a única exceção a esta regra, possuindo uma cadeia cíclica que liga o radical a amina. Para os aminoácidos, a diferença entre suas estruturas é a cadeia ligada ao carbono alfa (grupamento R). 6

Figura 2.2. Perfil genérico para a isoterma de adsorção de Langmuir. 8

Figura 2.3. Fluxograma geral do processo de purificação da mAbs. Adaptado de (KELLEY, 2009). 10

Figura 2.4. Princípios da cromatografia de troca-iônica (eluição com gradiente salino). (A) é referente ao contra-íons presentes na solução tampão; (B) substâncias a serem separadas; (C) íons; (D) Fase estacionária atribuída de cargas positivas (para trocador catiônico) ou negativas (trocador aniônico). Versão adaptada de (AMERSHAM PHARMACIA, 1999). 13

Figura 3.1. Lista dos aminoácidos ionizáveis e que geram cargas na proteína. Grupos com cargas positivas: arginina, histidina e lisina; Grupos com cargas negativas: glutamato e aspartato. 16

Figura 4.1. (A) Para um determinando íon, é estabelecida uma distancia r_{1j} para a primeiro centro da esfera e r_{2j} para o centro da segunda esfera, sendo $j = 1, 2 \ldots n$ relativo ao numero de íons. (B) A malha representa os pontos discretizados em que o potencial de campo médio é computado. 21

Figura 5.1. Sistema de interação da proteína (esfera) com o suporte carregado (plano) para uma distância *h*. 25

Figura 6.1. Densidade de cargas da bevacizumab em função do pH para uma faixa de concentração de NaCl entre 0.0 a 1.0 mol L^{-1}. 35

Figura 6.2. Densidade de cargas da trastuzumab em função do pH para uma faixa de concentração de NaCl entre 0.0 a 1.0 mol L^{-1}. 36

Figura 6.3. Densidade de cargas da mAb1 em função do pH para uma faixa de concentração de NaCl entre 0.0 a 1.0 mol L^{-1}. 36

Figura 6.4. Efeito do pH no potencial de força média, obtida pela equação de PB, para diferentes distâncias entre a superfície do sistema plano-esfera utilizando a

proteína mAb1. Concentração de NaCl de 0,3 mol L^{-1} (Fractogel EMD SE HiCap). 37

Figura 6.5. Perfil de concentração de íon cloreto em torno da mAb1 e da fase estacionária para pH de 6.3 interagindo em solução de NaCl 0.3 mol L^{-1}.38

Figura 6.6. Potencial de força media obtido pelo cálculo da equação de PB em coordenadas biesféricas em função da distância entre a superfície da mAb1 e da fase estacionária para uma concentração de sal de 0.3 mol L^{-1} NaCl (Fractogel EMD SE HiCap). 39

Figura 6.7. Comparação entre os potenciais de força media adimensionais para três diferentes tipos de (A) aníons e (B) cátions. A distância entre esfera-plano foi fixada em $k_D h = 1$ para melhor análise, com força iônica igual a 0.3 mol L^{-1} (Fractogel EMD SE HiCap). 40

Figura 6.8. Perfis da constante de Henry para a adsorção de mAb1 em uma coluna de troca-iônica possuindo como fase estacionária: (A) Fractogel EMD SE HiCap e (B) YMC BioPro SP (10 μm) em função da força iônica e pH do meio. Os perfis foram gerados sem a necessidade de estimação de parâmetros, sendo os círculos os dados experimentais presentes na bibliografia (GUÉLAT et al., 2010). 42

Figura 6.9. Perfis da constante de Henry para a adsorção de proteínas em uma coluna de troca-iônica possuindo como fase estacionária YMC BioPro SP (5 μm): (A) representa a predição para Bevacizumab e (B) Trastuzumab. Os perfis foram gerados sem a necessidade de estimação de parâmetros, sendo os círculos os dados experimentais presentes na bibliografia (GUÉLAT et al., 2013)..... 43

Figura 6.10. Efeito teórico da influência de três diferentes tipos de (A) ânions e (B) cátions na constante de Henry para adsorção de mAb1 em uma coluna de troca-iônica possuindo como fase estacionária Fractogel EMD SE HiCap. Para os cátions, foi realizado predições no pH de 4,4 e pH de 6,4. 45

Figura 7.1. Perfil experimental e calculado da constante de Henry para lisozima com fase estacionária Fractogel EMD SE HiCap. Os perfis foram gerados após a estimação de parâmetros. Os círculos são os dados experimentais presentes na bibliografia (GUÉLAT et al., 2010). 47

Figura 7.2. Comparação entre o perfil gerado após a estimação dos parâmetros (linha cheia) com o cálculo preditivo do comportamento da lisozima (linha tracejada). Os círculos são os dados experimentais presentes em (GUÉLAT et al., 2010), para pH 4,4. 48

Figura 7.3. Efeito do raio hidráulico na modelagem do perfil adsortivo da lisozima. A linha cheia representa o perfil gerado pela estimação de parâmetros com raio de 24 Å, enquanto que os perfis tracejados apresentam a predição do comportamento para os raios de: 24 Å, 19 Å (BONINCONTRO et al., 1998) e 16 Å. Os círculos são os dados experimentais presentes em (GUÉLAT et al., 2010), para pH 4,4. 50

Figura 7.4. Possível orientação da lisozima no processo adsortivo (KUBIAK; MULHERAN, 2009). 51

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO 1
MOTIVAÇÃO 3
OBJETIVOS 3
ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO 4
CAPÍTULO 2. ADSORÇÃO E FORÇAS INTERMOLECULARES 5
2.1. PROTEÍNAS 5
2.2. ADSORÇÃO DE PROTEINAS 6
2.3. ANTICORPOS MONOCLONAIS 9
2.4. LISOZIMA 11
2.5. CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA 11
2.6. DUPLA CAMADA ELÉTRICA 14
2.7. ESPECIFICDADE IÔNICA 14
CAPÍTULO 3. DENSIDADE SUPERFICIAL DE CARGAS 16
3.1. GRUPOS IÔNICOS DA PROTEINA 16
3.2. DENSIDADE DE CARGAS 17
CAPÍTULO 4. MODELOS ELETROSTÁTICOS APLICADOS PARA DIFERENTES SISTEMAS 19
4.1. EQUAÇÃO DE PB LINEARIZADA 19
4.2 EQUAÇÃO DE PB MODIFICADA EM COORDENADAS BIESFÉRICAS 22
CAPÍTULO 5. METODOLOGIA 24
5.1 METODOLOGIA DE CÁLCULO PARA AS PROTEÍNAS EM COORDENADAS BIESFÉRICAS 25
5.2. GRUPOS IÔNICOS DA PROTEÍNA 28
5.3. CONTABILIZAÇÃO DAS DENSIDADE DE GRUPAMENTOS IÔNICOS 29
5.4. CONTABILIZAÇÃO DA DENSIDADE DE CARGAS 31
5.5. METODOLOGIA DE CÁLCULO PARA A LISOZIMA 33
CAPÍTULO 6. ADSORÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS 35
CAPÍTULO 7. ADSORÇÃO DE LISOZIMA 47
CAPÍTULO 8. CONCLUSÕES E SUGESTÕES 52
APÊNDICE A: CÁLCULO NUMÉRICO DA CONSTANTE DE HENRY 53
REFERÊNCIAS 56

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

Proteínas são compostos biológicos formados por uma cadeia de aminoácidos presentes na mais simples bactéria até o mais complexo ser vivo. Enzimas, hormônios e outros compostos químicos são classificados como proteínas e são utilizadas pelos organismos vivos para diversas finalidades.

O desenvolvimento de melhores técnicas e métodos de separação e purificação de proteínas possibilitou um grande avanço na área biotecnologia. Por conta disto, é amplamente conhecido que a aplicação da lisozima na área de alimentos permita o controle de bactérias que convertem o ácido málico em ácido acético (LIBURDI et al., 2014); e que a bevacizumab e a trastuzumab, por exemplo, apresentam aplicações no combate de diversos tipos de câncer (GARNOCK-JONES et al., 2010; KEATING, 2014).

Dentre as técnicas de purificação em coluna, a cromatográfica de troca iônica destaca-se em aplicações industriais por possuir alto poder de resolução, elevada capacidade de adsorção e versatilidade. Contudo, os mecanismos fundamentais de interação entre a proteína e a superfície carregada não são completamente compreendidos (JANSON, 2011).

Uma das primeiras tentativas de predizer o comportamento de sistemas coloidais teve origem na teoria da dupla camada elétrica (VERWEY, E. J. W., OVERBEEK, 1948) utilizando a equação linearizada de Poisson-Boltzmann (PB) (VERWEY, 1947). Posteriormente, com base na contribuição de Hamaker (1937), Verwey (1947) e Ståhlberg et al. (1992) mostraram que uma considerável melhora na predição dos potenciais eletrostáticos são alcançadas com a combinação do termo atrativo correspondente ao potencial de London-van der Waals entre proteína-proteína e entre proteína-adsorvente com o termo interação eletrostático.

Apesar desta grande contribuição, são poucos os modelos existentes capazes de predizer o comportamento de proteínas. Mesmo nos casos em que são aplicados modelos que incluem informações das propriedades das proteínas, a extensão do uso destas informações são escassas (ROTH; LENHOFF, 1993).

Um modelo frequentemente aplicado é o Modelo de Reação Química Estequiométrica (do inglês *Stoichiometry Mass Action* - SMA) (IYER et al., 1999; CHEN et al., 2006) que define uma reação de deslocamento estequiométrico do sal presente na superfície do adsorvente estacionário pela adsorção da proteína. Todas as

informações de caráter eletrostáticas e de equilíbrio são inseridas em parâmetros de correlação sem uma clara significância física, tornando-se não adequado para o propósito da predição. O modelo SMA desconsidera ainda importantes efeitos como a iteração do co-íon e efeitos não-eletrostáticos (NES) (BROOKS; CRAMER, 1992). Essa omissão acarreta uma pobre precisão em elevadas concentrações salinas ou em valores de pH próximos do ponto de carga neutra da proteína (CHEN et al., 2006), sendo melhor observados em modelos que seguem a teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO).

Negligenciar NES em baixas concentrações (0,01 M) causa pequenos desvios no cálculo das propriedades de interfaces. Entretanto, a elevadas concentrações salinas (0,3 M), o resultado muda drasticamente, implicando a necessidade de melhor teoria de coloides para sistemas biológicos (BOSTRÖM et al., 2001). Com o propósito de verificar o efeito de tipos de íons (série de Hofmeister), as forças de dispersão devem ser consideradas (ZHANG; CREMER, 2006). Além disso, a computação do potencial da força média pode ser aplicada para definir os parâmetros de equilíbrio de proteínas (MOREIRA et al., 2007; LIMA, E R A; BISCAIA; et al., 2007a), ou informações de equilíbrio no processo de adsorção, como o fator de retenção (GUÉLAT et al., 2010).

Uma otimização do modelo foi sugerida por Roth e Lenhoff (1993) com base nas configurações tridimensionais da proteína, usando informações da malha conformacional da lisozima durante a interação com a fase estacionaria. A solução da equação de PB desenvolvida, levando em consideração a geometria do sistema, formula um melhor entendimento físico das interações entre dois coloides ou coloide-superfície, em contraste com as aproximações que usam uma geometria planar e a aproximação de Derjaguin, adaptação da geometria plano-plano para a de esfera-plano (JÖNSSON; STÅHLBERG, 1999; ADAMCZYK; WEROŃSKI, 1999; GUÉLAT et al., 2010).

A resolução da equação de PB em coordenadas biesféricas, levando em consideração o termo de dispersão eletrostático entre íon e proteína (LIMA, E R A; BISCAIA; et al., 2007a), foi aplicada para a determinação do potencial de campo médio para calcular o coeficiente osmótico como função da força iônica para diferentes sais.

Com o intuito de descrever a adsorção de proteínas em colunas de troca iônica, o potencial de campo médio foi calculado e usado para determinar a constante de Henry para diferentes proteínas, considerando a proteína como um coloide carregado.

MOTIVAÇÃO

Proteínas são macromoléculas compostas por diferentes tipos de aminoácidos e presentes em todos os seres vivos. Em especial, merece destaque sua importância na indústria farmacêutica, relacionada a medicamentos e a diversas doenças. O processo de purificação de proteínas por cromatografia de troca iônica, possui alto custo. A otimização do processo depende da melhoria de entendimento das interações eletrostáticas entre as proteínas e suporte. Sabendo que a seletividade do produto desejado pode ser otimizada pela variação da concentração de sal e pH, um modelo que leva em consideração tipo de sal, concentração salina, pH, temperatura e tipo de suporte é fundamental para descrever a adsorção da proteína em coluna de troca iônica.

OBJETIVOS

A dissertação tem como principal objetivo calcular a constante de Henry para o processo de adsorção de proteínas em colunas de troca iônica, visando incluir diferentes efeitos eletrostáticos e não eletrostáticos.

Objetivos específicos:

1. Comparar a diferença entre a resolução da equação de Poisson-Boltzmann linearizada (analítica) e não linearizada.
2. Analisar o comportamento do potencial de campo médio para diferentes sais em geometria esfera-plano em função da distância à superfície para diferentes valores de pH.
3. Calcular a constante de Henry em função do pH e força iônica. Mostrar a relação com a série de Hofmeister (ordem direta ou inversa) para diferentes tipos de cátions e ânions.
4. Comparar a constante de Henry obtida para diversos sistemas (proteínas-suporte) com dados experimentais.

ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

O **Capítulo 2** apresenta a adsorção como ferramenta de separação e purificação utilizada nas indústrias químicas e farmacêuticas. Apresenta-se, também, a série de Hofmeister relacionada à purificação de proteínas e termodinâmica dos coloides.

O **Capítulo 3** descreve os aminoácidos ionizáveis presentes nas proteínas e o método de cálculo da densidade de cargas aplicado pela literatura. No **Capítulo 4** apresentam-se as equações e hipóteses utilizadas na literatura para a resolução da equação de Poisson-Boltzmann em diferentes coordenadas, incluindo as coordenadas biesféricas.

O **Capítulo 5** apresenta a metodologia aplicada para a resolução dos diferentes sistemas entre proteína-coloide. Os valores das constantes de associação e dissociação dos grupos iônicos são encontrados aqui.

Os resultados obtidos para a constante de Henry de anticorpos monoclonais em diferentes condições são apresentados no **Capítulo 6.** Uma análise de sensibilidade para diferentes tipos de sais e sua relação com a série de Hofmeister é apresentada.

O **Capítulo 7** mostra um estudo para o caso da lisozima que descreve a relação da constante de Henry com o pH e a concentração salina, similar ao reportado para os anticorpos monoclonais.

No **Capítulo 8** apresenta as conclusões para os resultados apresentados nos capítulos 6 e 7, assim como sugestões para o aprimoramento do modelo.

O **Apêndice A** contém uma das possíveis resoluções analítica da equação de PB descrita em sua forma linearizada. O resultado apresentado é aplicado no cálculo do estudo adsortivo da lisozima.

CAPÍTULO 2. ADSORÇÃO E FORÇAS INTERMOLECULARES

2.1. PROTEÍNAS

Proteínas são classicamente definidas como macromoléculas biológicas formadas por cadeias de aminoácidos constituída em todas as células e organismos vivos. Suas funções e tamanhos variam conforme a composição e sequência dos aminoácidos presentes na longa cadeia molecular (NELSON; COX, 2004).

A maior proteína encontrada no ser humano é a titina, possuindo 38.138 aminoácidos. Suas isoformas possuem peso molecular na faixa de 600 kDa até 3,7 MDa, correspondendo uma faixa de comprimento molecular de 0,2 – 1,4 μm (TSKHOVREBOVA; TRINICK, 2003). Em contraste, 30% de todas as proteínas possuem uma quantidade menor de aminoácidos em sua estrutura. O citocromo c tem 104 resíduos de aminoácidos conectados uma única cadeia; a quimotripsina bovina possui 245 resíduos. Apesar do tamanho, desempenham um papel fundamental em processos celulares (HEIM et al., 2015). Em sua grande maioria, proteína são encontradas naturalmente com menos que 2.000 resíduos de aminoácidos (NELSON; COX, 2004).

Apesar de fugir da finalidade deste trabalho, é interessante salientar que além da grande gama de proteínas naturais descoberta desde a mais antiga bactéria até a mais complexa estrutura biológica, as proteínas sintéticas são alvo de interesse na comunidade científica devido a suas peculiaridades. A Trp-Cage, por exemplo, é uma miniproteína sintética composta por somente 20 aminoácidos capaz de se dobrar de forma espontânea em uma estrutura globular, estrutura característica de grandes proteínas (MEUZELAAR et al., 2013). Esse interessante comportamento é controverso.

Proteínas sintéticas são criadas pela reprogramação do ribossomo responsáveis pela biossíntese da proteína alvo. A substituição de um único resíduo específico de aminoácido provoca grandes efeitos na estabilidade, atividade e demais propriedades proteicas (WILTSCHI, 2012).

Existem 20 tipos de aminoácidos que possuem cadeia ligada a um carbono alfa (**Figura 2.1**). O grupo ligado ao carbono pode ser polar, apolar, aromático ou carregado. Será discutido na Seção 2.5 a importância dos grupamentos na adsorção de proteínas em suportes carregados.

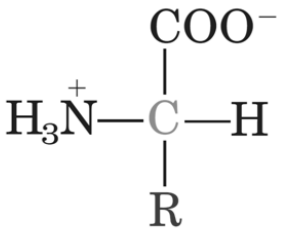


Figura 2.1. Estrutura geral dos aminoácidos. A prolina é a única exceção a esta regra, possuindo uma cadeia cíclica que liga o radical a amina. Para os aminoácidos, a diferença entre suas estruturas é a cadeia ligada ao carbono alfa (grupamento R).

Para as proteínas, a descrição e entendimento de suas conformações é um processo complexo, apresentando-se hierarquicamente pela definição de quatro arranjos estruturais. A descrição de todas as ligações covalentes e sequência em que aparecem os resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica é denominada como estrutura primária. A estrutura secundária refere-se a um particular arranjo devido as interações entre o hidrogênio com o oxigênio do seguimento carboxílico, resultando em uma estrutura similar a uma mola. A estrutura terciária descreve os aspectos tridimensionais da proteína, decorrentes do dobramento da cadeia polipeptídica. Por fim, quando a proteína possui mais de uma subunidade polipeptídica, o arranjo espacial é definido como uma estrutura quaternária (NELSON; COX, 2004).

2.2. ADSORÇÃO DE PROTEINAS

O estudo de adsorção de proteínas é de grande interesse em diversas áreas. É importante salientar que as proteínas adsorvem em todas as superfícies, sendo um problema em incrustação biológica em superfícies, implicando em biocorrosão (VIDELA; QUINTERO, 2007).

