



ANÁLISE MULTI-ESCALAR DA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS: EQUAÇÃO  
DE POISSON-BOLTZMANN E REDES NEURONAIS PARA O CÁLCULO DE  
PROPRIEDADES MACROSCÓPICAS

Marlon de Souza Gama

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

Orientadores: Frederico Wanderley Tavares  
Amaro Gomes Barreto Jr.

Rio de Janeiro  
Abril de 2023

ANÁLISE MULTI-ESCALAR DA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS: EQUAÇÃO  
DE POISSON-BOLTZMANN E REDES NEURONAIS PARA O CÁLCULO DE  
PROPRIEDADES MACROSCÓPICAS

Marlon de Souza Gama

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

Orientadores: Frederico Wanderley Tavares  
Amaro Gomes Barreto Jr.

Aprovada por: Prof.<sup>a</sup> Helen Conceição Ferraz - PEQ/COPPE/UFRJ  
Prof.<sup>a</sup> Nathalia Salles Vernin Barbosa - FEN/UERJ  
Prof. Eduardo Rocha de Almeida Lima - PPGEQ/UERJ  
Prof. Fábio Antônio Tavares Ramos - DMA/IM/UFRJ  
Prof. Frederico Wanderley Tavares - PEQ/COPPE/UFRJ  
Prof. Amaro Gomes Barreto Jr. - EQ/UFRJ

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL  
ABRIL DE 2023

Gama, Marlon de Souza

Análise Multi-Escalar da Adsorção de Proteínas:  
Equação de Poisson-Boltzmann e Redes Neurais para o  
Cálculo de Propriedades Macroscópicas/Marlon de Souza  
Gama. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2023.

XIX, 148 p.: il.; 29,7cm.

Orientadores: Frederico Wanderley Tavares

Amaro Gomes Barreto Jr.

Tese (doutorado) – UFRJ/COPPE/Programa de  
Engenharia Química, 2023.

Referências Bibliográficas: p. 97 – 111.

1. Estado Coloidal. 2. Modelagem. 3.  
Termodinâmica. I. Tavares, Frederico Wanderley *et al.*  
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE,  
Programa de Engenharia Química. III. Título.

*God made the bulk; surfaces were  
invented by the devil - quote by  
Wolfgang Pauli*



# Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me guiado nessa jornada. Acredito que foi por Ele que consegui chegar na UFRJ e ter tido a oportunidade de ter trabalhado com pessoas extraordinárias. O laboratório ATOMS me acolheu de uma forma incrível, permitindo que eu pudesse crescer e amadurecer quanto pesquisador. Na minha concepção, ser pesquisador é um modo de vida. Isso ocorre pela própria característica do pesquisar de possuir uma curiosidade científica. Logo, podemos tirar férias da universidade, mas não tem como tirar férias da ciência. Em decorrência disto, o café da tarde no laboratório é sempre sinônimo de discussões científicas aleatórias. Agradeço à Yamara Matos, Thiago Pinheiro, Ingrid Azevedo, Fernanda e Renata Gaioto, Fellipe Carvalho, Vi(c)tor Sermoud e Iuri Segtovich por estes memoráveis momentos e pela imensa amizade.

Agradeço aos meus orientadores, prof. Fred W. Tavares e prof. Amaro G. Barreto Jr. Obrigado por acreditarem no meu trabalho e por terem sempre um tempo para tirar alguma dúvida minha. Me espelho no profissionalismo de ambos e espero um dia conseguir chegar perto da excelente didática e paciência que vocês possuem.

Minha imensa gratidão ao prof. Idelfonso Nogueira e do mestre Vinícius Santana, ambos da Universidade do Porto (Portugal). Sem a colaboração e ajuda de vocês, a etapa final desta tese não seria possível.

Meus agradecimentos aos meus amigos, Vinícius Selegim e Leonardo Peking. Apesar da distância, agradeço por estarem sempre presentes digitalmente e me ajudarem a desopilar durante as jogatinas online.

Obrigado a Simone e Jeovana Martins, minhas tias que me acolheram na cidade do Rio de Janeiro e me apresentaram a cultura carioca. Obrigado à minha mãe, Mônica Souza, à minha irmã, Stephanie Gama e a minha sobrinha, Monique Pereira, pelo imenso apoio. Vou sempre me lembrar dos momentos em que tive que sair, ou mutar, uma reunião para ver a dancinha que a Monique aprendeu pelas redes sociais.