Em biomateriais, estudos recentes apresentam a não adsorção de albumina de soro bovino (do inglês, *bovine serum albumin* - BSA) e fibrinogênio em filmes de quitosana como possível material substituinte do plástico em cateteres (CARNEIRO et al., 2013) e estudo da anti-coagulação do sangue em superfícies da quitosana e carragenana (CAMPELO et al., 2016).

Santos et al. (2013) mostram como as diferenças estruturais da sílica mesoporosa do tipo SBA-15 (formada por cilindros arranjados em uma geometria hexagonal) e SBA-16 (aglomerado de nanoesferas) afetam a adsorção de BSA, lisozima e celulase.

Os autores utilizaram a capacidade máxima de adsorção como o parâmetro de análise. A BSA é frequentemente utilizada como proteína modelo para discussão do efeito adsortivo em diferentes diâmetros dos poros de sílicas (AMANO et al., 1988; ELTEKOVA; ELTEKOV, 2008; SANTOS et al., 2016).

As indústrias química e farmacêutica têm interesse na purificação de proteínas. O mercado de proteínas é estimado em 3.970 milhões de dólares em 2014 e pode atingir a marca de 6.370 milhões de dólares em 2020 (MARKETSANDMARKETS, 2015).

Apesar da grande contribuição científica, a maioria dos trabalhos citados são realizados em tanques agitados e possuem como objetivo o estudo de interações entre proteína-adsorvente. Etapas de cromatografia em colunas são amplamente utilizadas na purificação de proteínas em indústria, entretanto, de acordo com Asenjo e Andrews (2009), é impossível selecionar o melhor sequência de métodos de separação e purificação de proteínas devido à falta de conhecimentos dos fundamentos de adsorção e sua relação com as propriedades moleculares do adsorbato e adsorvente. Para processos complexos que envolvem a extração de proteínas desconhecidas, existem diferentes rotas de encontrar um valor máximo de eficiência para alcançar a pureza desejada.

Modelos como o SMA apresentaram um significante peso no desenvolvimento de teorias preditivas no contexto de interações eletrostáticas na adsorção de proteínas, importantes para cromatografia de troca iônica. Dentre as considerações feitas no modelo, temos que a eletroneutralidade do sistema deve ser mantida e que o sal interage com os sítios da fase estacionária e com a camada de hidratação da proteína (BROOKS; CRAMER, 1992).

Uma considerável limitação do SMA consiste na necessidade de estimação de parâmetros e na aplicação do modelo para condições lineares de adsorção, inapto de representar condições não-lineares de equilíbrio em que a saturação do fase estacionária é atingida, conforme apresentado didaticamente na **Figura 2.2**.

A delimitação da aplicação de modelos na região diluída, regida pela lei de Henry, ainda é uma problemática em modelos preditivos. Uma teoria abrangente e rigorosa para a adsorção de proteínas ainda é pendente. Enquanto isso, algumas partes do processo de adsorção estão tornando-se cada vez mais precisamente descritos.

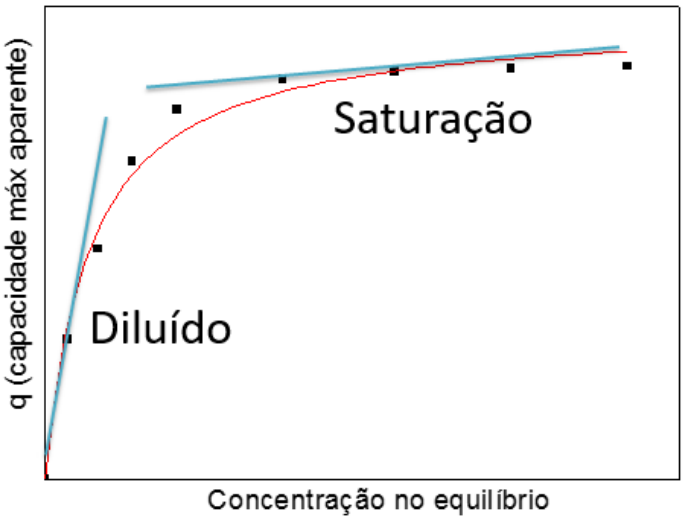


Figura 2.2. Perfil genérico para a isoterma de adsorção de Langmuir.

Conforme reportado por Ståhlberg et al. (1992), o modelo de deslocamento estequiométrico oferece um quadro aparentemente simples para a análise dos dados cromatográficos, contudo, é conhecido pela físico-química que as interações eletrostáticas não seguem a lei estequiométrica. Em seu trabalho, é apresentando a relação entre a energia livre do sistema eletrostático com o fator de retenção (relativo ao parâmetro de equilíbrio de adsorção para sistemas diluídos) em colunas cromatográficas.

Apesar de incomum, a constante de Henry em sua forma dimensional (*K*) é reportado por Ståhlberg et al. (1992), podendo ser comparada diretamente com dados experimentais de cromatografia pela relação:

$$k' = {t_R(pH, I) - t_{ref}}/{t_{ref}} = \varphi' K \qquad (2.1)$$

sendo k' o fator de retenção em coluna cromatográfica (adimensional), t_R o tempo de retenção (minutos), t_{ref} o tempo de retenção para o estado de não adsorção; e φ' o fator de fase, dado pela razão entre a área superficial disponível na superfície do adsorvente por unidade de volume do leito empacotado (m^2/m^3).

A constante de Henry é proporcional as principais variáveis do sistema: força iônica, natureza do íon, pH e temperatura. Ademais, é conhecida sua relação com a energia livre do sistema, conforme apresentado no Capítulo 5.

2.3. ANTICORPOS MONOCLONAIS

Conforme apresentado por Pinto et. al. (2015), o mercado para anticorpos monoclonais (mAbs) está em constante crescimento devido à aprovação de drogas e ensaios clínicos contendo este componente. Entretanto, o processo de *downstream* (recuperação e purificação do produto) é considerado um gargalo tecnológico. Uma das etapas no processo de *downstream* é a cromatografia de troca iônica, a qual será apresentada na seção seguinte.

Anticorpos monoclonais podem ser definidos como proteínas produzidas por linfócitos, tendo papel no reconhecimento e neutralização de substâncias ou antígenos desconhecidos no sangue.

O primeiro relato sobre o reconhecimento das mAbs ocorreu em 1975 com o trabalho de Köhler e Milstein, publicado na *Nature*, intitulado "*Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*" (KÖHLER e MILSTEIN 1975), recebendo, em 1984, o prêmio Nobel da Medicina.

Iremos abordar, neste trabalho, a adsorção de três diferentes tipos de mAbs: mAb1, Trastuzumab (nome comercial: Herceptin®) e Bevacizumab (nome comercial: Avastin®). A escolha deve-se a facilidade de informações dispostas na literatura sobre a quantidade de grupos ionizáveis, os parâmetros de adsorção e dados experimentais de constante de Henry (descrito no **Capítulo 3**).

Bevacizumab é um anticorpo monoclonal derivado da imunoglobulina G (IgG) produzida no ovário do hamster chinês. Sua aprovação comercial ocorreu em 2005 nos Estados Unidos, sendo indicada desde então para o tratamento de câncer de colo-renal, câncer de mama, câncer de pulmão, dentre outros. Sua aplicação geralmente ocorre em pacientes com estágio avançado durante a quimioterapia, por conta dos possíveis efeitos colaterais. Bevacizumab é capaz de agir sobre todas as isoformas da proteína responsável por nutrir o tumor, inibindo seu crescimento (KEATING, 2014).

Trastuzumab, por sua vez, é utilizada no tratamento do câncer de mama nos estágios iniciais. Apesar da grande eficácia em conjunto com a quimioterapia, ainda são necessários estudos para avaliar o melhor tempo de duração do tratamento, bem como a complexa determinação do mecanismo de ação da droga no tumor (GARNOCK-JONES et al., 2010).

O processo de produção e purificação das mAbs é desafiador. Dentre as problemáticas, reatores com volumes superiores à 10.000 L são utilizados no cultivo de

células para uma purificação final de 10-100 kg de mAbs (KELLEY, 2009). Para a bevacizumab, vestígios das células mamíferas, DNA, vírus e agregados são as principais impurezas encontradas, necessitando de múltiplas etapas de purificação.

Na **Figura 2.3** apresenta-se um fluxograma geral de purificação destes bioprodutos (KELLEY, 2009; PINTO et al., 2015).

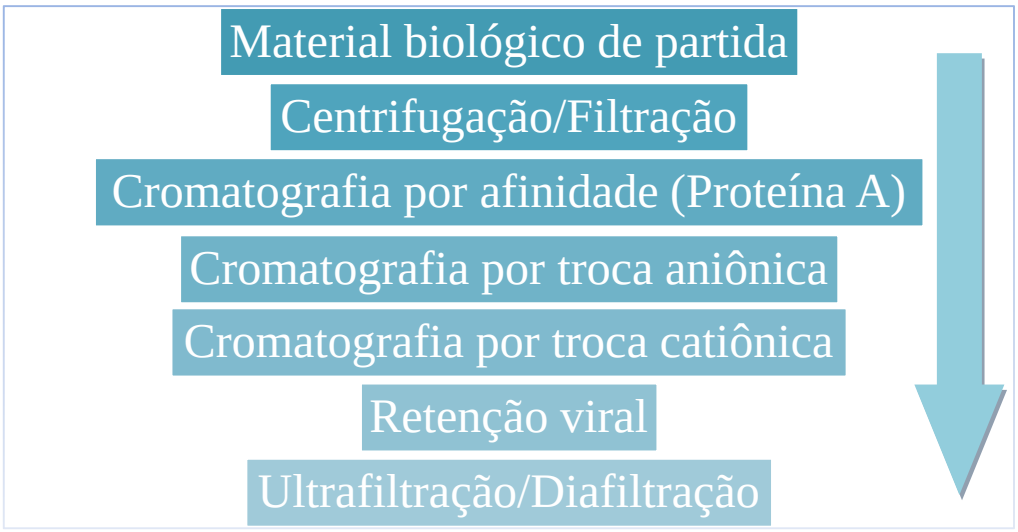


Figura 2.3. Fluxograma geral do processo de purificação da mAbs. Adaptado de (KELLEY, 2009).

A cromatografia por afinidade utilizando a Proteína A como ligante é utilizada para a purificação de mAbs devido sua melhor seletividade na proteína alvo (HOBER et al., 2007). Entretanto, o custo da fase estacionária é elevado, podendo chegar a 50% do custo total do processo de *downstream* (PINTO et al., 2015).

A cromatografia de troca-iônica é frequentemente utilizada como uma etapa de polimento, eliminando contaminantes presentes em solução como fragmentos de células e agregados, caso não exista a etapa de centrifugação, vestígios de DNA, proteína A e vírus. A natureza catiônica ou aniônica e a sequência em que esta etapa é aplicada no processo de purificação depende dos contaminantes que devem ser removidos para garantir o grau de pureza final desejado (PINTO et al., 2015).

O processo de purificação da bevacizumab consiste em quatro passos apresentados na **Figura 2.3**: cromatografia por afinidade utilizando a proteína A, cromatografia por troca aniônica, cromatográfica por troca catiônica e ultrafiltração/diafiltração.

A coluna de afinidade é o primeiro passo para o processo de purificação da bevacizumab. A coluna utiliza uma resina imobilizada com proteína A, que interage

com um alto grau de seletividade com a cultura de células colhidas. Este processo de afinidade purifica a bevacizumab com respeito as células presentes no fluido e DNA. Para inativação viral, a fase fluida da coluna deve passar por um processo de inativação viral protocolado. A etapa de afinidade é seguida pela cromatografia de troca aniônica que é designada para reduzir os vestígios de células, DNA, proteína A e potenciais vírus. A etapa de cromatografia catiônica é utilizada em seguida para redução do teor de células ainda presentes, bactericidas e agregados de bevacizumab formados. Por fim, o material obtido na saída da coluna catiônica é concentrada e tratada no sistema de ultrafiltração e diafiltração (EMA, 2005).

2.4. LISOZIMA

À parte de sua aplicação na indústria de alimentos, a lisozima é pode ser considerada como uma proteína padrão na área de adsorção. Seu estudo abrange uma grande faixa de interesse acadêmico, contendo informações de análises do comportamento adsortivo em diversos tipos de adsorventes, como nanopartículas de quitosana revertidas com metais (SUN et al., 2011) ou SBA-15 e SBA-16 (SANTOS et al., 2013). Estudo sobre a dependência da estrutura desta enzima com o potencial eletrostático e da mudança da constante de dissociação dos resíduos em função da concentração de sal é reportado na literatura (ABE et al., 1995), apresentando a dependência da força iônica e do pH da solução nas constantes de dissociação e associação dos resíduos presentes na superfície da proteína. Apesar desta influência, para uma faixa de pH entre 4,0 e 6,0, a atividade biológica da lisozima atinge seu máximo, em que é encontrada uma estabilidade conformacional com um raio hidrodinâmico constante (BONINCONTRO et al., 1998).

2.5. CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA

Vários tipos de colunas podem ser usadas na etapa de purificação, sendo a escolha da coluna dependente dos componentes orgânicos e inorgânicos presentes no meio e da interação entre a proteína-alvo e a fase estacionária.

A cromatografia por exclusão de tamanho é amplamente utilizada para separação de agregados com base em seu raio hidrodinâmico com pouco impacto na modificação da estrutura conformacional da macromolécula (FEKETE et al., 2014). A cromatografia por interação hidrofobia é utilizada para remover contaminantes e formas

indesejáveis da mAbs (CHEN et al., 2008). A eficiência dessa cromatografia depende da diferença de hidrofobicidade entre a superfície da proteína e do suporte. Não existe uma teoria universal sobre o mecanismo de separação pelo processo de interação hidrofóbica, contudo, inúmeras sugestões podem ser encontradas na literatura (GE HEALTHCARE, 2006).

A técnica mais empregada na purificação e separação de proteínas, polipeptídios, ácidos nucleicos e outras biomoléculas carregadas eletricamente é a de troca-iônica, devido a sua alta capacidade, simplicidade e controle do processo (AMERSHAM PHARMACIA, 1999).

Os processo de purificação das mAbs em coluna de troca-iônica podem ser realizados em cinco estágios, conforme apresentados na **Figura 2.4**. No primeiro estágio ocorre o equilíbrio em que a fase estacionária apresenta forte interação resina-proteína, em função do pH e força iônica. No segundo estágio, ocorre a adsorção das moléculas por interações eletrostáticas com a resina, deslocando os contra-íons previamente ligados. As substâncias que não estão ligadas à fase estacionária são retiradas da coluna. No terceiro estágio, as substâncias adsorvidas são removidas da coluna pela mudança de concentrações de sal e/ou pH da solução de eluição, tornando desfavorável a adsorção da proteína no suporte carregado. Conforme mostrado na **Figura 2.4**, a dessorção é alcançada pela mudança de concentração de sal, sendo os ligantes liberados na ordem de suas forças de ligação. Os componentes de ligações mais fracas são liberados primeiro.

O quarto e quinto estágios são destinados a remoção dos componentes ainda presentes na coluna, que não foram eluídos no estágio anterior. A coluna é preparada para as condições do primeiro estágio do novo ciclo.

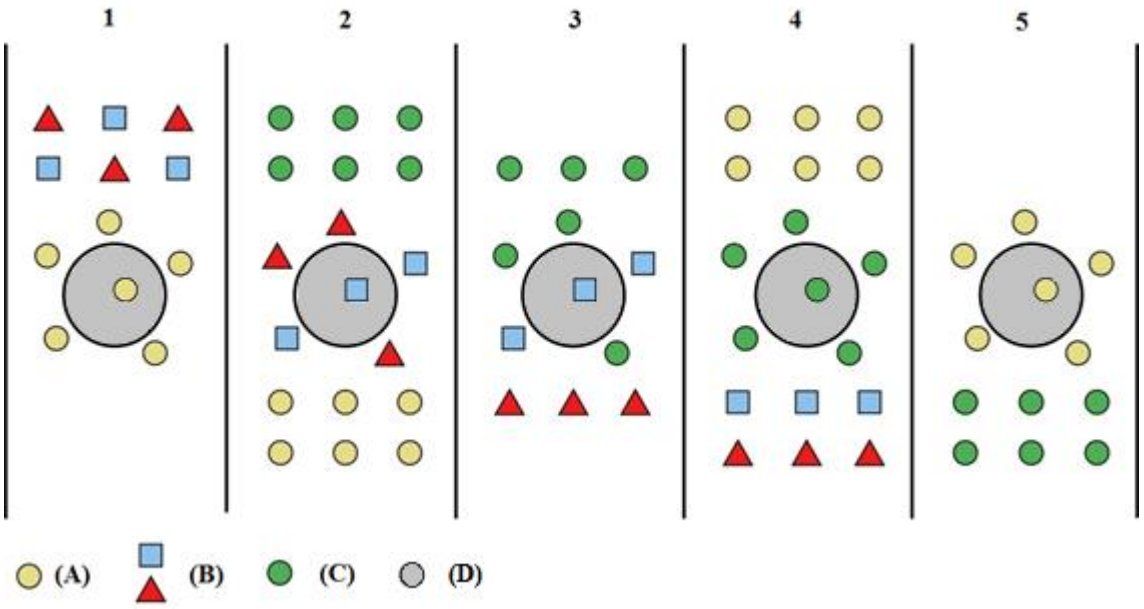


Figura 2.4. Princípios da cromatografia de troca-iônica (eluição com gradiente salino). (A) é referente ao contra-íons presentes na solução tampão; (B) substâncias a serem separadas; (C) íons; (D) Fase estacionária atribuída de cargas positivas (para trocador catiônico) ou negativas (trocador aniônico). Versão adaptada de (AMERSHAM PHARMACIA, 1999).

Modelagem de processos cromatográficos é um assunto de crescente interesse na literatura. Uma busca na plataforma científica *ScienceDirect* (www.sciencedirect.com) das palavras-chave *model* + *protein* + *chromatography* apresenta em torno de 319.000 artigos publicados nos últimos 10 anos sobre esse assunto. Na indústria, a capacidade e a seletividade (razão de constantes de Henry) de adsorção, por exemplo, são parâmetros importantes para a escolha da coluna, pois determina o tamanho e condições de operação (TSUMOTO et al., 2007).

A fundação teórica dos modelos de coluna de troca-iônica para as proteínas tem como base as intensidades de ligação dos bioprodutos com a fase estacionária via interações eletrostática, controladas por condições experimentais, tais como a força iônica e o pH. As diferenças entre as propriedades biológicas de cargas dos coloides são frequentemente consideradas, sendo a cromatografia de troca-iônica capaz de separar espécies com pequenas diferenças entre suas propriedades de carga, tornando-se uma técnica importante para separação e purificação (AMERSHAM PHARMACIA, 1999).

2.6. DUPLA CAMADA ELÉTRICA

A teoria da dupla camada teve origem pela motivação do estudo de agregação de sistemas coloidais. A teoria original considera um sistema aquoso contendo uma dispersão de partículas (na faixa de nm a μm) carregadas e de natureza inorgânica, contendo cargas pontuais presentes na dispersão com equivalente carga de oposto sinal para a eletroneutralidade do sistema. Cada partícula sólida imersa no líquido possui uma camada elétrica homogênea formada pelo excesso de íons em sua superfície. Uma segunda camada é formada pelos contra-íons presentes na solução, sendo que a quantidade de íons presentes nessa camada decresce com o aumento da distância entre os íons e a superfície (camada difusa) (VERWEY, E. J. W., OVERBEEK, 1948).