Agradeço à COPPE e, em especial, ao PEQ e ao programa Acolhe COPPE pelo suporte e ajuda profissional. Durante o período de pandemia, o suporte do núcleo psicossocial Acolhe COPPE foi essencial para o desenvolvimento final do período da tese. Obrigado à Dr<sup>a</sup>. Josiane Barros pelo profissionalismo e pela ajuda.

Agradeço também às agências de fomento CAPES/CNPq pelo apoio financeiro.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a quem estiver lendo esta tese. Espero que o trabalho apresentado aqui seja capaz de elucidar suas dúvidas, ou de conseguir ao menos proporcionar uma agradável leitura.

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

ANÁLISE MULTI-ESCALAR DA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS: EQUAÇÃO DE POISSON-BOLTZMANN E REDES NEURONAIS PARA O CÁLCULO DE PROPRIEDADES MACROSCÓPICAS

Marlon de Souza Gama

Abril/2023

Orientadores: Frederico Wanderley Tavares  
Amaro Gomes Barreto Jr.

Programa: Engenharia Química

Reporta-se nesta tese um estudo que propõe cálculos em múltiplas escalas para descrever o processo de adsorção de proteínas em colunas de troca iônica, em que a termodinâmica em mesoescala é conservada nas escalas subsequentes. Desta forma, apresenta-se o uso da equação de Poisson-Boltzmann para a obtenção da distribuição do potencial eletrostático entre a superfície da proteína e do adsorvente. O potencial eletrostático é, então, aplicado no cálculo do potencial de campo médio, juntamente com o potencial atrativo oriundo das forças de van der Waals entre proteína—adsorvente. Utiliza-se essa informação nas seguintes etapas: (1) para o cálculo do parâmetro de Henry ( $K$ ), utilizado aqui para a descrição das interações entre anticorpos monoclonais e diferentes adsorventes comerciais de colunas de troca iônica; e (2) para o acoplamento de  $K$  em isotermas para adsorção entre lisozima e um material à base de sílica. É reportada, na primeira etapa, uma comparação de cálculos preditivos do parâmetro de adsorção com dados experimentais provenientes da literatura em várias condições de concentração de sais e pH do meio; na segunda etapa, é estimada a área superficial acessível ao solvente da sílica para a geração de isotermas de adsorção de lisozima em diferentes forças iônicas e pH. Com o intuito de fornecer informações para o balanço de massa em leito fixo, utilizou-se técnicas de identificação de padrões para o treinamento de um modelo de rede neuronal. Foi possível criar um modelo empírico para o rápido cálculo de  $K$ . Com o sucesso do treinamento de rede, pode-se analisar o perfil de transferência de massa de proteínas em leito fixo, como função das condições da fase fluida, como concentração de sal e pH do meio.

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

THESIS TITLE

Marlon de Souza Gama

April/2023

Advisors: Frederico Wanderley Tavares

Amaro Gomes Barreto Jr.

Department: Chemical Engineering

This thesis reports a study that proposes calculations at multiple scales to describe the protein adsorption process on ion exchange columns, in which mesoscale thermodynamics is conserved at subsequent scales. Thus, the Poisson-Boltzmann equation is presented to obtain the electrostatic potential distribution between the protein's surface and the adsorbent. The electrostatic potential is then applied to calculate the potential of mean force, together with the attractive potential arising from the van der Waals forces between protein—adsorbent. This information is used in the following steps: (1) to calculate the Henry parameter ( $K$ ), used here for the description of interactions between monoclonal antibodies and different commercial adsorbents on ion exchange columns; and (2) for the coupling of  $K$  in isotherms for adsorption between lysozyme and a silica-based material. It is reported, in the first step, a comparison of predictive calculations of the adsorption parameter with experimental data from the literature in various conditions of salt concentration and pH of the medium; in the second step, the surface area accessible to the silica solvent was estimated to obtain the adsorption isotherms of lysozyme at different ionic strengths and pH. In order to provide information for mass balance in a fixed bed, pattern identification techniques were used to train a neural network model. It was possible to create an empirical model for the fast computation of  $K$ . With the success of the neural network training, it is possible to analyze the mass transfer profile of proteins in a fixed bed as a function of the fluid phase conditions, such as salt concentration and pH of the medium.

# Sumário

<b>Lista de Figuras</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de Símbolos</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>xviii</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivos . . . . .	3
1.2 Contribuições à literatura . . . . .	4
1.3 Estrutura da tese . . . . .	8
<b>2 Revisão Bibliográfica</b>	<b>9</b>
2.1 Aplicações e uso de anticorpos monoclonais . . . . .	10
2.2 Etapas de separação e purificação para mAbs . . . . .	11
2.3 Origem dos fenômenos interfaciais: definição da carga efetiva das proteínas . . . . .	15
2.3.1 Série de Hofmeister . . . . .	17
2.4 Representação de proteínas como partículas coloidais . . . . .	19
2.5 Dupla camada elétrica . . . . .	20
2.6 Teoria DLVO . . . . .	21
2.6.1 Limitações da teoria DLVO . . . . .	25
2.7 Estratégia para integração de propriedades calculadas em diferentes escalas . . . . .	27
<b>3 Modelos matemáticos</b>	<b>33</b>
3.1 Equação de Poisson-Boltzmann Modificada . . . . .	33
3.2 Cálculo do PMF e do parâmetro de adsorção . . . . .	36
3.3 Balanço de massa por componente em leito fixo . . . . .	39
3.4 Geração do modelo substituto . . . . .	41

<b>4</b>	<b>Cálculo do parâmetro de Henry e cômputo de isothermas de adsorção</b>	<b>44</b>
4.1	Metodologia . . . . .	45
4.1.1	Interação eletrostática entre mAbs e adsorventes comerciais . .	45
4.1.2	Isothermas de adsorção de lisozima em SBA-15 . . . . .	50
4.2	Resultados e Discussões . . . . .	54
4.2.1	Interação eletrostática entre mAbs e adsorventes comerciais em leito fixo . . . . .	54
4.2.2	Estimação de parâmetros para mAbs . . . . .	62
4.2.3	Isothermas de adsorção de lisozima em SBA-15 . . . . .	65
<b>5</b>	<b>Geração do modelo substituto e o seu acoplamento ao balanço de massa em leito fixo</b>	<b>75</b>
5.1	Metodologia . . . . .	75
5.2	Resultados e Discussões para a abordagem multiescalar utilizando redes neurais: uso de modelos substitutos acoplados ao balanço de massa em leito fixo . . . . .	82
5.2.1	Perfis de concentração de misturas de proteínas em leito fixo .	90
<b>6</b>	<b>Conclusões e Sugestões</b>	<b>94</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>97</b>
<b>A</b>	<b>Contribuições</b>	<b>112</b>
A.0.1	Outras contribuições . . . . .	113
<b>B</b>	<b>Equação de Poisson-Boltzmann</b>	<b>115</b>
<b>C</b>	<b>Artigo 01</b>	<b>116</b>
<b>D</b>	<b>Artigo 02</b>	<b>126</b>
<b>E</b>	<b>Artigo 03</b>	<b>139</b>

# Lista de Figuras

2.1	Visualização estrutural da lisozima (PDB: 1GXV). As letras na configuração da estrutura primária representam tipos diferentes de aminoácidos. . . . .	10
2.2	Representação didática da cromatografia de troca iônica . . . . .	14
2.3	Representação dos aminoácidos com grupos laterais que possuem propriedades de protonação/desprotonação. . . . .	16
2.4	Classificação das partículas quanto ao tamanho. . . . .	19
2.5	Representação esquemática da dupla camada pela teoria de Gouy-Chapman. . . . .	20
2.6	Representação esquemática do fenômeno de interação eletrotática que ocorre dentro de uma coluna de separação por troca iônica. . . . .	27
3.1	Representação das forças que regem a interação entre uma proteína e uma superfície carregada em um meio contendo íons dispersos. . . .	34
3.2	Representação do processo de construção de rede neuronal para treinamento de um modelo empírico. . . . .	41
4.1	Representação esquemática dos estágios utilizados para obtenção do parâmetro de Henry e obtenção da isoterma do tipo Langmuir em função das condições da fase fluida. . . . .	45
4.2	Representação da metodologia aplicada para o cálculo do parâmetro de adsorção a partir de propriedades em mesoescala. . . . .	48
4.3	Densidade de carga superficial para diferentes mAbs e fases estacionárias. . . . .	55
4.4	Perfis do parâmetro de Henry para a adsorção de anticorpos monoclonais em diferentes coluna de troca iônica. . . . .	56
4.5	Perfis do parâmetro de Henry para a adsorção de Bevacizumabe e Trastuzumabe em uma coluna de troca iônica com YMC BioPro SP (5 $\mu$ m) (adsorvente). . . . .	57
4.6	Comparação entre os potenciais de campo médio adimensionais para três diferentes tipos de ânions e cátions. . . . .	59