Os modelos aplicados para a quantificação deste fenômeno surgiram nas décadas de 1900 com o desenvolvimento das teorias de estabilidade das partículas e sua relação com potencial de campo médio (VINCENT, 2012). Derjaguin e Landau (1941) (Rússia) e Verwey e Overbeek (1948) (Holanda) foram os primeiros a desenvolver uma forma de medir essas interações e a contribuição de ambos os trabalhos tornou-se o que sabemos como a teoria DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek).

Detalhes dos modelos e parâmetros utilizados neste trabalho serão apresentados no **Capítulo 5**, considerando que proteínas em solução seguem a definição de dispersão coloidal. Mostra-se a relação da energia livre (potencial de campo médio) entre a proteína e o suporte e o fator de retenção da proteína na coluna.

2.7. ESPECIFICDADE IÔNICA

Antes do surgimento da cromatografia, a purificação de proteínas era realizada por técnicas de cristalização e precipitação, ocasionado pela diminuição da solubilidade da proteína em solução pela adição de sal, i.e. *salting out* (BALDWIN, 1996).

Nos anos de 1880 surgiram os primeiros estudos quantitativos para descrever o fenômeno de agregação de dispersão coloidal para partículas inorgânicas, demonstrando a forte dependência da valência do sal no sistema (VINCENT, 2012). Em 1888, Hofmeister recebeu grande atenção científica por ser o primeiro a descrever detalhadamente este fenômeno para a aplicação em coloides pelo estudo de precipitação da proteína da clara de ovo utilizando diferentes sais. A conhecida série de Hofmeister, a seguir, é formada para sais com o mesmo cátion, diferindo somente nos ânions, sendo organizada pela facilidade de precipitação da proteína (SALIS; NINHAM, 2014):

$$SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > F^- > CH_3COO^- >$$
$$Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^- > ClO_4^- > SCN^-$$

Para a série de cátions:

$$(CH_3)_4N^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ >$$
$$Li^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+}$$

O efeito de Hofmeister mostra que além da valência, a natureza dos íons precisa ser contabilizado no estudo de estabilidade dos coloides. Pela teoria clássica da DLVO, cloreto de sódio e tiocianato de lítio deveriam, a princípio, apresentar o mesmo efeito em solução devido a ambos produzirem em sua dissociação íons monovalentes. Entretanto (NOSTRO, LO; NINHAM, 2012):

(1) A atividade iônica média depende da composição do sal (cátion-ânion) a das suas interações com as moléculas do solvente e do substrato;
(2) Existem interações locais entre o íon e moléculas de águaou com a interface média dos íons com a fase estacionária;
(3) Em decorrência disto, especialmente em sistemas orgânicos, o somatório destes efeitos apresentam uma singularidade para cada caso, podendo ser observado uma reorganização ou uma ordem inversa a série de Hofmeister.

Os modelos que seguem a teoria DLVO negligenciam a natureza dos íons devido à hipótese de cargas pontuais na dispersão e simplificações matemáticas, tornando-se necessária a estimação de parâmetros para o ajuste do modelo com os resultados experimentais (MELANDER et al., 1989; GUÉLAT et al., 2012, 2013).

CAPÍTULO 3. DENSIDADE SUPERFICIAL DE CARGAS

3.1. GRUPOS IÔNICOS DA PROTEÍNA

Os estudos do fenômeno de adsorção de proteínas reportados por Guélat et al. (2010, 2012, 2013) mostram que a aplicação da equação de PB, resolvida após a linearização do modelo e sem o efeito da especificidade dos íons, é adequada para descrever o comportamento da constante de Henry pela estimação dos resíduos de grupamentos de aminoácidos ionizáveis.

Os aminoácidos contabilizados presentes na superfície da proteína podem assumir carga positiva ou negativa. A **Figura 3.1** mostra a estrutura destes aminoácidos (NELSON; COX, 2004).

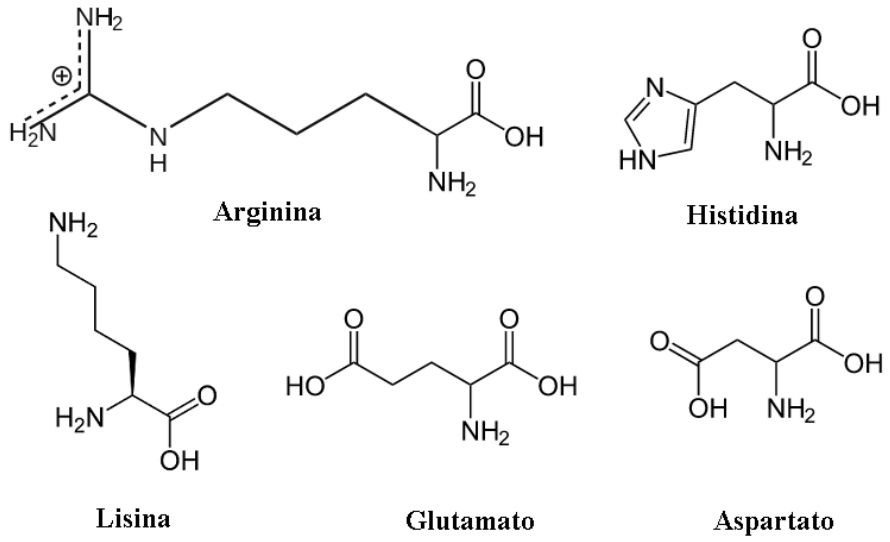


Figura 3.1. Lista dos aminoácidos ionizáveis e que geram cargas na proteína. Grupos com cargas positivas: arginina, histidina e lisina; Grupos com cargas negativas: glutamato e aspartato.

O equacionamento da carga da proteína é simplificada por Guélat et al. (2010) ao contabilizar três tipos de grupamentos iônicos em substituição aos cinco aminoácidos responsáveis pela carga: grupo carboxila (-COOH, correspondendo ao glutamato e aspartato), grupo amina ($-NH_2$, correspondendo a lisina e arginina) e imidazol ($C_3H_4N_2$). Este artifício é essencial na modelagem devido às limitações impostas ao modelo de uma superfície esférica com densidade homogênea de cargas.

Outra aproximação aplicada na literatura (GUÉLAT et al., 2010, 2012, 2013), para melhor representação da densidade de cargas da proteína, consiste na hipótese que a reação de dissociação do H^+ e associação do cátion, ou ânion, para os seguintes grupos são similares: estrutura do grupo carboxílico com o ácido acético; correlação da metilamina com o grupo amina (para o valor do termo da dissociação); e grupos sulfonados com o ácido sulfúrico. Somente para o termo de associação do ânion Cl^- no grupo amina, a respectiva constante foi obtida pelo estudo de agregação de micelas (dodecilamina) utilizando cloreto de potássio como sal precursor (SAROFF; HEALY, 1959). Estas suposições são aplicadas para a obtenção de valores experimentais das constantes de associação e dissociação disponíveis na literatura (MARTELL; SMITH, 1977, 1982; SMITH; MARTELL, 1989).

É crescente a descoberta de novas drogas farmacêuticas, entretanto é inviável a medição da constante de ionização dos milhares de componentes encontrados, tornando-se a predição deste parâmetro indispensável na indústria. Temos, com isso, um significativo número de programas com base em diferentes métodos empíricos ou métodos de química quântica disponíveis para a predição (LIAO; NICKLAUS, 2009).

Dentre os programas e métodos utilizados para o cálculo preditivo, o ACD/I-Lab apresenta-se como um software livre online[1] com vasto banco de dados de espécies químicas, possibilitando o cálculo de suas propriedades com elevado nível de acurácia em comparação com os demais programas livres (LIAO; NICKLAUS, 2009). A comparação dos valores das constantes de associação e dissociação obtidos pela literatura serão posteriormente discutidos com os obtidos pela predição, visando a validação da hipótese de similaridade dos grupos orgânicos.

3.2. DENSIDADE DE CARGAS

Um método simplificado para determinar a densidade de cargas foi apresentado primeiramente por (NINHAM; PARSEGIAN, 1971) no estudo de superfícies carregadas em soluções salinas:

---

[1] Acesso pelo website: www.ilab.acdlabs.com. Informações das propriedades físico-químicas básicas estão disponíveis abertamente para todos os usuários. O registro pode ser realizado de forma gratuita sob limitações na construção da estrutura química e predição de propriedades.

$$\sigma = \pm \frac{e\alpha}{S} \tag{3.1}$$

em que σ é a densidade de cargas, e é a carga elementar do elétron, α representa o grau de dissociação e S é a área superficial.

O parâmetro α provém da constante de dissociação dos grupamentos superficiais:

$$Z = \left[H^{+}\right]_{S} \frac{\alpha}{1-\alpha} \tag{3.2}$$

em que Z representa a constante de dissociação e $\left[H^{+}\right]_{S}$ é a concentração do íonhidrogênio na superfície.

A inclusão de um parâmetro no modelo vinculado com a constante de dissociação mostra a relação das propriedades biológicas com as interações eletrostáticas. Entretanto, α contabiliza a fração total de grupos e negligencia o efeito de associação dos contra-íons nos grupos dissociados.

Em vista de uma melhor predição da interação entre a proteína e o suporte carregado, o modelo de densidade de cargas deve implementar tanto o termo dissociativo do grupo ionizável quanto o termo de associação dos contra-íons no respectivo grupo. A literatura apresenta uma escassez de estudos que consideram a associação do contra-íon na estimação da estabilidade de coloides (EHRL et al., 2009).

CAPÍTULO 4. MODELOS ELETROSTÁTICOS APLICADOS PARA DIFERENTES SISTEMAS

Para descrever o comportamento adsortivo de proteínas em colunas cromatográficas, incluindo as interações eletrostáticas entre superfícies carregadas, é necessário estabelecer um modelo capaz de calcular a constante de Henry. O modelo é desenvolvido pela combinação da equação de Poisson-Boltzmann e com o modelo de adsorção de Langmuir, considerando que as superfícies contêm uma densidade de cargas distribuídas homogênea como função do pH e da força iônica.

A metodologia amplamente utilizada para obtenção da energia livre do sistema eletrostático calculada pela equação de PB linearizada (STÅHLBERG et al., 1991; JÖNSSON; STÅHLBERG, 1999) negligencia a inclusão de efeitos não eletrostáticos (NES). Em contraste, a promissora resolução não linear da equação de PB em coordenadas biesféricas permite a adição destes termos que convém com a relevância do sistema em estudo, conforme será apresentado.

4.1. EQUAÇÃO DE PB LINEARIZADA

A aplicação da equação de PB para resolução de sistemas eletrostáticos é centenária, sendo utilizada para análise do potencial entre placas carregadas imersas em um eletrólito (PARSEGIAN; GINGELL, 1972) a assumindo apenas a presença de forças Coulombianas:

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = -\frac{4\pi e}{\varepsilon_0 \varepsilon_R} \sum n_i^0 z_i \exp\left(-\frac{z_i e \phi}{k_B T}\right) \tag{4.1}$$

em que x representa a região carregada entre as superfícies, ϕ é o potencial eletrostático, e é a carga elementar do elétron, ε_R é a constante dielétrica do meio (78,5 para a água) e ε_0 é a permissividade do vácuo $\left(8{,}542 \cdot 10^{-12} F \cdot m^{-1}\right)$, n_i^0 representa o número de íons i por cm^3 na fase fluida e z_i é a valência destes íons.

É notável o entendimento que a densidade das espécies iônicas foi primeiramente relatada com o potencial eletrostático como o resultado das considerações de força média descritos por (SANDLER, 2010):

$$\nabla^2\phi(\underline{r}) = \frac{\int\ldots\int \nabla^2\phi(\underline{r})\cdot e^{-\frac{u(\underline{r}_1,\underline{r}_2,\ldots,\underline{r}_n,q^*)}{k_BT}} d\underline{r}_2\ldots d\underline{r}_n}{\int\ldots\int e^{-\frac{u(\underline{r}_1,\underline{r}_2,\ldots,\underline{r}_n,q^*)}{k_BT}} d\underline{r}_2\ldots d\underline{r}_n}$$

$$= -\frac{4\pi}{\varepsilon}\frac{\int\ldots\int \rho(\underline{r})\cdot e^{-\frac{u(\underline{r}_1,\underline{r}_2,\ldots,\underline{r}_n,q^*)}{k_BT}} d\underline{r}_2\ldots d\underline{r}_n}{\int\ldots\int e^{-\frac{u(\underline{r}_1,\underline{r}_2,\ldots,\underline{r}_n,q^*)}{k_BT}} d\underline{r}_2\ldots d\underline{r}_n} = -\frac{4\pi}{\varepsilon}\overline{\rho(\underline{r})} \tag{4.2}$$

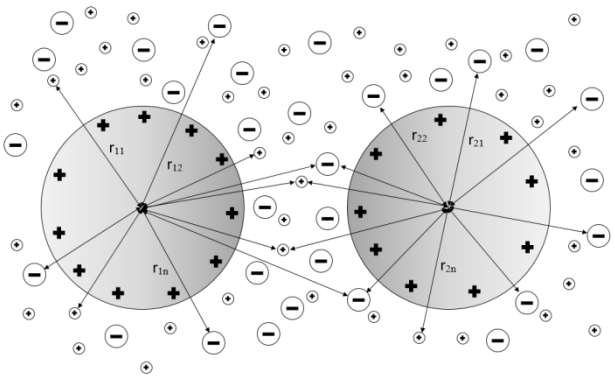
em que $\underline{r}_i$ representa a distância entre o íon e o centro da esfera, q^* é a carga característica do íon, u é a energia livre do sistema e $\overline{\rho}$ representa a densidade média de carga.

A Equação de Poisson ($\nabla^2\phi = f$), **Eq. 4.2**, exibe a chave para relacionar o potencial eletrostático com a distribuição de Boltzmann pelo princípio da superposição. Para $f = 0$ a equação torna-se a equação de Laplace. Para um sistema de dispersão de partículas carregado, os íons possuem um efeito sobre a carga da esfera por forças Coulômbicas e, consequentemente, as magnitudes destas forças são inversamente proporcionais pela distância entre o íon e o coloide. O laplaciano do potencial eletrostático ($\nabla^2\phi(\underline{r})$) é representada pelo somatório da energia local da interação entre cada íon com os íons presentes em solução e com as superfícies das esferas. A energia local pode ser representada como uma densidade local de íons e, por sua vez, pela densidade média de cargas $\overline{\rho}$, escrita pela distribuição de Boltzmann.

A **Figura 4.1** apresenta graficamente a descrição da **Equação 4.2**, em que as contribuições locais são visualizadas no item (A), enquanto que no item (B) vemos uma contribuição média de cada íon e cada interação sendo representada por uma nuvem eletrostática.

O sistema esfera-esfera foi utilizado de forma didática para esclarecimento da equação. Neste trabalho foi aplicada uma geometria do tipo esfera-plano em vista da necessidade de uma configuração realística ao sistema em estudo.

(A)



(B)

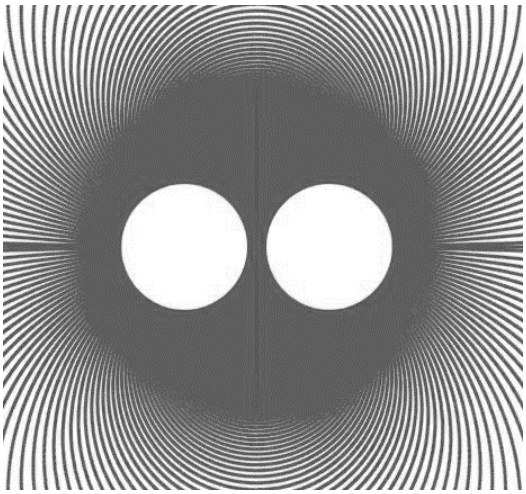


Figura 4.1. (A) Para um determinando íon, é estabelecida uma distancia r_{1j} para a primeiro centro da esfera e r_{2j} para o centro da segunda esfera, sendo $j = 1, 2 \ldots n$ relativo ao numero de íons. (B) A malha representa os pontos discretizados em que o potencial de campo médio é computado.

Na resolução da equação clássica da equação de PB, o potencial de campo médio possui uma dependência somente com os termos eletrostáticos, caso contrário a linearização não seria possível mesmo para baixos valores do potencial eletrostático.

Assumindo baixos valores no potencial eletrostático $(\psi << 1)$, é possível linearizar por série de Taylor a **Equação 4.1** conforme demonstrado a seguir:

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = -\frac{4\pi e}{\varepsilon}\sum n_i^0 z_i\left(-\frac{z_i e\phi}{k_B T}+1\right) \tag{4.3}$$

Rearranjando os termos e assumindo eletroneutralidade $\left(\sum n_i^0 z_i = 0\right)$:

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} = k_D^2\psi \tag{4.4}$$

onde $k_D^2 = \frac{4\pi e^2}{\varepsilon}\sum n_i^0 z_i^2$, sendo k_D o inverso do comprimento de Debye; e ψ o potencial eletrostático em sua forma adimensional $\left(e\phi/k_B T\right)$.

A energia eletrostática livre, por área de contato, entre as duas superfícies com diferentes cargas foi apresentada por (PARSEGIAN; GINGELL, 1972):

$$W_{plane-plane}\left(x, pH, I\right) = \frac{1}{k_D \varepsilon_0 \varepsilon_R}\frac{\left(\sigma_1^2 + \sigma_2^2\right)\cdot e^{-k_D\cdot x} + 2\sigma_1\sigma_2}{e^{k_D\cdot x} - e^{-k_D\cdot x}} \tag{4.5}$$

para σ_1 representando a densidade de carga do coloide e σ_2 a densidade de cargas da fase estacionária.

A **Eq. 4.5** é válida para um sistema que envolve duas superfícies planares e baixos potenciais. Para um estudo realístico da adsorção de proteínas, uma condição geométrica apropriada pode ser obtida utilizando a aproximação de Derjaguin pelo ajuste das superfícies planas para uma geometria esférica (CARNIE et al., 1994; GUÉLAT et al., 2010). Em contraste, uma das vantagens de utilizar coordenadas biesféricas provem da aplicação direta de uma geometria realística do processo, fazendo com que nenhuma informação do modelo seja perdida durante a transição de aproximações.

4.2 EQUAÇÃO DE PB MODIFICADA EM COORDENADAS BIESFÉRICAS

Uma proposta similar feita em relação à geometria do sistema foi descrita por Roth e Lenhoff (1993), em que são estudados os fenômenos de adsorção usando uma estrutura tridimensional da proteína, entretanto a aproximação linear na resolução da equação de PB é aplicada para a resolução do sistema. O resultado mostrado por este estudo apresentou uma boa concordância para a lisozima para pequenos valores da concentração salina, conforme esperado, com um extensivo consumo de tempo de estimação. A falha na concordância do modelo ocorreu para uma faixa maior da força iônica, mesmo considerando o termo de Hamaker.

Lima et al. (2007a) foi capaz de predizer o comportamento do segundo coeficiente de virial como uma função do pH e força iônica considerando a interação entre dois coloides carregados (tratados como duas esferas) sem a necessidade de

estimação de parâmetros. O trabalho também reporta a aplicação de um modelo não linear que inclui as forças de Hamaker e a dependência do tipo de sal decorrente dos termos NES.

Diante do exposto, foi presumido que um modelo não linear que acopla coordenadas biesféricas (**Fig. 4.2**), ou forma similar para descrever as interações entre plano-esfera e as contribuições eletrostáticas, providencia uma predição aceitável do comportamento adsortivo incluindo os termos de especificidade iônica e forças de van der Waals para um sistema diluído.

Uma outra vantagem do sistema de coordenadas biesféricas provém de uma melhor discretização dos elementos estruturais para resolução do modelo.

CAPÍTULO 5. METODOLOGIA

Utilizando as condições de equilíbrio para o potencial químico da proteína, temos que (MOREIRA et al., 2006):

$$c = c_0 \exp\left[-\frac{W(I, pH, h)}{k_B T}\right] \tag{5.1}$$

em que c é a concentração do coloide (ou proteína), c_0 é a concentração do coloide no seio da fase fluida, h representa a distância entre a superfície da proteína e a superfície da fase estacionária, I é a força iônica, W é a energia livre de interação entre o coloide e o adsorbato, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura do sistema (298.15 K).

Conhecendo que a concentração em excesso na superfície pode ser obtida por:

$$q(pH, I) = \int_0^\infty (c - c_0) dh \tag{5.2}$$

em que q é a concentração em excesso na superfície para um dado pH e força iônica do meio.

A constante de Henry é calculada como função do potencial de força média (W), combinando as **Equações 5.1** e **5.2**, conforme sugerido por (GUÉLAT et al., 2010):

$$K = \frac{q(pH, I)}{c_0} = \int_0^\infty \left[\exp\left(-\frac{W(I, pH, h)}{k_B T}\right) - 1\right] dh \tag{5.3}$$

em que K é a constante de Henry dimensional (m) para um sistema similar ao apresentado na **Figura 5.1**.

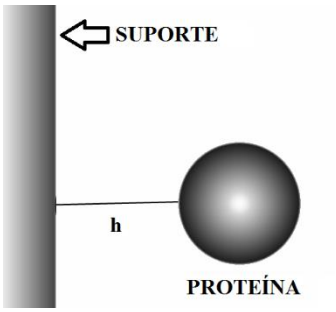


Figura 5.1. Sistema de interação da proteína (esfera) com o suporte carregado (plano) para uma distância *h*.

5.1 METODOLOGIA DE CÁLCULO PARA AS PROTEÍNAS EM COORDENADAS BIESFÉRICAS

Para os mAbs, a predição do comportamento da constante de equilíbrio foi possível pela resolução da equação de Poisson-Boltzmann incluindo a dispersão entre íon-proteína e íon-plano, dada pela seguinte equação (LIMA, E R A; TAVARES; et al., 2007b):

$$\nabla^2\psi = \frac{1}{2}\left[\exp\left(\psi - U_-\right) - \exp\left(-\psi - U_+\right)\right] \tag{5.4}$$

em que ∇^2 é o operador de Laplace em coordenadas biesféricas (MOON; SPENCER, 1961), conforme descrito por:

$$\nabla^2\psi = \frac{\left(\cosh\eta - \cos\theta\right)^3}{\left[k_D h \sinh\left(\eta_0\right)\right]^2 \sin\theta}\left[\frac{\partial}{\partial\theta}\left(\frac{\sin\theta}{\cosh\eta - \cos\theta}\frac{\partial\psi}{\partial\theta}\right) + \sin\theta\frac{\partial}{\partial\eta}\left(\frac{1}{\cosh\eta - \cos\theta}\frac{\partial\psi}{\partial\eta}\right)\right] \tag{5.5}$$

Para a avaliação da força entre plano-esfera, foi efetuada a integração sobre a superfície para $\eta = \eta_0/2$ em consideração de uma realística aproximação.

Informações do potencial na superfície podem ser utilizados diretamente na modelagem do sistema para o cálculo da energia livre. Entretanto, para proteínas é bem mais efetivo representar o modelo como uma função entre as densidades de cargas (ASENJO; ANDREWS, 2009), uma vez que informações dos aminoácidos presentes

em sua superfície podem ser determinados por simples ensaios titulométricos. Como resultado, as condições de contorne em η são escritas como:

$$\left(\frac{\partial\psi}{\partial\eta}\right)_{\eta=0} = -\frac{\sigma_2}{\varepsilon\varepsilon_0}\frac{k_D h\sinh(\eta_0)}{\cosh(\eta_0)-\cos(\theta)}$$
$$\left(\frac{\partial\psi}{\partial\eta}\right)_{\eta=\eta_0} = -\frac{\sigma_1}{\varepsilon\varepsilon_0}\frac{k_D h\sinh(\eta_0)}{\cosh(\eta_0)-\cos(\theta)} \tag{5.6}$$

Sendo σ_1 e σ_2 calculados conforme descrito na **Seção 5.4**. Por sua vez, as condições de contorno em θ:

$$\left(\frac{\partial\psi}{\partial\theta}\right)_{\theta=0} = \left(\frac{\partial\psi}{\partial\theta}\right)_{\theta=\pi} = 0 \tag{5.7}$$

A equação para o termo NES, relativo à especificidade iônica é dado por (LIMA, E. R. A. et al., 2007b):

$$U_{\pm} = \frac{-B_S\cdot r_{ion}^3}{(r_1-R_{sphere})^3\left[1+\frac{(r_1-R_{sphere})^3}{2R_{sphere}^3}\right]} + \frac{-B_P\cdot r_{ion}^3}{r_2^{\,3}} \tag{5.8}$$

temos que R_{sphere} é o raio hidráulico da proteína, r_{ion} é o raio do íon; B_S é a constante de dispersão para a interação íon-esfera, enquanto B_P é o termo para íon-plano. Foi assumido que as propriedades dielétricas na superfície de ambas as geometrias são idênticas, logo, $B_S = B_P$; r_1 é a distância entre o centro do íon e a superfície da esfera e r_2 é a distância entre o centro do íon e a superfície do plano.

É importante destacar que a integração dos pontos foi calculada pela regra de Simpson Composta e as equações diferenciais foram resolvidas utilizando o Método de Volumes Finitos, acoplados com o algoritmo de Thomas (LIMA, E R A; TAVARES; et al., 2007b).

Neste trabalho, temos que o cloreto de sódio é tratado como o principal sal na solução para a contabilização da força iônica, portanto, os valores a seguir são levados em consideração para a constante de dispersão (TAVARES et al., 2004): $0.138\,k_B T$ para o íon sódio e $1.086\,k_B T$ o íon cloreto. Para a análise de sensibilidade, diferentes

tipos de íons foram estudados, brometo (1.348 $k_B T$), iodeto (1.735 $k_B T$), potássio (0.574 $k_B T$) e estrôncio (0.575 $k_B T$) (de acordo com a mesma referência acima). O raio de corte de 2 Å foi estabelecido como o limite em que a proteína pode alcançar a superfície do plano, sendo refletido como o valor médio do raio dos íons em solução.

A expressão para a força adimensional em coordenadas biesféricas é reportado por (STANKOVICH; CARNIE, 1996), obtida pela integração do tensor sobre a superfície, como uma função do campo elétrico e a diferença entre a pressão osmótica (CARNIE et al., 1994):

$$f(\eta) = 2\pi \int_0^{\pi} \left\{ \left[\frac{[k_D h \sinh(\eta_0)]^2 (\cosh\psi - 1)}{(\cosh\eta - \cos\theta)^2} + \frac{1}{2}\left(\left(\frac{\partial\psi}{\partial\theta}\right)^2 - \left(\frac{\partial\psi}{\partial\eta}\right)^2 \right) \times (1 - \cosh\eta \cdot \cos\theta) \right] + \frac{\partial\psi}{\partial\theta}\frac{\partial\psi}{\partial\eta} \sinh\eta \cdot \sin\theta \right\} \frac{\sin\theta}{\cosh\eta - \cos\theta} \cdot d\theta \tag{5.9}$$

A expressão da força foi deduzida para a equação de PB clássica, isto é, considerando baixos potenciais e simetria na dissociação dos íons em solução. A determinação da força utilizando esta abordagem é inconsistente, que pode levar a erros na determinação do potencial de campo médio do sistema proteína-plano. Apesar da problemática, a **Equação 5.9** foi aplicada neste estudo para avalição do sistema proposto.

Uma vez determinada a força entre a proteína e o plano, o potencial de campo médio e calculado como o somatório da contribuição da força em função da distância entre a superfície da proteína e a superfície da fase estacionária:

$$\frac{W^{PB}(k_D h)}{\kappa_B T} = -\varepsilon_R \varepsilon_0 \left(\frac{\kappa_B T}{e^2} \right) \int_{\infty}^{k_D h} f(h) d(h) \tag{5.10}$$

em que W^{PB} é a contribuição eletrostática para o potencial de campo médio, obtido via uma equação de PB, dada uma separação entre a proteína e a fase estacionária $(k_D h)$.

A contabilização do potencial total da força média é dado por:

$$W = W^{PB} + W^{Ham} + W^{hs} \tag{5.11}$$

em que W^{hs} é a contribuição de esferas duras: (1) $W^{hs} = \infty$ para uma distância $h < 0$ e (2) $W^{hs} = 0$ para $h \geq 0$.

A terceira contribuição diz que as superfícies das geometrias são tratadas como superfícies rígidas, sendo necessária uma energia infinita para penetrá-las. W^{Ham} é relatado como o potencial não-Coulômbico entre as proteínas e o adsorvente, conhecido como dispersão de Hamaker. O método para o cálculo de W^{Ham} é resumido como (PARSEGIAN, 2005; LIMA, E R A; BISCAIA; et al., 2007a):

$$W^{Ham} = \begin{cases} -\dfrac{H}{6}\left(\dfrac{r_p}{r_p + r_H}\right) & \text{for } h \le r_p + r_H \\ -\dfrac{2H}{9}\left(\dfrac{r_p}{h}\right)^3 & \text{for } h > r_p + r_H \end{cases} \tag{5.12}$$

em que r_H corresponde à espessura da camada de hidratação da proteína, 1.5 Å (LIMA, E R A; BISCAIA; et al., 2007a). O parâmetro *H* representa a constante de Hamaker, sendo este parâmetro diferente para interação entre proteína e adsorvente. Para o estudo de mAbs em YMC BioPro SP, o valor da constante de Hamaker foi estabelecido como $2k_BT$ (GUÉLAT et al., 2012). Foi assumido um valor de $H = 5k_BT$ para a interação entre a Fractogel EMD SE HiCap com a proteína no sistema aquoso (TAVARES et al., 2004).

5.2. GRUPOS IÔNICOS DA PROTEÍNA

Os dados analisados neste trabalho foram obtidos na literatura, realizados em coluna de troca-iônica para as seguintes fases estacionárias: Fractogel EMD SE HiCap (grupo ligante $-(CH_2)_2SO_3^-$) e YMC BioPro SP (10 μm) (grupo ligante $-(CH_2)_3SO_3^-$) para as interações com mAb1, anticorpo monoclonal obtido pela Merck Serono S.A. (GUÉLAT et al., 2010); e YMC BioPro SP (5 μm) para a adsorção da Bevacizumab e Trastuzumab (GUÉLAT et al., 2013). A densidade dos componentes dos grupos amino, histidina e carboxílico foram recalculados para as proteínas com base na sequência de aminoácidos disponíveis nos bancos de dados online: *Protein Data Bank* e *DrugBank*, sendo este parâmetro definido como a razão entre o número de grupos iônicos e a área superficial da proteína.

Utilizando as informações da quantidade de grupos arginina, histidina, lisina, glutamato e aspartato presentes na superfície da mAb1, bevacizumab e trastuzumab,

temos respectivamente a contabilização de um total 274, 322 e 301, números de grupos ionizáveis em suas superfícies.

5.3. CONTABILIZAÇÃO DAS DENSIDADE DE GRUPAMENTOS IÔNICOS

A partir destas informações, a **Tabela 5.1** foi construída com os dados de razão entre a quantidade de grupamentos amina, histidina e grupos carboxílicos na superfície da proteína. O raio hidrodinâmico da mAb1 é definido como 5 nm (GUÉLAT et al., 2010), e o mesmo valor é especificado para a Trastuzumab (SCHEER et al., 2012; SALVALAGLIO et al., 2015). Para Bevacizumab, o raio de 6.3 nm foi utilizado conforme medido por Wen et al. (2013).

A arginina apresenta duas aminas em sua cadeia (ver **Fig. 3.1**). Por esta razão, para cada arginina presente na superfície do coloide foram contabilizadas 2 aminas (1:2); a lisina possui uma amina em sua cadeia principal (1:1) e a cadeia do glutamato e aspartato são consideradas idênticas, possuem um grupo carboxílico (1:1).

Tabela 5.1. Valores das densidades dos grupos amina, histidina e carboxílicos calculados para a proteína e para as fases estacionárias.

	Valores das densidades dos grupos (mol m^{-2})		
Proteína	Amina	Histidina	Carboxílico
mAb1	$6.872 \cdot 10^{-7}$	$1.374 \cdot 10^{-7}$	$6.237 \cdot 10^{-7}$
Bevacizumab	$5.363 \cdot 10^{-7}$	$9.626\ 10^{-8}$	$4.125 \cdot 10^{-7}$
Trastuzumab	$8.034 \cdot 10^{-7}$	$1.480 \cdot 10^{-7}$	$6.343 \cdot 10^{-7}$
Fase estacionária	Grupo sulfonato*		
Fractogel EMD SE HiCap	$5.64 \cdot 10^{-6}$		
YMC BioPro SP (10 µm)	$1.90 \cdot 10^{-6}$		
YMC BioPro SP (5 µm)	$1.22 \cdot 10^{-6}$		

*Valor informado pelos fabricantes (GUÉLAT et al., 2010, 2013).

Os valores reportados na segunda coluna da **Tabela 5.2** provêm das considerações impostas por Guélat et al. (2010) de que a reação de dissociação do H^+ e

associação do cátion, ou ânion, para os seguintes grupos são similares: estrutura do grupo carboxílico com o ácido acético; correlação da metilamina com o grupo amina; e grupos sulfonados com o ácido sulfúrico. Somente para o termo de associação do ânion Cl^- no grupo amina, a respectiva constante foi obtida pelo estudo de agregação de micelas (dodecilamina) utilizando cloreto de potássio como sal precursor (SAROFF; HEALY, 1959).

Tabela 5.2. Comparação dos valores adotados para as constantes de dissociação dos grupos iônicos e associação dos sais de acordo com a literatura e com a predição feita pelo software online ACD/I-Lab.

	Reportado por (MARTELL; SMITH, 1977, 1982; SMITH; MARTELL, 1989)	Predição (ACD/I-Lab)
Constante de Dissociação		
Carboxílico	4,45	4,3 (± 0,4)
Grupo imidazol (histidina)	6,02	6,20 (± 0,5)
Amina	10,69	10,60 (± 0,4)
Sulfonatos	1,68	1,70 (± 0,4)
Constante de associação		
Na^+ nos grupos carboxílicos	-0,26	-
Na^+ nos grupos sulfonato	0,64	-
K^+ nos grupos carboxílicos	-0,41	-
K^+ nos grupos sulfonato	0,85	-
Sr^{2+} nos grupos carboxílicos	0.49	-
Sr^{2+} nos grupos sulfonato	2.20	-
Cl^- na histidina	0,20	-0.4 (± 0,5)
Cl^- nos grupos amina	0,20	0,1 (± 0,4)

Na **Tabela 5.2**, a terceira coluna apresenta os valores obtidos da predição da constante de dissociação/associação pelo ACD/I-Lab. Para o grupo amina, foi utilizada a estrutura completa da lisina para predição do Ka. A estrutura original do ligante

presente na fase estacionária (ácido etilsufônico: $CH_3CH_2SO_2OH$) foi aplicada para a predição do grupo sulfonato, mostrando que as hipóteses de correlação das estruturas químicas aplicadas por Guélat et al. (2010) podem ser utilizadas para todos os casos.

Para as constantes de associação, a versão livre do ACD/I-Lab não engloba a inclusão de metais nos cálculos das propriedades das estruturas químicas, impossibilitando a análise preditiva neste caso. Este problema não interferiu na modelagem dos cátions, já que estes valores são reportados na literatura (MARTELL; SMITH, 1977, 1982; SMITH; MARTELL, 1989). Para a constante de associação dos ânions, a predição para o Cl^- no grupo histidina e amina apresentam um grande desvio (**Tab. 5.2**) e os outros demais valores não são reportados na literatura base para os íons Br^- e I^-. Para os ensaios de sensibilidade utilizando os sais NaBr e NaI, o valor da constante de associação do ânion Cl^- foi aplicada em substituição os íons Br^- e I^- para a possível análise do efeito da dispersão iônica.

5.4. CONTABILIZAÇÃO DA DENSIDADE DE CARGAS

Para a completa formulação do problema, duas condições de contorno são necessárias para a resolução do modelo, conforme apresentado pela **Equação 5.6**, exigindo informações sobre a densidade de carga na superfície da fase estacionária e da proteína.

A carga total da proteína é quantificada pelo somatório das contribuições individuais dos grupos e a contribuição do grupo sulfonado determina a densidade total de cargas para todas as fases estacionárias:

$$\sigma_1(pH, I) = \sigma_{NH_3^+} + \sigma_{His^+} + \sigma_{COO^-} \tag{5.13}$$

$$\sigma_2(pH, I) = \sigma_{SO_3^-} \tag{5.14}$$

em que σ_1 representa a densidade de carga total do coloide e σ_2 é a densidade de carga para a fase estacionária.

A densidade de cargas superficiais é escrita conforme reportada por Ehrl et. al (2009) a partir das informações de equilíbrio de dissociação dos grupos orgânicos e associação dos íon. Para o cálculo da densidade superficial dos grupos amina e histidina, temos que:

$$\sigma_{+} = \frac{+F\rho_i}{1+\left(Ka_{i+}/c_{H^+}\right)+c_{anion}\gamma \cdot Ks_{iCl}} \tag{5.15}$$

em que F é a constante de Faraday (96,485 C mol^{-1}), i representa os grupos amino ou os grupos histidina, ρ_i representa a densidade dos grupamento i na superfície (mol m^{-2}), Ka_{i+} é a constante efetiva de dissociação dos grupos ácidos i da proteína (mol L^{-1}), γ é o coeficiente médio de atividade, Ks_{iCl} é o coeficiente de associação dos grupos i do meio (L mol^{-1}) e c_{anion} é a concentração dos ânions (mol L^{-1}).