4.7	O efeito Hofmeister: a influência de três diferentes sais no parâmetro de Henry para anticorpos monoclonais na série de ânions e cátions . . .	61
4.8	Curvas do parâmetro de Henry da interação entre YMC BioPro SP (10 $\mu\text{m}$ ) como diferentes anticorpos monoclonais. As curvas foram obtidos após a etapa de estimação de parâmetros e os pontos representam os dados experimentais da literatura. $T = 25^{\circ}\text{C}$ . . . . .	64
4.9	Perfis de densidade de carga superficial da lisozima e da SBA-15 em função do pH . . . . .	65
4.10	Densidade de carga superficial da proteína ( $\sigma_1$ ) como uma função do pH e da força iônica, utilizando NaCl à $25^{\circ}\text{C}$ . . . . .	67
4.11	Perfil do parâmetro de Henry para a adsorção de lisozima na superfície de sílica . . . . .	67
4.12	Isotermas de adsorção da lisozima em SBA-15. pH 10.0 à $25^{\circ}\text{C}$ . . . . .	68
4.13	Curvas do parâmetro de Henry para a região de força iônica de NaCl na faixa de pH 10.3 até pH 6.0 . . . . .	70
4.14	Isotermas de adsorção para a lisozima em SBA-15 para diferentes pHs e em duas forças iônicas distintas. . . . .	71
4.15	Curvas do parâmetro de Henry adimensional para a interação entre a superfície da sílica na presença de diferentes tipos de sais. . . . .	72
4.16	Isoterma de adsorção da lisozima em SBA-15 calculada para diferentes soluções de NaCl, NaBr e NaI, com força iônica de $0.15\text{ L}^{-1}$ em pH 9.0. . . . .	73
5.1	Representação da metodologia proposta para uso de um modelo substituto, com base no treinamento de uma rede neuronal, como uma ferramenta de conexão entre um modelo no nível do processo e outro no nível do poro. . . . .	76
5.2	Representação detalhada da estrutura da rede neuronal para o treinamento do parâmetro de isoterma nos diferentes casos estudados. . . . .	78
5.3	Curvas de nível do erro quadrático médio em função do número de neurônios e da quantidade de camadas ocultas. . . . .	84
5.4	Curvas de nível do erro quadrático médio em função do número de neurônios e da quantidade de camadas ocultas para 24000 pontos pseudo-experimentais, utilizando o parâmetro de Henry entre lisozima—SBA-15 . . . . .	85
5.5	Comparação entre os valores preditos pelo modelo substituto e os dados relativos ao parâmetro de adsorção do conjunto de teste. . . . .	86
5.6	Perfis de concentração da lisozima em uma coluna de troca iônica empacotada com um adsorvente à base de sílica em diferentes pHs e tipos de íons. . . . .	87



5.7	Perfis de eluição na saída do leito fixo para diferentes condições. . . .	89
5.8	Predição do parâmetro de Henry gerado pelo modelo substituto para o mAb P com YMC BioPro SP (10 $\mu\text{m}$ ) como adsorvente. $T = 25^{\circ}\text{C}$ . . . .	91
5.9	Evolução da concentração dos diferentes mAbs em um leito fixo empacotado com YMC BioPro SP (10 $\mu\text{m}$ ). . . . .	93