Para a representação da densidade de carga dos grupos carboxílicos e sulfonados, temos que:

$$\sigma_{-} = \frac{-F\rho_j}{1+\left(c_{H^+}/Ka_{j^-}\right)+c_{cation}\gamma \cdot Ks_{jNa}} \tag{5.16}$$

em que j representa os grupos carboxílicos e sulfônicos, ρ_j representa a densidade dos grupos iônicos j (mol m^{-2}), Ka_{j^-} é a constante efetiva de dissociação dos grupos básicos j (mol L^{-1}), Ks_{jNa} é a constante de associação dos grupos j (L mol^{-1}) e c_{anion} é a concentração dos cátions (mol L^{-1}). Os valores das constantes de associação e dissociação utilizados neste trabalho são encontrados na segunda coluna da **Tabela 5.2**.

A constante efetiva de dissociação é um valor constante para os grupos amina e carboxílicos, enquanto que para histidina o seu valor muda conforme o pH e força iônica do meio. Sua relação é dada por:

$$pKa_{His^+} = pKa^0_{His^+} + 2\left(z_{His}-1\right)\left[\frac{A_{Debye}\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - BI\right] \tag{5.17}$$

onde $Ka^0_{His^+}$ representa a constante de dissociação da histidina na ausência de sal, A_{Debye} é um parâmetro dependente da temperatura (igual a 0,5114 a 298 K), B é um parâmetro dependente da espécie química (aproximado para 0,1) e z_{His} é o número de cargas da histidina.

A influência do pH ocorre de forma indireta na **Equação 5.17** pela contagem do número de cargas da histidina:

$$z_{His} = \frac{-1}{1+10^{1,77-pH}} + \frac{+1}{1+10^{pH-9,18}} + \frac{+1}{1+10^{pH-6,10}} \tag{5.18}$$

sendo o primeiro termo referente à contabilização da carga do grupos α-carboxílico; o termo intermediário refere-se ao grupo α-amino e o último termo é associado com a carga da cadeia da histidina.

5.5. METODOLOGIA DE CÁLCULO PARA A LISOZIMA

As curvas da constante de Henry para a lisozima em função do pH e da força iônica, foram determinadas por duas metodologias distintas: pela equação de PB em coordenadas biesféricas e pela equação de PB em sua forma linear, para efeito de comparação com a literatura (GUÉLAT et al., 2010).

Sabe-se que a lisozima possui uma estrutura fixa na faixa de pH em estudo (4,4 até 6,8), validando a hipótese de um sistema geométrico plano-coloide, sendo a fase estacionária aproximadamente 4200 vezes maior que a proteína. Em relação aos grupamentos encontrados em sua superfície, tem: 1 grupo α-$NH3^+$, 6 lisinas e 11 argininas, totalizando 29 aminas; 1 histidina; e 1 α-COO^-, 2 glutamatos e 7 aspartato, contabilizando 10 grupos carboxílicos (BOSTRÖM et al., 2003). Será utilizado para a proteína o raio hidrodinâmico de 24 Å e Fractogel EMD SE HiCap como a fase estacionária (GUÉLAT et al., 2010).

No **Apêndice A** são encontradas as etapas matemáticas aplicadas para o cálculo da constante de Henry pela inclusão da resolução analítica da energia livre (**Eq. A.15**) via equação de PB linearizada. A constante de equilíbrio é representada por:

$$K = \int_0^{-1} \left[\left| (X+1)^2 - 1 \right|^a \left| \frac{X}{X+2} \right|^b \left(-\frac{1}{k_D (X+1)} \right) \right] dX \tag{A.23}$$

sendo $a = \frac{AB}{2k_B T}$ e $b = \frac{AZ}{2k_B T}$; onde $A = 2\pi R_{sphere} / k_D \varepsilon_0 \varepsilon_R$, $B = \left(\sigma_1^2 + \sigma_2^2\right)$ e $Z = 2\sigma_1\sigma_2$.

X representa a distância entre a superfície da esfera e o plano.

Para evitar o grande esforço matemático em resolver a **Equação A.23** no intervalo apresentado, sendo o limite inferior descrito como a superfície da fase estacionária e o limite superior descrito como o seio da fase fluida alcançado em uma

distância infinita, duas hipóteses foram consideradas: (1) raio de corte de 2 Å como a menor distância que a esfera pode alcançar da superfície, sendo este valor aproximado como um raio médio dos íons em solução; (2) $10\,k_D h$ como a distância adimensional em que definitivamente não tenhamos a interação entre o plano e a esfera.

RESULTADOS

CAPÍTULO 6. ADSORÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

As **Figuras 6.1, 6.2 e 6.3** foram obtidas utilizando a metodologia descrita no capítulo anterior para computar as densidades de cargas das proteínas com dependência da atividade do sal (LEE; HAN, 2013), pH do meio e informações sobre as constantes de associação e dissociação ácido-base (segunda coluna da **Tabela 5.2**):

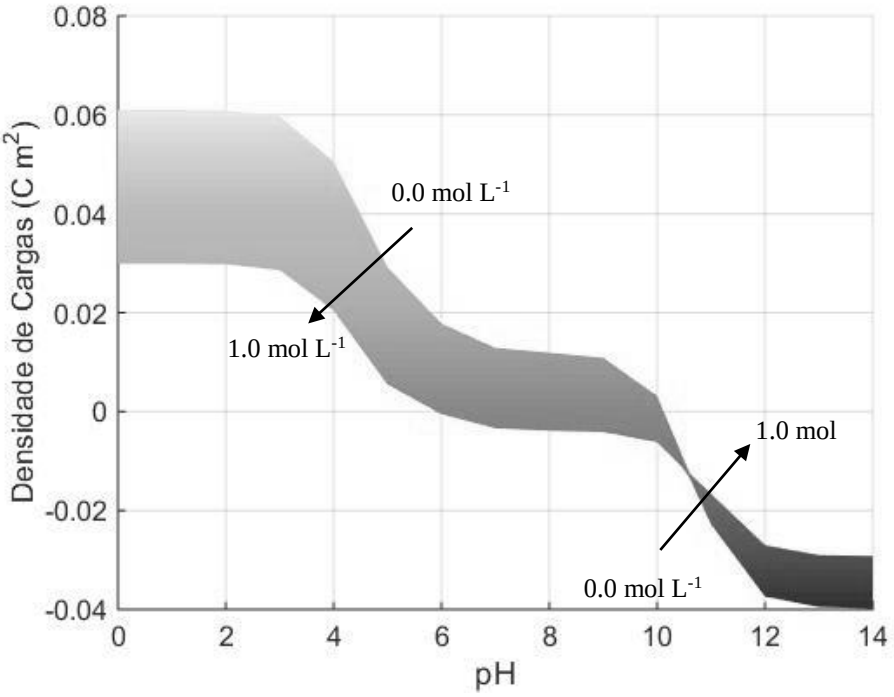


Figura 6.1. Densidade de cargas da bevacizumab em função do pH para uma faixa de concentração de NaCl entre 0.0 a 1.0 mol L^{-1}.

Como é observado na figura, a adição de sal no meio é diretamente proporcional ao aumento da densidade de cargas até o pH 10.57. Após este valor, a influência do sal ocasiona um efeito negativo na densidade de cargas. A inversão é decorrente do pKa de dissociação dos grupos amina (10.69) que são majoritários na proteína. Um fato interessante a ser notado é que a bevacizumab apresenta uma carga neutra em pH 10.09 na ausência de sal. Com a adição de sal, o ponto de carga neutra é deslocado, podendo chegar a pH 5.89 para a concentração de NaCl de 1.0 mol L^{-1}.

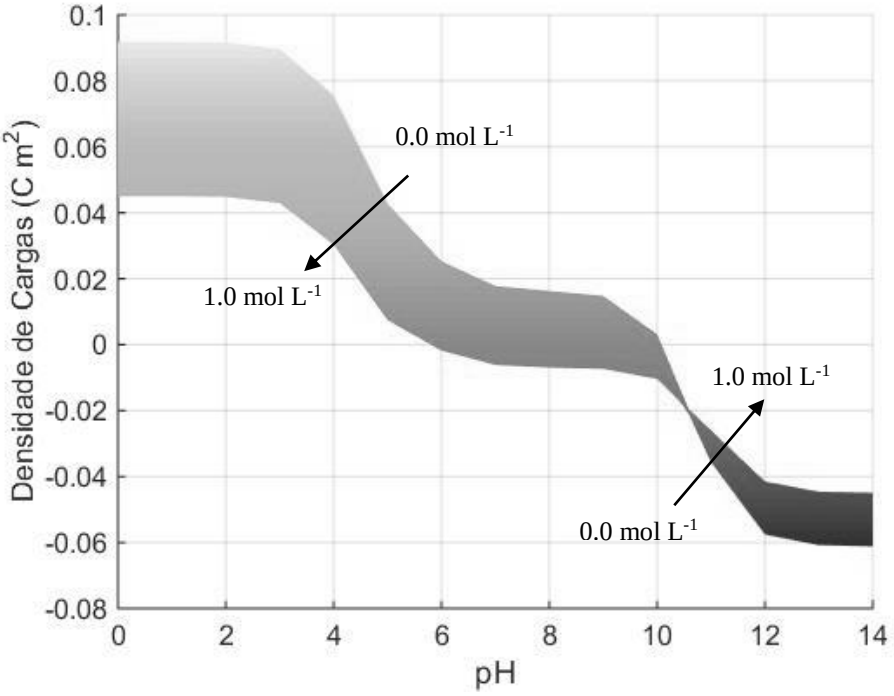


Figura 6.2. Densidade de cargas da trastuzumab em função do pH para uma faixa de concentração de NaCl entre 0.0 a 1.0 mol L^{-1}.

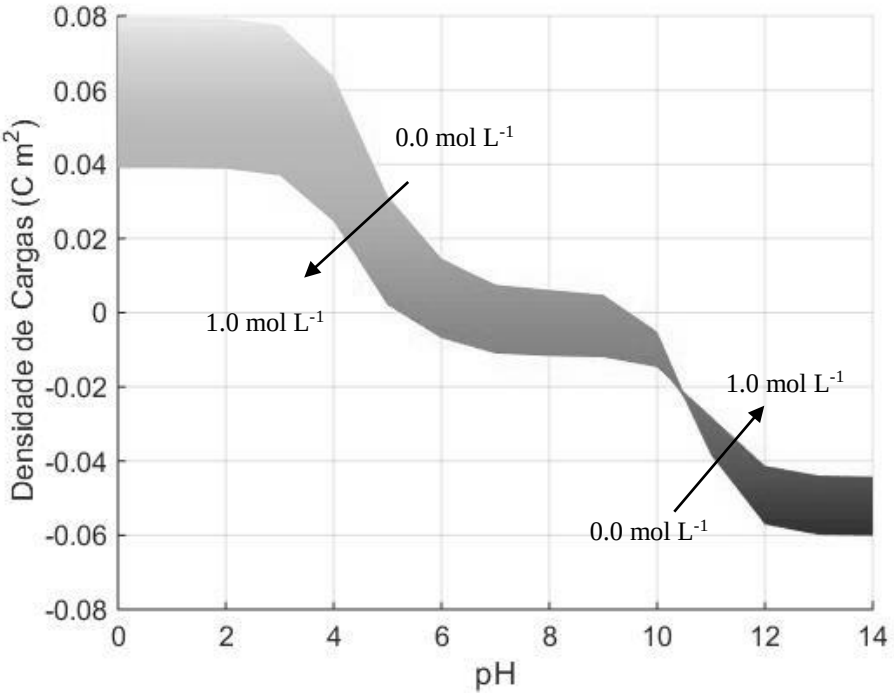


Figura 6.3. Densidade de cargas da mAb1 em função do pH para uma faixa de concentração de NaCl entre 0.0 a 1.0 mol L^{-1}.

As Figuras 6.2 e 6.3 descrevem a densidade de cargas para a trastuzumab e mAb1, respectivamente, e apresentam um comportamento semelhante ao descrito para a bevacizumab em função do pH e da concentração de sal. Na ausência de sal, mAb1 apresenta uma carga neutra no pH 9.44, enquanto que o valor determinado para a trastuzumab é de pH 10.14.

Os resultados presentes na **Figura 6.4** foram calculados utilizando a equação de PB em coordenadas biesféricas conforme metodologia descrita no capítulo anterior, para diferentes posições fixas entre a mAb1 e a fase estacionária. Para uma distância adimensional de 1 $k_D h$, uma forte atração (contribuição eletrostática) entre a proteína e o adsorvente é observada entre o intervalo de pH de 1,68 até 4,0, aproximadamente.

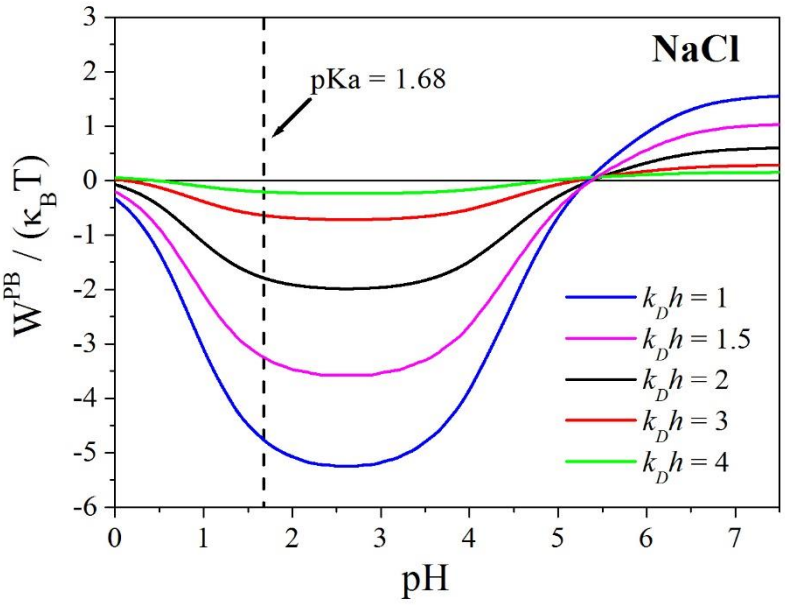


Figura 6.4. Efeito do pH no potencial de força média, obtida pela equação de PB, para diferentes distâncias entre a superfície do sistema plano-esfera utilizando a proteína mAb1. Concentração de NaCl de 0,3 mol L^{-1} (Fractogel EMD SE HiCap).

Para pH do meio menor do que *pKa* do adsorvente (1,68), a carga negativa da fase estacionária torna-se menor, contribuindo para diminuir a atração entre a proteína e adsorvente. Para pH maior que 4,0 tem-se um decréscimo da energia atrativa, proveniente da neutralização das cargas superficiais da proteína, chegando a um ponto de inflexão com valor de pH aproximadamente 5,3. Para pH maiores, é observado uma contribuição eletrostática repulsiva entre as superfícies devido à neutralidade da carga líquida da proteína e da adsorção de íons em sua superfície.

Para a proteína mAb1, o ponto de carga neutra é calculado em aproximadamente pH 6,3 para uma concentração de sal de 0,3 mol L^{-1}. Entretanto, esse não é o ponto observado na **Figura 6.4**. Tal efeito pode ser descrito como uma blindagem eletrostática da proteína ocasionada pela concentração de sal presente. No ponto isoelétrico, temos um somatório líquido de cargas igual a zero. Com a adição de sal no sistema, os íons cloreto irão preferencialmente se aderir a superfície da proteína, uma vez que sua constante de Hamaker (1.086 $k_B T$) possui um valor bem maior que a do cátion (0.138 $k_B T$), tornando a proteína negativa pelos íons presentes em solução, e não pelos grupos iônicos em sua superfície, conforme visualizado na **Fig. 6.5**.

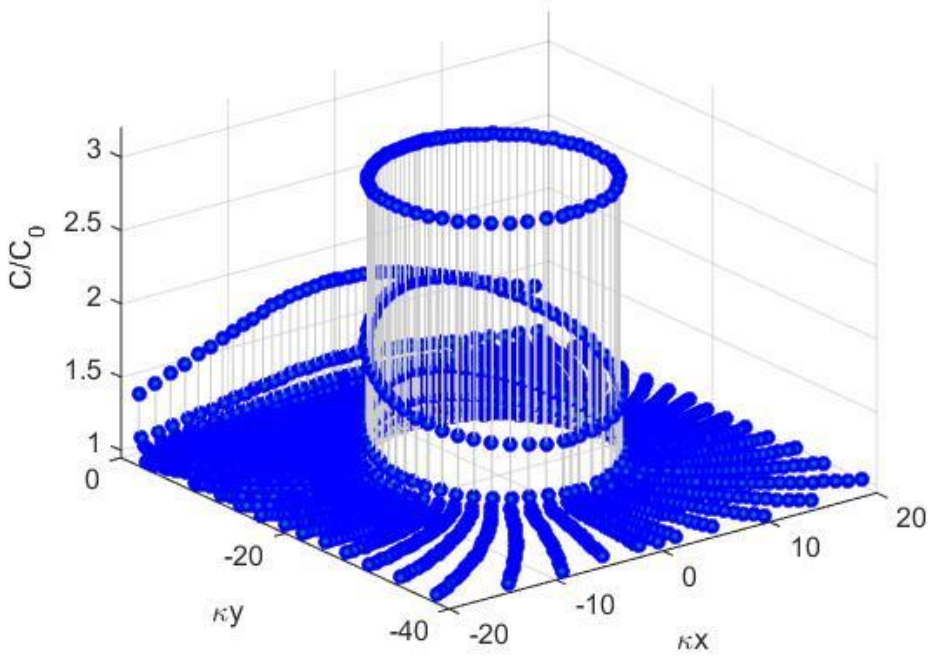


Figura 6.5. Perfil de concentração de íon cloreto em torno da mAb1 e da fase estacionária para pH de 6.3 interagindo em solução de NaCl 0.3 mol L^{-1}.

No resultado obtido, a concentração de 0,3 mol L^{-1} de NaCl foi suficiente para deslocar o valor do ponto isoelétrico da proteína para 5,3, aumentando a faixa de pH em que a força média é repulsiva entre a proteína e o adsorvente.

Para diferentes distâncias, o modelo comporta-se conforme o esperado. Para curtas distâncias, têm-se maiores forças atrativas e repulsivas devido à proximidade das superfícies. À medida que a proteína é afastada da fase estacionária, tem-se diminuição das forças atrativas e repulsivas. Como é observado na **Figura 6.4**, para distâncias maiores que 4 $k_D h$ a interação entre proteína-plano é praticamente nula.

Com a finalidade de identificar em que ponto tem-se interação nula entre a proteína e a fase estacionária, o potencial eletrostático foi calculado em função da distância de separação entre as superfícies para diferentes valores de pH, utilizando as mesmas condições experimentais descritas na **Figura 6.4**.

Os resultados deste estudos são presentes na **Figura 6.6**. Para pH de 7,0 e 6,0, tem-se repulsão em todas as distâncias entre as superfícies, não havendo contribuição eletrostática para adsorção na coluna. Em pH de 5,0, próximo ao ponto de carga neutra da proteína para esta concentração de sal, atração é observada, mas não intensa como apresentado no pH 4,0. Conforme é observado, a partir da distância de 6 $k_D h$ a proteína não interage eletrostaticamente com o adsorvente em nenhum dos valores pH testados.

Como esta análise foi realizada para uma proteína em uma única concentração salina, o valor de 10 $k_D h$ foi utilizado nas integrações, consideração da distância em que a proteína não interage eletrostaticamente com a superfície, independente da concentração salina considerada.

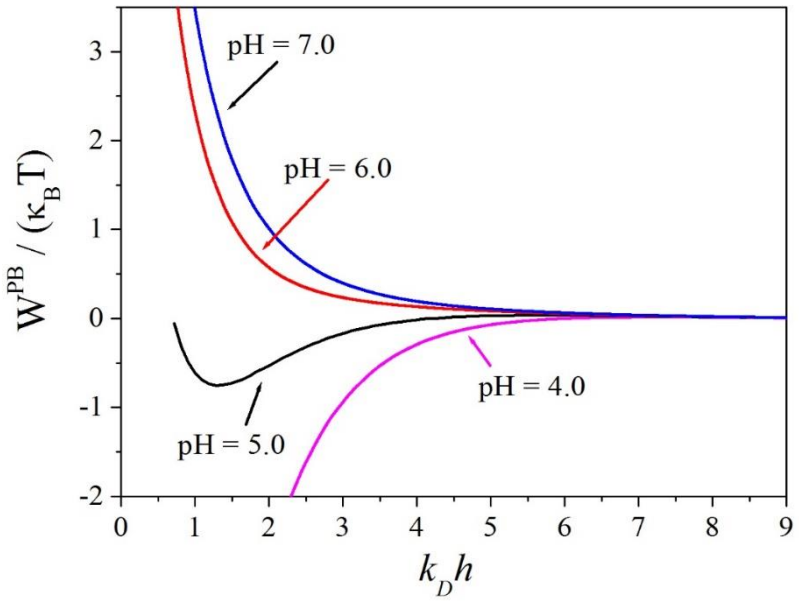


Figura 6.6. Potencial de força media obtido pelo cálculo da equação de PB em coordenadas biesféricas em função da distância entre a superfície da mAb1 e da fase estacionária para uma concentração de sal de 0.3 mol L^{-1} NaCl (Fractogel EMD SE HiCap).

Com a finalidade de descrever os efeitos de Hofmeister, o potencial de campo médio foi obtido via equação de PB para cinco diferentes sais: NaCl, NaBr e NaI para análise da influência dos ânions e NaCl, KCl e $SrCl_2$ para os cátions.

A **Figura 6.7** apresenta os resultados do potencial eletrostático em função do pH para sais com diferentes séries de cátions e ânions, fixando-se a força iônica de 0.3 mol L^{-1} e distância de 1 $k_D h$. Como observado em na **Figura 6.7(A)**, a proteína é afetada pelos diferentes tipos de ânions, possuindo uma repulsão e um deslocamento do ponto de carga neutra acentuada para NaI. Este comportamento pode ser descrito pela interação íon-proteína em que a seguinte série é seguida pelos seus valores da constante de dispersão: I > Br > Cl. Como o iodeto possui uma maior polarizabilidade, é compreensível que a blindagem eletrostática causada seja maior em relação aos outros ânions.

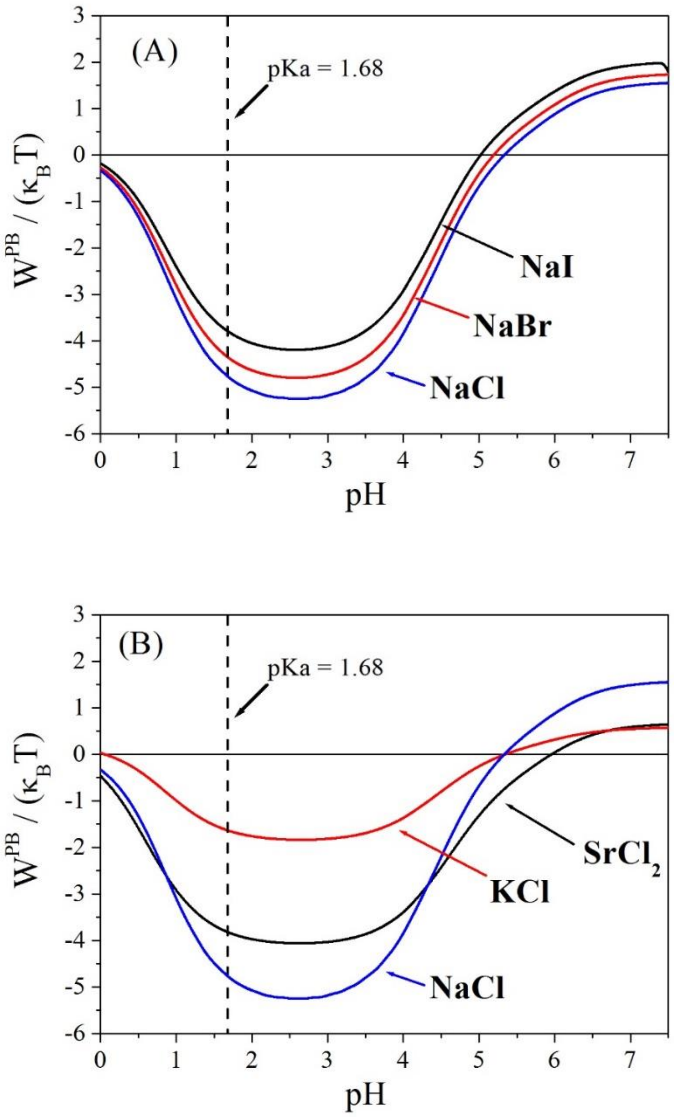


Figura 6.7. Comparação entre os potenciais de força media adimensionais para três diferentes tipos de (A) aníons e (B) cátions. A distância entre esfera-plano foi fixada em $k_D h$ = 1 para melhor análise, com força iônica igual a 0.3 mol L^{-1} (Fractogel EMD SE HiCap).

Na **Figura 6.7(B)** são apresentados os resultados para diferentes cátions. O íon sódio possui menor valor da constante de dispersão que a do íon potássio (0,574 $k_B T$), entretanto ambos os sais apresentam o mesmo deslocamento no ponto de carga neutra da proteína, com diferentes intensidades para o potencial de atração (valores negativos na figura) e de repulsão (valores positivos).

Em comparação com os cátions estrôncio e potássio, ambos possuem um similar valor para a constante de Hamaker entre íon-proteína e íon-suporte. A discrepância encontrada entre os dois resultados é proveniente da diferença entre as valências e sua natureza, contabilizada indiretamente pela atividade média dos sais em solução e contabilizada na densidade de carga da proteína.

A comparação entre os dados experimentais e calculados da constante de Henry são apresentados nas **Figuras 6.8** e **6.9**, sendo resolvidas pela **Equação 4.1** integrada com o potencial total de força média descrito pela **Equação 4.17**, para coordenadas biesféricas, considerando o termo de dispersão iônica e as forças de van der Waals.

A **Figura 6.8** estão separados os dados de predição da mAb1 com Fractogel EMD SE HiCap e YMC BioPro SP (10 μm de diâmetro), enquanto que na **Figura 6.9** estão os dados de Bevacizumab e Trastuzumab com fase estacionária composta pela resina YMC BioPro SP (5 μm de diâmetro).

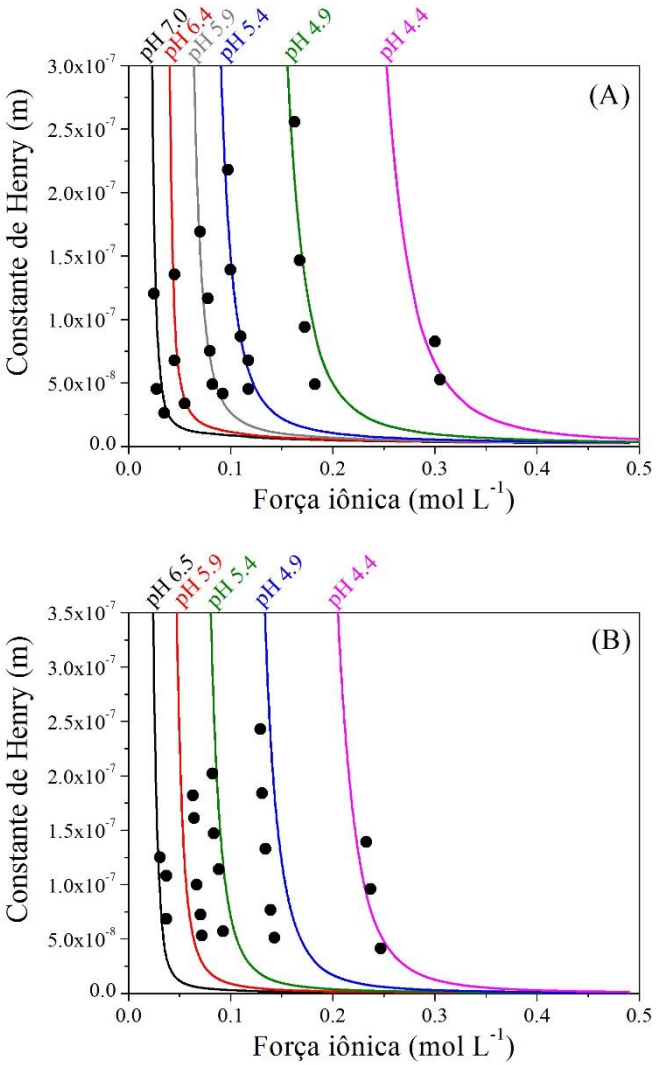


Figura 6.8. Perfis da constante de Henry para a adsorção de mAb1 em uma coluna de troca-iônica possuindo como fase estacionária: (A) Fractogel EMD SE HiCap e (B) YMC BioPro SP (10 μm) em função da força iônica e pH do meio. Os perfis foram gerados sem a necessidade de estimação de parâmetros, sendo os círculos os dados experimentais presentes na bibliografia (GUÉLAT et al., 2010).

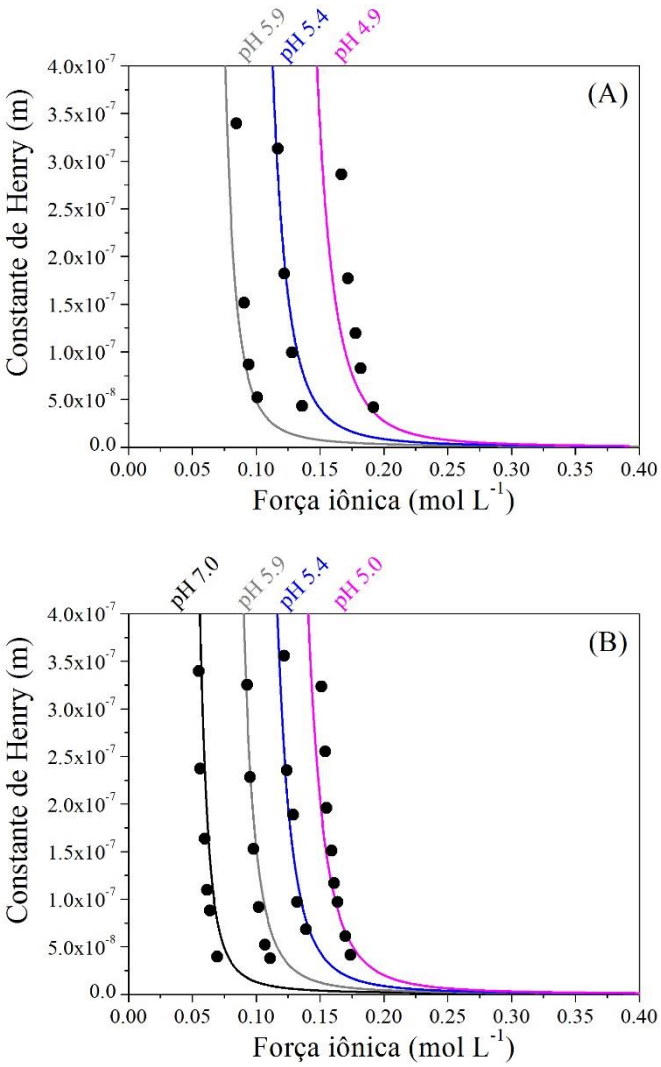


Figura 6.9. Perfis da constante de Henry para a adsorção de proteínas em uma coluna de troca-iônica possuindo como fase estacionária YMC BioPro SP (5 μm): (A) representa a predição para Bevacizumab e (B) Trastuzumab. Os perfis foram gerados sem a necessidade de estimação de parâmetros, sendo os círculos os dados experimentais presentes na bibliografia (GUÉLAT et al., 2013).

Um ponto interessante que é exposto na **Figura 6.8**, é a diferença de formato da curva de constante de Henry com a força iônica. Uma curvatura da dependência com a força iônica varia com o pH do meio. Para pH próximo do ponto de carga neutra da proteína, o comportamento da constante de equilíbrio apresenta um brusco decaimento em função da força iônica.

Na **Tabela 6.1** são encontrados os valores de R^2 para os perfis da constante de Henry apresentados. Nota-se que, com exceção da predição para mAb1 com YMC no pH 5.9, todas as curvas apresentam um coeficiente de determinação superior a 0.90.

Tabela 6.1. Valores dos R^2 determinados visando a comparação entre os pontos experimentais com o modelo de predição.

	Ref.	**pH 7.0**	**pH 6.4**	**pH 6.5**	**pH 5.9**	**pH 5.4**	**pH 5.0**	**pH 4.9**	**pH 4.4**
mAb1 (Fractogel EMD SE HiCap)	Fig. 6.8 A	0.9561	0.9980	--------	0.9935	0.9923	--------	0.9840	0.9988
mAb1 (YMC BioPro SP - 10 μm)	Fig. 6.8 B	--------	--------	0.9258	0.8414	0.9713	--------	0.9075	0.9966
Bevacizumab	Fig. 6.9 A	--------	--------	--------	0.9880	0.9860	--------	0.9790	--------
Trastuzumab	Fig. 6.9 B	0.9659	--------	--------	0.9799	0.9974	0.9921	--------	--------

Para todos os casos calculados, constante de equilíbrio diminui com o aumento da força iônica. Com o aumento da concentração de sal, tem-se uma diminuição da interação eletrostática entre a proteína e a fase estacionária, principalmente devido à blindagem eletrostática. Como as superfícies têm cargas opostas, os cátions são mais importantes para blindagem eletrostáticas da fase estacionária e os ânion nas proteínas.

Apesar de contabilizar os termos NES, o modelo poderia apresentar desvios na região de inexistência das forças eletrostáticas. Contudo, pela **Figura 6.8 A**, mesmo no pH próximo ao ponto de carga neutra da proteína, tem-se interações eletrostáticas fracas provenientes da blindagem eletrostática causada pelos ânions na superfície da proteína.

Como mostram as figuras, o modelo foi capaz de predizer, com uma boa concordância, o comportamento da constante de Henry para todas as proteínas nos três diferentes adsorventes cromatográficos estudados.

O tipo de sal altera o comportamento adsortivo (**Fig. 6.10**) como observado anteriormente pela variação da contribuição da energia livre no cálculo de PB para o sistema biesférico (**Fig. 6.7**), em que o ânion possui uma grande influência no valor da constante de Henry, enquanto que o cátion apresentou uma influência maior para o sal bivalente. A escolha do pH 4,4 para a análise da predição do cátion (**Fig. 6.10 B**), deve-se ao fato de encontrarmos uma grande diferença da influência do efeito do contra-íon na série de aníons.

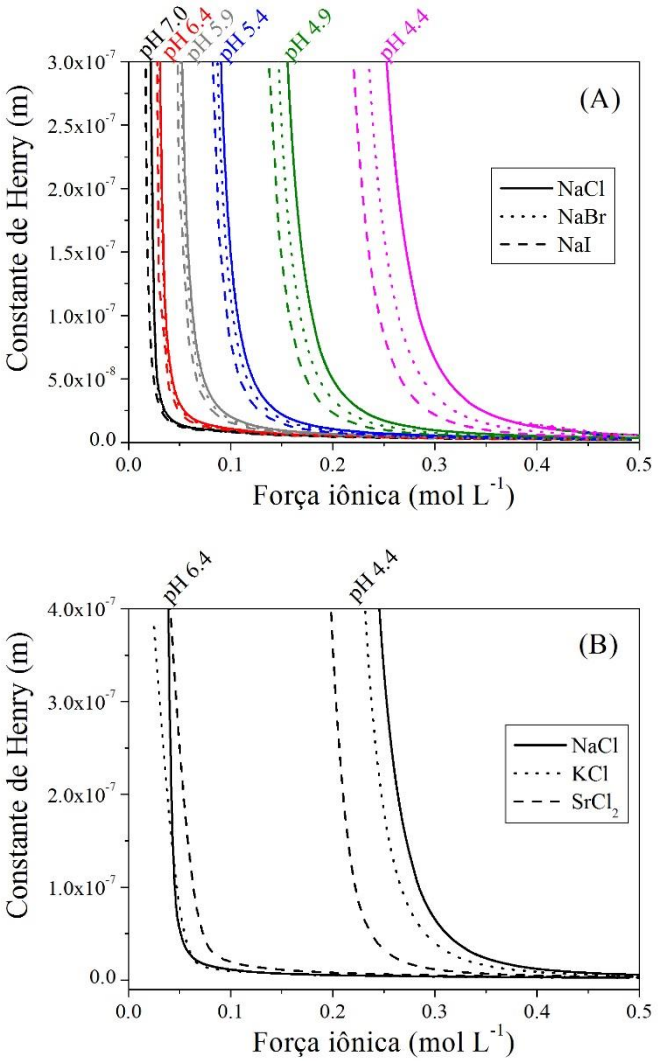


Figura 6.10. Efeito teórico da influência de três diferentes tipos de (A) ânions e (B) cátions na constante de Henry para adsorção de mAb1 em uma coluna de troca-iônica possuindo como fase estacionária Fractogel EMD SE HiCap. Para os cátions, foi realizado predições no pH de 4,4 e pH de 6,4.

Para o pH 4,4, longe do ponto isoelétrico, a proteína apresenta seu máximo valor de carga superficial para a faixa de pH em estudo, realçando as diferenças eletrostáticas causadas pela natureza do contra-íon. O iodeto apresenta uma polarizabilidade superior aos outros íons, contribuindo com a blindagem eletrostática da proteína. Logo, para um mesmo valor da constante de equilíbrio, uma quantidade maior de NaCl é necessária para realizar o mesmo efeito de blindagem do NaI.