# Lista de Tabelas

2.1	Sistemas em que se utilizou de uma rede neuronal artificial para o treinamento de modelos aplicados na predição da capacidade adsortiva em junção das diferentes variáveis de entrada utilizadas para o treinamento do modelo. . . . .	31
4.1	Constante de dispersão adimensional entre íon—superfície. . . . .	46
4.2	Densidade de grupos na superfície para diferentes mAbs e das fases estacionárias. . . . .	48
4.3	Número de resíduos de aminoácidos ( $N_{res}$ ) para a lisozima e os valores correspondentes de pKa. . . . .	52
4.4	Parâmetros utilizados para a representação da sílica mesoporosa do tipo SBA-15. . . . .	53
4.5	Valores das densidades de grupos ionizáveis na superfície para diferentes mAbs . . . . .	62
5.1	Condições de operação da coluna de troca iônica. . . . .	80
5.2	Alguns pontos gerados pela técnica LHS. Para todos os casos, tem-se $\text{Na}^+$ como co-íon e $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ . . . . .	83
5.3	Medição da curtose para as diferentes frentes de massa na eluição da coluna em leito fixo para lisozima. $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ . . . . .	90

# Lista de Símbolos

$A_s$	Área superficial do adsorvente acessível à proteína, p. 24
$B_{22}$	Segundo coeficiente do Virial, p. 23
$B_{\pm}$	Constante de dispersão, p. 26
$C$	Concentração adimensional de proteína na fase móvel, p. 39
$C^*$	Concentração de proteína na fase líquida ( $\text{mg mL}^{-1}$ ), p. 38
$C_s$	Concentração adimensional da proteína na fase estacionária, p. 39
$D_{ax}$	Coeficiente de dispersão axial, p. 39
$F$	Constante de Faraday ( $96\,485\text{ C mol}^{-1}$ ), p. 47
$F_v$	Razão de volumes (volume de fluido e volume total do sistema), p. 38
$H$	Constante de Hamaker, p. 23
$I$	Força iônica ( $\text{mol L}^{-1}$ ), p. 38
$K$	Parâmetro de Henry ( $m^3/m^2$ ), p. 38
$K^*$	Parâmetro de Henry adimensional, p. 38
$K_a$	Constante de dissociação, p. 17
$K_s$	Constante de associação, p. 47
$L$	Comprimento total da coluna, p. 39
$M_a$	Massa molecular da proteína, p. 51
$N_{Av}$	Constante de Avogrado ( $6.022 \cdot 10^{23}\text{ mol}^{-1}$ ), p. 51
$N_{res}$	Número de resíduos de aminoácidos, p. 52

$Pe$	Número de Peclet, p. 39
$T$	Temperatura do sistema, p. 21
$U_{\pm}$	Potencial de dispersão iônico, p. 26
$W$	Potencial de campo médio (PMF), p. 23
$W^{Ham}$	Potencial atrativo de Hamaker, p. 37
$W^{PB}$	Contribuição eletrostática do PMF, p. 37
$W^{hs}$	Potencial de esferas rígidas, p. 37
$\Gamma$	Densidade de superfície de grupos ionizáveis ( $\text{mol m}^{-2}$ ), p. 47
$\epsilon$	Permissividade do meio (78.5), p. 21
$\epsilon_0$	Permissividade do vácuo ( $8.8542 \cdot 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$ ), p. 21
$\epsilon_m(0), \epsilon_m(v)$	Constantes dielétricas da macropartícula nas frequências 0 e $v$ , respectivamente, p. 35
$\epsilon_s(0), \epsilon_s(v)$	Constantes dielétricas do solvente nas frequências 0 e $v$ , respectivamente, p. 35
$\hat{K}$	Parâmetro de Henry calculado pela rede neuronal, p. 43
$\hbar$	Constante de Planck, p. 35
$\kappa$	Inverso do comprimento de Debye ( $\text{m}^{-1}$ ), p. 35
$\kappa_B$	Constante de Boltzmann ( $1.3805 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ), p. 22
$\mu$	Potencial químico, p. 115
$\nabla^2$	Operador laplaciano, p. 21
$\omega_T$	Porosidade total da coluna, p. 39
$\phi$	Potencial eletrostático, p. 21
$\psi$	Potencial eletrostático adimensional $\left(\frac{e\psi}{\kappa_B T}\right)$ , p. 33
$\rho$	Densidade volumétrica de íons, p. 21
$\rho_{ads}$	Densidade do adsorvente ( $\text{g cm}^{-3}$ ), p. 51
$\sigma_1, \sigma_2$	Densidade de carga superficial da proteína e do adsorvente, respectivamente, p. 36