Com o aumento do valor de pH, é observado uma proximidade dos perfis da constante de equilíbrio para os diferentes tipos de sais (**Figura 6.10 (A)**). Próximo ao ponto de carga neutra da proteína (em valores de pH < 5,0), a contribuição eletrostática é reduzida, minimizando, também, as contribuições de natureza iônica. Para os ânions, a série de Hofmeister é seguida em toda a faixa de pH estudada. Observa-se uma inversão de comportamento para o íon Sr^{2+}. Como esse íon é polarizante, apresenta uma forte atração de van der Waals entre Sr^{2+} e proteína. Próximo ao ponto de carga neutra da proteína, acontece "adsorção" de Sr^{2+} na superfície da proteína, deixando-a mais positiva. Desta forma, existe um aumento da constante de Henry, relativo ao NaCl, na mesma força iônica. No entanto, para pH 4,4, longe do ponto de carga neutra da proteína, o fenômeno é dominado pela blindagem eletrostática da fase estacionária, que é maior para o Sr^{2+}.

CAPÍTULO 7. ADSORÇÃO DE LISOZIMA

Em seu trabalho, Guélat et al. (2010) aplica a aproximação de Derjaguin no potencial de campo médio entre dois planos (**Equação 4.3**) para obtenção da geometria plano-esférica. O potencial obtido é então acoplado ao cálculo da constante de Henry, como uma função do pH e força iônica (**Equação 4.4**). No **Apêndice A** é demonstrada a resolução deste sistema analítico, possibilitando o cálculo da constante de Henry pela resolução da **Equação A.23** em softwares de cálculo matemático, como o *Mathcad*, sem grandes dificuldades.

Na **Figura 7.1** é apresentada a comparação entre o resultado obtido pela modelagem analítica com os dados experimentais, pela estimação da densidade superficial dos grupos iônicos. A estimação dos parâmetros para a metodologia analítica é necessária, em respeito às simplificações realizadas para obtenção do $W_{plano-plano}$, que aplica a hipótese de cargas iônicas pontuais, com negligência da natureza do sal e do termo de Hamaker entre a proteína e fase estacionária.

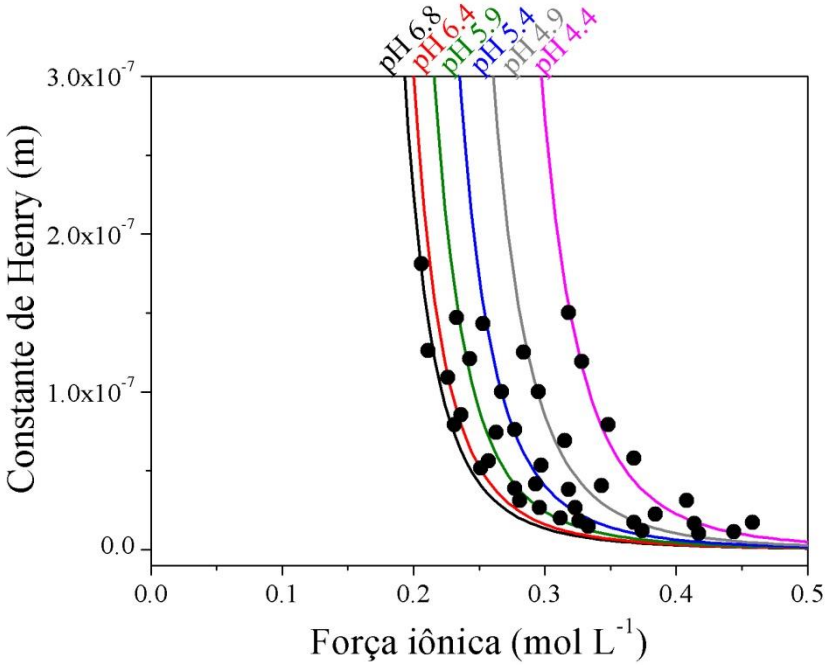


Figura 7.1. Perfil experimental e calculado da constante de Henry para lisozima com fase estacionária Fractogel EMD SE HiCap. Os perfis foram gerados após a estimação de parâmetros. Os círculos são os dados experimentais presentes na bibliografia (GUÉLAT et al., 2010).

Para a resolução da equação de PB em coordenadas biesféricas, apesar da aquisição de todas as informações necessárias para uma possível predição do comportamento da constante de Henry em função do pH e da concentração de NaCl pelo modelo que leva em consideração uma geometria realística e os termos de dispersão íon-proteína e íon-parede, conforme realizado para as mAbs, a concordância entre o dados calculados com os experimentais somente foi possível após a reestimação dos grupos iônicos na superfície (**Figura 7.2**), similar ao realizado para o modelo analítico. Os resultados obtidos após a estimação dos parâmetros de ambos os modelos estão sobrepostas para todos os perfis (**Figura 7.1**), sendo os valores apresentados na **Tabela 7.1,** obtidos utilizando $H = 5k_B T$, valor frequentemente encontrado para interação entre proteínas (TAVARES et al., 2004).

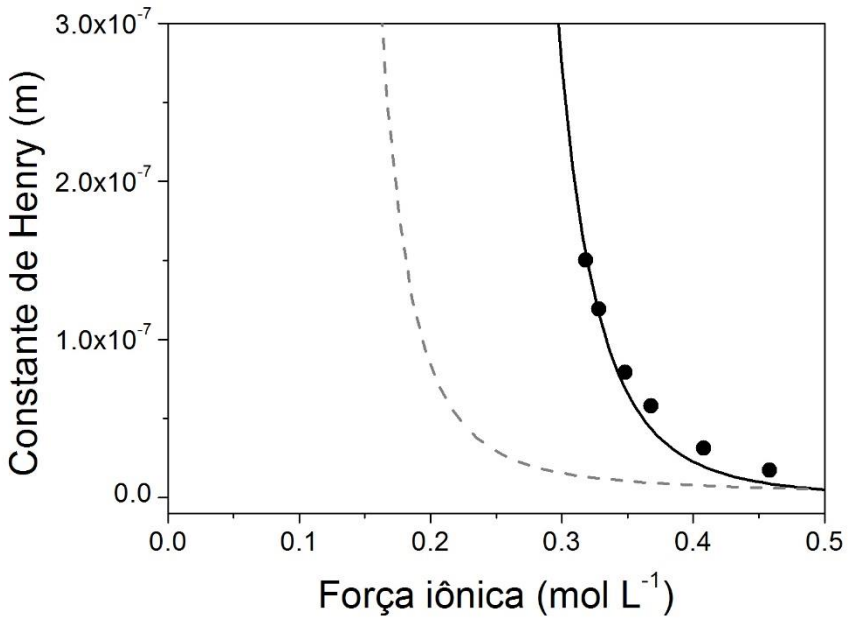


Figura 7.2. Comparação entre o perfil gerado após a estimação dos parâmetros (linha cheia) com o cálculo preditivo do comportamento da lisozima (linha tracejada). Os círculos são os dados experimentais presentes em (GUÉLAT et al., 2010), para pH 4,4.

A primeira abordagem utilizada na estimação de parâmetros foi em fixar os grupamentos na superfície e reestimar a constante de Hamaker entre a proteína e a fase estacionária. Entretanto, não foi possível encontrar apenas um valor de *H* capaz de ajustar todos os perfis com os dados experimentais reportados na literatura.

O pacote ESTIMA (SCHWAAB et al., 2008) acoplado com o Enxame de Partículas (*Particle Swarm Optimization* - PSO) foi aplicado na resolução da equação de PB tanto em sua forma analítica como em coordenadas biesféricas.

Tabela 7.1. Comparação entre os números de grupamentos iônicos estimados com os reportados na literatura para a lisozima.

Referência	Amina	Histidina	Carboxílico
Este trabalho			
Coordenadas Biesféricas	31,3	8,0	6,5
Sistema Analítico	30,4	3,4	8,8
(GUÉLAT et al., 2010)	30,6	4,0	11,1
(BOSTRÖM et al., 2003)	29,0*	1,0*	10,0*

*** Valores obtidos experimentalmente pelo ensaio de titulação.**

Conforme apresentado na **Tabela 7.1**, o resultado encontrado na estimação dos parâmetros para a resolução analítica da equação de PB foi similar aos valores estimados anteriormente por Guélat et al. (2003). O pequeno desvio encontrado nos valores deve-se ao método escolhido de estimação. Entretanto, apesar da similaridade e concordância dos dados, o grupamento histidina é superestimado no modelo.

Seria esperado que a resolução da equação de PB em coordenadas biesféricas reduzisse este efeito, contudo, foi encontrado um valor duas vezes maior do grupamento histidina em relação aos modelos anteriores.

Conforme apresentado pela **Eq. 4.17**, a energia livre do sistema é calculada pelo somatório do termo eletrostático, força de van der Waals e esferas duras. Por se tratar de um sistema diluído, tem-se a hipótese que o último termo é negligenciado neste trabalho. Como a reestimação da constante de Hamaker não foi adequada para o ajuste dos dados (figura não incluída) e o ajuste foi possível somente após a reparametrização dos termos na superfície.

O baixo valor encontrado para o grupo ácido deve ser em ocorrência da compensação do elevado valor encontrado pela histidina (grupo básico). A lisozima possui uma quantidade bem menor de grupos ionizáveis em comparação com as mAbs, este fato possivelmente invalida a consideração inicial de grupos homogêneos dispersos na superfície.

Para validação desta hipótese, diferentes valores do raio hidrodinâmico da lisozima foram inseridos no modelo, sendo os resultados encontrados apresentados na **Figura 7.3**.

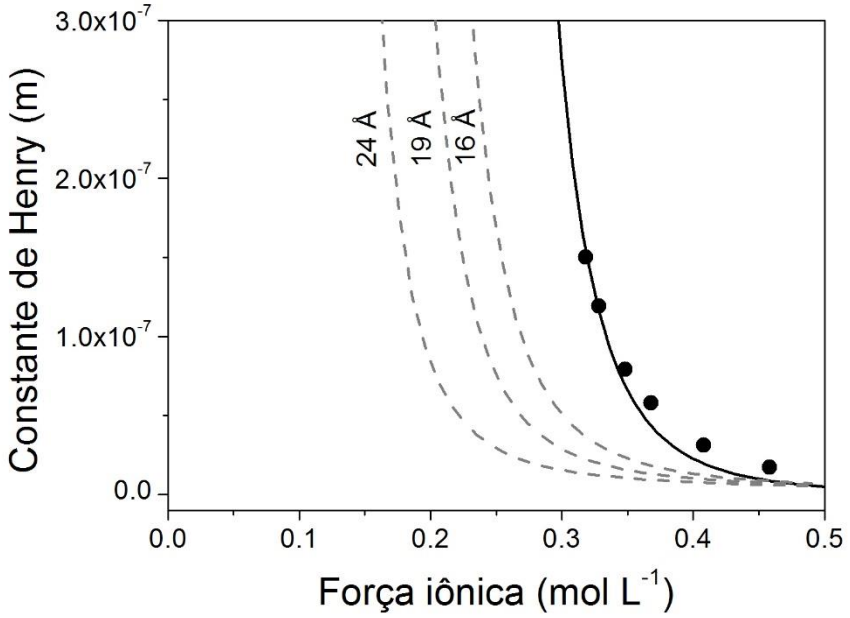


Figura 7.3. Efeito do raio hidráulico na modelagem do perfil adsortivo da lisozima. A linha cheia representa o perfil gerado pela estimação de parâmetros com raio de 24 Å, enquanto que os perfis tracejados apresentam a predição do comportamento para os raios de: 24 Å, 19 Å (BONINCONTRO et al., 1998) e 16 Å. Os círculos são os dados experimentais presentes em (GUÉLAT et al., 2010), para pH 4,4.

Todos os raios informados tratam-se da proteína lisozima. Entretanto, o ponto interessante é que a literatura apresenta diferentes valores para do raio hidrodinâmico da lisozima. Nota-se que pequena diferença de 3 Å acarreta em um desvio significativo na constante de Henry. É provável que a simplificação para um modelo esférico não seja uma abordagem adequada para este sistema, e que existe uma dependência significativa na orientação em que ocorrem as interações entre a proteína e a superfície do adsorvente.

Kubiak e Mulheran (2009) reportaram uma similar conclusão para a lisozima. Em seu estudo, os autores aplicaram um protocolo de modelagem molecular para analisar a menor distância que a proteína pode se aproximar de uma superfície planar de sílica em função da conformação da lisozima, conforme apresentado na **Figura 7.4**.

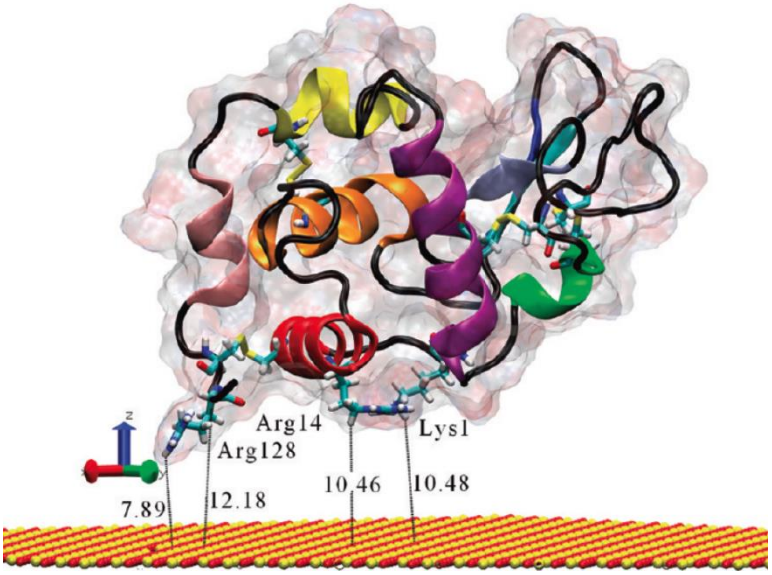


Figura 7.4. Possível orientação da lisozima no processo adsortivo (KUBIAK; MULHERAN, 2009).

Dependendo da rotação da lisozima, diferentes distâncias e potenciais são encontradas entre os grupos presentes em sua superfície com a fase estacionária. Tem-se que a análise da orientação do momento dipolo com respeito a superfície deve ser testada em sistemas governados por interações eletrostáticas para correta modelagem do sistema.

CAPÍTULO 8. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os resultados obtidos pela resolução da equação de Poisson-Boltzmann em coordenadas biesféricas mostraram-se adequados na descrição dos efeitos de blindagem eletrostática para as interações entre a íon-proteína e íon-suporte. Comparando os dados do potencial de campo médio, os ânions apresentam uma maior importância para a proteína. Para a série de cátions, o íon Sr^{2+} apresenta diferente interações para a proteína em decorrência da sua forte polarizabilidade em comparação com os cátions monovalentes estudados. Os resultados mostraram uma boa concordância com os dados experimentais para a adsorção dos anticorpos monoclonais como uma função do pH e força iônica para três diferentes fases estacionárias, sem a necessidade de estimação de parâmetros, mostrando-se inteiramente preditivo.

Para a lisozima, o melhor resultado foi obtido após a estimação dos grupamentos de carga da proteína. Conclui-se que a hipótese de distribuição homogênea de cargas deve ser revisada para um sistema proteína-suporte em que uma quantidade pequena de grupos orgânicos contribuem na carga.

Para o aprimoramento do modelo, o momento dipolo deve ser incluso com respeito a orientação da proteína para melhor descrição dos fenômenos de estabilidade e adsorção. A predição do perfil eletrostático representa uma importante etapa na ciência dos coloides, tornando possível melhorar a simulação de sistemas complexos que possuem forças eletrostáticas em suas definições, como, por exemplo, a cromatografia multimodal. Este trabalho pode ser estendido com a inclusão dos efeitos dos tamanhos dos íons, que são relevantes para sistemas contendo elevadas concentrações de eletrólitos.

APÊNDICE A: CÁLCULO NUMÉRICO DA CONSTANTE DE HENRY

A sequência de cálculos apresentado nesta seção destina-se na determinação de uma equação para a constante de Henry que inclui a resolução analítica da energia livre pelo cálculo da equação de PB em sua forma linear.

Pela aproximação de Derjaguin, temos que o potencial de campo médio entre um sistema plano-plano pode ser aproximado para plano-esfera de acordo com:

$$W_{plano-esfera} = 2\pi R_{sphere} \int_{h}^{\infty} W_{plano-plano} dx \tag{A.1}$$

Pela substituição da equação do potencial de campo médio plano-plano (**Equação 4.5**) na **Equação A.1**:

$$W_{plano-esfera} = 2\pi R_{sphere} \int_{h}^{\infty} \frac{1}{k_D \varepsilon_0 \varepsilon_R} \frac{\left(\sigma_1^2 + \sigma_2^2\right) \cdot e^{-k_D \cdot x} + 2\sigma_1 \sigma_2}{e^{k_D \cdot x} - e^{-k_D \cdot x}} dx \tag{A.2}$$

TÉCNICA DE INTEGRAÇÃO POR SUBSTITUIÇÃO:

$$u = e^{-k_D \cdot x} \rightarrow du = -k_D e^{-k_D \cdot x} dx \rightarrow \begin{cases} dx = -du/\kappa u \\ e^{k_D \cdot x} = 1/u \end{cases} \tag{A.3}$$

$$W_{plano-esfera} = \frac{2\pi R_{sphere}}{k_D \varepsilon_0 \varepsilon_R} \int_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \frac{\left(\sigma_1^2 + \sigma_2^2\right) u + 2\sigma_1 \sigma_2}{1/u - u} \left(-\frac{du}{\kappa u}\right) \tag{A.4}$$

$$W_{plano-esfera} = A \int_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \frac{Bu + Z}{u^2 - 1} du \therefore \begin{cases} A = \dfrac{2\pi R_{sphere}}{k_D \varepsilon_0 \varepsilon_R} \\ B = \left(\sigma_1^2 + \sigma_2^2\right) \\ Z = 2\sigma_1 \sigma_2 \end{cases} \tag{A.5}$$

$$W_{plano-esfera} = AB \int_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \frac{u}{u^2 - 1} du + AZ \int_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \frac{1}{u^2 - 1} du \tag{A.6}$$

INTEGRANDO O PRIMEIRO TERMO DA EQUAÇÃO A.6

$$\int_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \frac{u}{u^2-1} du \equiv \int \frac{x}{ax^2+bx+c} dx \tag{A.7}$$

$$\int \frac{x}{ax^2+bx+c} dx = \frac{1}{2a} \ln\left|ax^2+bx+c\right| - \frac{b}{a\sqrt{4ac-b^2}} \tan^{-1} \frac{2ax+b}{\sqrt{4ac-b^2}} \tag{A.8}$$

Para: a = 1, b = 0, c = -1

$$\int_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \frac{u}{u^2-1} du = \left[\frac{1}{2}\ln\left|u^2-1\right| - 0\right]_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \tag{A.9}$$

$$\int_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \frac{u}{u^2-1} du = -\frac{1}{2}\ln\left|e^{-2k_D \cdot h}-1\right| \tag{A.10}$$

INTEGRANDO O SEGUNDO TERMO DA EQUAÇÃO A.6

$$\frac{1}{u^2-1} \equiv \frac{A^*}{u-1} - \frac{B^*}{u+1} \rightarrow 1 = A^* + B^* + u\left(A^* - B^*\right) \rightarrow A^* = B^* = \frac{1}{2} \tag{A.11}$$

$$\int_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \frac{1}{u^2-1} du = \int_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \frac{1}{2}\frac{1}{u-1} du - \int_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \frac{1}{2}\frac{1}{u+1} du \tag{A.12}$$

$$\begin{aligned} \int_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \frac{1}{u^2-1} du &= \frac{1}{2}\left[\ln\left|u-1\right|\right]_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} - \frac{1}{2}\left[\ln\left|u+1\right|\right]_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \\ &= \frac{1}{2}\left[\ln\left|0-1\right| - \ln\left|e^{-k_D \cdot h}-1\right|\right] - \frac{1}{2}\left[\ln\left|0+1\right| - \ln\left|e^{-k_D \cdot h}+1\right|\right] \end{aligned} \tag{A.13}$$

$$\int_{e^{-k_D \cdot h}}^{0} \frac{1}{u^2-1} du = -\frac{1}{2}\ln\left|\frac{e^{-k_D \cdot h}-1}{e^{-k_D \cdot h}+1}\right| \tag{A.14}$$

Substituindo a resolução do primeiro termo (Equação A.10) e do segundo termo (Equação A.14) na equação original (Equação A.6), temos que:

$$W_{plano-esfera} = AB\left[-\frac{1}{2}\ln\left|e^{-2k_D \cdot h}-1\right|\right] + AZ\left[-\frac{1}{2}\ln\left|\frac{e^{-k_D \cdot h}-1}{e^{-k_D \cdot h}+1}\right|\right] \tag{A.15}$$

A equação de equilíbrio pode ser como:

$$K = \int_0^\infty \exp\left(-\frac{W(I, pH, h)}{k_B T}\right) dh - \int_0^\infty \exp\left(-\frac{W(referência)}{k_B T}\right) dh \tag{A.16}$$

Sendo $W(referência)$ a energia livre para as condições de não adsorção.