$\tau$	Tempo adimensional ( $\frac{t \cdot u}{L}$ ), p. 39
$c$	Concentração do íon descrita pela distribuição de Boltzmann, p. 26
$c^b$	Concentração do íon no seio da fase fluida, p. 22
$c_{H^+}$	Concentração dos íons $H^+$ , p. 47
$e$	Carga elementar do elétron ( $1.602 \cdot 10^{-19}$ C), p. 22
$f(x)$	Função de ativação atribuída à camada interna, p. 41
$h$	Distância entre superfícies, p. 23
$k$	Fator de retenção para colunas de separação, p. 24
$k_m$	Coefficiente de transferência de massa em $\text{min}^{-1}$ , p. 39
$q$	Concentração local do componente na superfície da fase estacionária, em equilíbrio com a concentração na fase móvel, p. 28
$q^{eq}$	Concentração na fase adsorvida ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) em equilíbrio com a concentração de proteína na fase líquida, p. 38
$q^{sat}$	Capacidade de saturação aparente ( $\text{mg/mL}_{\text{sólido}}$ ) da proteína, p. 50
$r_H$	Espessura da camada de hidratação ( $1.5 \text{ \AA}$ para proteínas), p. 37
$r_p$	Raio da macropartícula, p. 37
$r_s$	Raio de poro do adsorvente, p. 51
$r_{ion}$	Raio do íon ( $2 \text{ \AA}$ ), p. 34
$t$	Tempo, p. 39
$u$	Velocidade efetiva do fluido, p. 28
$v_p$	Volume de poro, $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , p. 51
$w$	Velocidade na direção longitudinal, p. 28
$z$	Coordenada axial da coluna ( $0 \leq z \leq 1$ ), p. 39
$(\eta, \theta)$	Operador Laplaciano para coordenadas esféricas, p. 35

# Lista de Abreviaturas

ALiCE	<i>Associate Laboratory in Chemical Engineering</i> , filiado à Universidade do Porto, p. 7
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 10
ATOMS	<i>Applied Thermodynamics and Molecular Simulation</i> , p. 4
COPPE	Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia, p. 4
DLVO	Teoria de estabilidade dos coloides. Desenvolvida por Boris Derjaguin, Lev Landau, Evert Verwey e Theodor Overbeek., p. 21
EPQB	Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, p. 4
HH	Equação de Henderson-Hasselbalch, p. 66
IEC	Cromatografia por troca iônica, do inglês <i>Ion Exchange Chromatography</i> , p. 13
LHS	<i>Latin Hypercube Sampling</i> , p. 77
NTNU	Universidade Norueguesa de Ciência e Tecnologia ( <i>Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet</i> ), p. 7
PBE	Equação de Poisson-Boltzmann, p. 22
PBEm	Equação de Poisson-Boltzmann modificada, p. 22
PDB	Repositório online de dados estruturais de proteínas, do inglês: <i>Protein Data Bank</i> , p. 16
PEQ/COPPE	Programa de Engenharia Química da COPPE, p. 4
PINN	<i>Physics-informed neural network</i> , p. 7

SBA-15	Sílica mesoporosa do tipo <i>Santa Barbara Amorphous</i> - 15 (SBA-15), p. 50
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil), p. 4
mAb	Anticorpo monoclonal, do inglês: <i>monoclonal antibody</i> , p. 9

# Capítulo 1

## Introdução

Na indústria biofarmacêutica, o processo de adsorção de proteínas é amplamente aplicado nas etapas de separação e purificação. O processo cromatográfico utiliza de uma ampla gama de adsorventes (fase estacionária), que podem apresentar distintas geometrias ou fases (líquida, gel ou sólida) [1].