Substituindo a Eq. A.15 na Eq. A.16 (ignorando o termo de referência), tem:

$$K = \int_0^\infty \exp\left(\frac{-AB\left[-\frac{1}{2}\ln\left|e^{-2k_D \cdot h} - 1\right|\right] - AZ\left[-\frac{1}{2}\ln\left|\frac{e^{-k_D \cdot h} - 1}{e^{-k_D \cdot h} + 1}\right|\right]}{k_B T}\right) dh \tag{A.17}$$

$$K = \int_0^\infty \exp\left(\frac{AB}{k_B T}\left[\frac{1}{2}\ln\left|e^{-2k_D \cdot h} - 1\right|\right] + \frac{AZ}{k_B T}\left[\frac{1}{2}\ln\left|\frac{e^{-k_D \cdot h} - 1}{e^{-k_D \cdot h} + 1}\right|\right]\right) dh \tag{A.18}$$

$$K = \int_0^\infty \exp\left(a\ln\left|e^{-2k_D \cdot h} - 1\right| + b\ln\left|\frac{e^{-k_D \cdot h} - 1}{e^{-k_D \cdot h} + 1}\right|\right) dh \therefore \begin{cases} a = \dfrac{AB}{2k_B T} \\ b = \dfrac{AZ}{2k_B T} \end{cases} \tag{A.19}$$

$$K = \int_0^\infty \left|e^{-2k_D \cdot h} - 1\right|^a \left|\frac{e^{-k_D \cdot h} - 1}{e^{-k_D \cdot h} + 1}\right|^b dh \tag{A.20}$$

Aplicando novamente a técnica de substituição temos, por fim, a equação de Henry simplificada:

$$e^{-k_D \cdot h} - 1 = X \rightarrow -k_B e^{-k_D \cdot h} dh = dX \rightarrow dh = -\frac{dX}{k_D(X+1)} \tag{A.21}$$

$$\begin{matrix} D \rightarrow \infty \\ D \rightarrow 0 \end{matrix} ; \begin{matrix} X \rightarrow -1 \\ X \rightarrow 0 \end{matrix} \tag{A.22}$$

$$K = \int_0^{-1} \left[\left|(X+1)^2 - 1\right|^a \left|\frac{X}{X+2}\right|^b \left(-\frac{1}{k_D(X+1)}\right)\right] dX \tag{A.23}$$

REFERÊNCIAS

ABE, Y.; UEDA, T.; IWASHITA, H.; et al. Effect of Salt Concentration on the pKa of Acidic Residues in Lysozyme. **Journal of Biochemistry**, v. 118, n. 5, p. 946–952, 1995.

ADAMCZYK, Z.; WEROŃSKI, P. Application of the DLVO theory for particle deposition problems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 83, n. 1–3, p. 137–226, 1999.

AMANO, E.; KITANO, R.; KONDO, S. Adsorption of Albumin to Porous Silicas. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 39, p. 635–641, 1988.

AMERSHAM PHARMACIA. **Ion Exchange Chromatography - Principles and Methods**. Amersham Pharmacia Biotech, 1999.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Protein purification using chromatography: selection of type, modelling and optimization of operating conditions. **Journal of Molecular Recognition**, v. 22, n. 2, p. 65–76, 2009.

BALDWIN, R. L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. **Biophysical Journal**, v. 71, n. 4, p. 2056–2063, 1996.

BONINCONTRO, A.; FRANCESCO, A. DE; ONORI, G. Influence of pH on lysozyme conformation revealed by dielectric spectroscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 1998.

BOSTRÖM, M.; WILLIAMS, D. R. M.; NINHAM, B. W. Specific Ion Effects: Why DLVO Theory Fails for Biology and Colloid Systems. **Physical Review Letters**, v. 87, n. 16, p. 168103, 2001.

BOSTRÖM, M.; WILLIAMS, D. R. M.; NINHAM, B. W. Specific Ion Effects: Why the Properties of Lysozyme in Salt Solutions Follow a Hofmeister Series. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 2, p. 686–694, 2003.

BROOKS, C. A; CRAMER, S. M. Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients. **AIChE Journal**, v. 38, n. 12, p. 1969–1978, 1992.

CAMPELO, C. S.; LIMA, L. D.; REBÊLO, L. M.; et al. In vitro evaluation of anti-calcification and anti-coagulation on sulfonated chitosan and carrageenan surfaces. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 241–248, 2016.

CARNEIRO, T. N.; NOVAES, D. S.; RABELO, R. B.; et al. BSA and Fibrinogen Adsorption on Chitosan/κ-Carrageenan Polyelectrolyte Complexes. **Macromolecular Bioscience**, v. 13, n. 8, p. 1072–1083, 2013.

CARNIE, S. L.; CHAN, D. Y. C.; STANKOVICH, J. Computation of Forces between Spherical Colloidal Particles: Nonlinear Possion-Boltzman Theory. **Journal of colloid and interface science**, 1994.

CHEN, J.; TETRAULT, J.; LEY, A. Comparison of standard and new generation hydrophobic interaction chromatography resins in the monoclonal antibody purification process. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, n. 2, p. 272–281, 2008.

CHEN, W. D.; HU, H. H.; WANG, Y. D. Analysis of steric mass-action model for protein adsorption equilibrium onto porous anion-exchange adsorbent. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 21, p. 7068–7076, 2006.

DERJAGUIN, B.; LANDAU, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. **Progress in Surface Science**, v. 43, n. 1–4, p. 30–59, 1941.

EHRL, L.; JIA, Z.; WU, H.; et al. Role of counterion association in colloidal stability. **Langmuir**, v. 25, n. 5, p. 2696–2702, 2009.

ELTEKOVA, N. A.; ELTEKOV, A. Y. Protein adsorption on silica molecular sieves. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 174, p. 611–614, 2008.

EMA. Avastin. Disponível em: https://goo.gl/NUpAxZ. Acesso em: 10/2/2016.

FEKETE, S.; BECK, A.; VEUTHEY, J.-L.; GUILLARME, D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 161–173, 2014.

GARNOCK-JONES, K. P.; KEATING, G. M.; SCOTT, L. J. Trastuzumab. **Drugs**, v. 70, n. 2, p. 215–239, 2010.

GE HEALTHCARE. **Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography: Principles and Methods**. 2006.

GUÉLAT, B.; DELEGRANGE, L.; VALAX, P.; MORBIDELLI, M. Model-based prediction of monoclonal antibody retention in ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1298, p. 17–25, 2013. Elsevier B.V.

GUÉLAT, B.; STRÖHLEIN, G.; LATTUADA, M.; et al. Simulation model for overloaded monoclonal antibody variants separations in ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1253, p. 32–43, 2012.

GUÉLAT, B.; STRÖHLEIN, G.; LATTUADA, M.; MORBIDELLI, M. Electrostatic model for protein adsorption in ion-exchange chromatography and application to monoclonal antibodies, lysozyme and chymotrypsinogen A. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 35, p. 5610–5621, 2010.

HAMAKER, H. C. The London—van der Waals attraction between spherical particles. **Physica**, v. 4, n. 10, p. 1058–1072, 1937.

HEIM, E. N.; MARSTON, J. L.; FEDERMAN, R. S.; et al. Biologically active LIL proteins built with minimal chemical diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 34, p. E4717–E4725, 2015.

HOBER, S.; NORD, K.; LINHULT, M. Protein A chromatography for antibody purification. **Journal of Chromatography B**, v. 848, n. 1, p. 40–47, 2007.

IYER, H.; TAPPER, S.; LESTER, P.; WOLK, B.; REIS, R. VAN. Use of the steric mass action model in ion-exchange chromatographic process development. **Journal of Chromatography A**, v. 832, n. 1–2, p. 1–9, 1999.

JANSON, J.-C. **Protein Purification**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

JÖNSSON, B.; STÅHLBERG, J. The electrostatic interaction between a charged sphere and an oppositely charged planar surface and its application to protein adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 14, n. 1–4, p. 67–75, 1999.

KEATING, G. M. Bevacizumab: A Review of Its Use in Advanced Cancer. **Drugs**, v.

74, n. 16, p. 1891–1925, 2014.

KELLEY, B. Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads. **mAbs**, v. 1, n. 5, p. 443–452, 2009. Journal Article, Review, United States.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495–497, 1975.

KUBIAK, K.; MULHERAN, P. A. Molecular Dynamics Simulations of Hen Egg White Lysozyme Adsorption at a Charged Solid Surface. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 36, p. 12189–12200, 2009.

LEE, J.-Y.; HAN, I. A Semi-empirical Equation for Activity Coefficients of Ions with One Parameter. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 12, p. 3709–3714, 2013.

LIAO, C.; NICKLAUS, M. C. Comparison of Nine Programs Predicting p K a Values of Pharmaceutical Substances. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 12, p. 2801–2812, 2009.

LIBURDI, K.; BENUCCI, I.; ESTI, M. Lysozyme in Wine: An Overview of Current and Future Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 5, p. 1062–1073, 2014.

LIMA, E. R. A.; BISCAIA, E. C.; BOSTRÖM, M.; TAVARES, F. W. Ion-Specific Forces between a Colloidal Nanoprobe and a Charged Surface. **Langmuir**, v. 23, n. 14, p. 7456–7458, 2007.

LIMA, E. R. A.; BISCAIA, E. C.; BOSTRÖM, M.; TAVARES, F. W.; PRAUSNITZ, J. M. Osmotic Second Virial Coefficients and Phase Diagrams for Aqueous Proteins from a Much-Improved Poisson−Boltzmann Equation †. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 43, p. 16055–16059, 2007.

LIMA, E. R. A.; TAVARES, F. W.; BISCAIA, E. C. J. Finite volume solution of the modified Poisson-Boltzmann equation for two colloidal particles. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 9, n. 24, p. 3174–3180, 2007. Journal Article, England.

MARKETSANDMARKETS. Protein Purification & Isolation Market by Technology (Precipitation, Dialysis, Electrophoresis, Western Blotting, Ion Exchange & Affinity Chromatography) by Product (Instruments, Kits, Reagents, Resins) by Application & End User - Global Forecast to 2020. .

MARTELL, A. E.; SMITH, R. M. **Other Organic Ligands**. Boston, MA: Springer US, 1977.

MARTELL, A. E.; SMITH, R. M. **Critical Stability Constants**. Boston, MA: Springer US, 1982.

MELANDER, W. R.; RASSI, Z. EL; HORVATH, C. Interplay of hydrophobic and electrostatic interactions in biopolymer chromatography. Effect of salts on the retention of proteins. **Journal of chromatography**, v. 469, p. 3–27, 1989. Journal Article, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S., NETHERLANDS.

MEUZELAAR, H.; MARINO, K. A.; HUERTA-VIGA, A.; et al. Folding Dynamics of the Trp-Cage Miniprotein: Evidence for a Native-Like Intermediate from Combined Time-Resolved Vibrational Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 39, p. 11490–11501, 2013.

MOON, P.; SPENCER, D. E. **Field Theory Handbook**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1961.

MOREIRA, L. A.; BOSTRÖM, M.; NINHAM, B. W.; BISCAIA, E. C.; TAVARES, F. W. Hofmeister effects: Why protein charge, pH titration and protein precipitation depend on the choice of background salt solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 282–283, p. 457–463, 2006.

MOREIRA, L. A.; BOSTRÖM, M.; NINHAM, B. W.; BISCAIA, E. C.; TAVARES, F. W. Effect of the ion-protein dispersion interactions on the protein-surface and protein-protein interactions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 223–230, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. C. **LEHNINGER: PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY**. New York: W. H. Freeman & Co., 2004.

NINHAM, B. W.; PARSEGIAN, V. A. Electrostatic potential between surfaces bearing ionizable groups in ionic equilibrium with physiologic saline solution. **Journal of Theoretical Biology**, v. 31, n. 3, p. 405–428, 1971.

NOSTRO, P. LO; NINHAM, B. W. Hofmeister Phenomena: An Update on Ion Specificity in Biology. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 4, p. 2286–2322, 2012.

PARSEGIAN, V. A. **Van der Waals Forces**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

PARSEGIAN, V. A.; GINGELL, D. On the Electrostatic Interaction across a Salt Solution between Two Bodies Bearing Unequal Charges. **Biophysical Journal**, v. 12, n. 9, p. 1192–1204, 1972.

PINTO, I. F.; AIRES-BARROS, M. R.; AZEVEDO, A. M. Multimodal chromatography: debottlenecking the downstream processing of monoclonal antibodies. **Pharmaceutical Bioprocessing**, v. 3, n. 3, p. 263–279, 2015.

ROTH, C. M.; LENHOFF, A. M. Electrostatic and van der Waals contributions to protein adsorption: computation of equilibrium constants. **Langmuir**, v. 9, n. 4, p. 962–972, 1993.

SALIS, A.; NINHAM, B. W. Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited. **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 21, p. 7358–7377, 2014.

SALVALAGLIO, M.; PALONI, M.; GUELAT, B.; MORBIDELLI, M.; CAVALLOTTI, C. A two level hierarchical model of protein retention in ion exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1411, p. 50–62, 2015.

SANDLER, S. I. **An Introduction to Applied Statistical Thermodynamics**. London: Wiley, 2010.

SANTOS, S. M. L.; CECILIA, J. A.; VILARRASA-GARCÍA, E.; et al. The effect of structure modifying agents in the SBA-15 for its application in the biomolecules adsorption. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 232, p. 53–64, 2016.

SANTOS, S. M. L.; NOGUEIRA, K. A. B.; SOUZA GAMA, M. DE; et al. Synthesis

and characterization of ordered mesoporous silica (SBA-15 and SBA-16) for adsorption of biomolecules. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 180, p. 284–292, 2013.

SAROFF, H. A.; HEALY, J. W. The Binding of Chloride Ions to Alkyl Amines. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 63, n. 7, p. 1178–1181, 1959.

SCHEER, J. M.; SANDOVAL, W.; ELLIOTT, J. M.; et al. Reorienting the Fab Domains of Trastuzumab Results in Potent HER2 Activators. (C. Verma, Ed.)**PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51817, 2012.

SCHWAAB, M.; BISCAIA, JR., E. C.; MONTEIRO, J. L.; PINTO, J. C. Nonlinear parameter estimation through particle swarm optimization. **Chemical Engineering Science**, v. 63, n. 6, p. 1542–1552, 2008.

SMITH, R. M.; MARTELL, A. E. **Critical Stability Constants**. Boston, MA: Springer US, 1989.

STÅHLBERG, J.; JÖNSSON, B.; HORVÁTH, C. Theory for electrostatic interaction chromatography of proteins. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 17, p. 1867–74, 1991.

STÅHLBERG, J.; JÖNSSON, B.; HORVÁTH, C. Combined effect of coulombic and van der Waals interactions in the chromatography of proteins. **Analytical chemistry**, v. 64, n. 24, p. 3118–24, 1992.

STANKOVICH, J.; CARNIE, S. L. Electrical Double Layer Interaction between Dissimilar Spherical Colloidal Particles and between a Sphere and a Plate: Nonlinear Poisson−Boltzmann Theory. **Langmuir**, v. 12, n. 6, p. 1453–1461, 1996.

SUN, J.; RAO, S.; SU, Y.; XU, R.; YANG, Y. Magnetic carboxymethyl chitosan nanoparticles with immobilized metal ions for lysozyme adsorption. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 389, n. 1–3, p. 97–103, 2011.

TAVARES, F. W.; BRATKO, D.; BLANCH, H. W.; PRAUSNITZ, J. M. Ion-Specific Effects in the Colloid−Colloid or Protein−Protein Potential of Mean Force: Role of Salt−Macroion van der Waals Interactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 26, p. 9228–9235, 2004.

TSKHOVREBOVA, L.; TRINICK, J. Titin: properties and family relationships. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 9, p. 679–689, 2003.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; SENCZUK, A. M.; KITA, Y.; ARAKAWA, T. Effects of salts on protein–surface interactions: applications for column chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 7, p. 1677–1690, 2007.

VERWEY, E. J. W., OVERBEEK, J. T. G. **Theory of the Stability of Lyophobic Colloids**. 1948.

VERWEY, E. J. W. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. **The Journal of Physical and Colloid Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 631–636, 1947.

VIDELA, H. A.; QUINTERO, L. K. H. Biocorrosion in oil recovery systems. Prevention and protection. An update. **Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia**, v. 30, n. Edición Especial, 2007.

VINCENT, B. Early (pre-DLVO) studies of particle aggregation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 170, n. 1–2, p. 56–67, 2012.

WEN, H.; HAO, J.; LI, S. K. Characterization of Human Sclera Barrier Properties for Transscleral Delivery of Bevacizumab and Ranibizumab. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 3, p. 892–903, 2013.

WILTSCHI, B. Expressed Protein Modifications: Making Synthetic Proteins. . p.211–225, 2012.

ZHANG, Y.; CREMER, P. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 658–663, 2006.