Em linhas gerais, o fenômeno de adsorção pode ser entendido como o excesso de um dado componente nas proximidades de uma interface, quando comparado com a concentração deste mesmo componente no seio da fase fluida. Define-se aqui como interface a fina camada de separação entre a fase líquida com a fase contendo moléculas pertencentes ao adsorvente. De acordo com Ruthven [2], a adsorção pode ser caracterizada pela formação de mono ou multicamadas, em que o adsorvato (molécula/partícula/macropartícula) interage com o sítio ativo do adsorvente (material sólido que promove a adsorção).

Tem-se com isso a existência de um fenômeno que pode ser aplicado de forma ampla, sendo explorado em técnicas de caracterização de sólidos, como a termogravimetria e calorimetria [3]; ou em técnicas de separação e purificação de bioprodutos. A relação que descreve a dependência entre as concentrações de cada componente em cada fase a uma dada temperatura é uma informação constitutiva fundamental. A isoterma de Langmuir é comumente reportada na literatura para esta finalidade, e apresenta derivação a partir da mecânica estatística [4].

Apesar dos estudos que envolvem os processos adsorptivos serem bastante difundidos, a literatura atual ainda é escassa de técnicas e de modelos matemáticos para descrever o equilíbrio de adsorção de sistemas envolvendo bioprodutos.

Vale ressaltar que a equação de Langmuir se abstém de hipóteses relacionadas à adsorção de bioprodutos. Embora tenha-se uma similaridade do perfil da adsorção de proteínas com o perfil da isoterma de Langmuir, isto não valida que as hipóteses iniciais são respeitadas. Resume-se por Latour et al. [5] esta problemática da seguinte forma:



*"To summarize, the protein adsorption isotherm might look like a Langmuir adsorption process (i.e., it may look like a duck), and might let you nicely calculate fitted parameters just like a Langmuir adsorption process (i.e., it might quack like a duck), but, except for in extremely rare cases, it simply is not a Langmuir adsorption process (i.e., it's not a duck!)."*

O objetivo nesta tese não é em descartar o uso da equação de Langmuir, uma vez que a mesma é amplamente utilizada na literatura para adsorção de proteínas [6–9]. Sabe-se que proteínas podem apresentar diferentes formas, tamanhos e densidade de cargas superficiais por conta de distintos fatores, tais como o pH, temperatura, concentração de eletrólitos e os tipos de íons em solução. A problemática é que estes fatores são usualmente negligenciados na construção de isotermas, tornando-se o uso irrefletido da estimação de parâmetros como uma ferramenta para ajuste das variáveis do modelo aos dados experimentais. Este procedimento deve ser conduzido de forma cuidadosa para evitar a geração de parâmetros interdependentes e sem significado físico.

Nesta tese, tem-se como foco o estudo da interação entre proteínas (adsorvato) em colunas de troca iônica que utilizam adsorventes comerciais (em fase sólida); e em uma coluna de leito fixo que usa um material a base de sílica como fase estacionária. Em suma, aplica-se aqui uma primeira etapa em que é apresentada uma abordagem em escala mesoscópica da interação entre proteínas e superfícies de adsorventes carregados. Apresenta-se, no decorrer do texto, as hipóteses utilizada para a descrição das proteínas neste estudo, bem como os passos aplicados para tornar a isoterma de Langmuir uma função das propriedades da proteína, do adsorvente e das condições de solução.

Na segunda etapa da tese, tem-se como finalidade a obtenção de um modelo substituto, treinado com base em redes neurais. O modelo substituto é utilizado para o cálculo do parâmetro da isoterma de adsorção, aplicados posteriormente em modelos que representam aspectos em macroescala. É crescente a aplicação de rede neurais para identificação de padrões de processos adsorptivos [10–15]. Entretanto, torna-se objetivo desta tese o uso de redes neurais como uma ferramenta de integração da mesoescala, relativo à interação entre proteínas—adsorvente, com o perfil em macroescala de concentração de proteínas ao longo do tempo e da coordenada espacial de um leito fixo representativo de colunas cromatográficas.

## 1.1 Objetivos

O objetivo geral é estudar fenômenos de adsorção de proteínas levando em conta as interações eletrostática que ocorrem quando proteínas interagem com superfícies carregadas. A abordagem utilizada aqui apresenta um carácter multi-escalar, tendo como objetivo final descrever o processo de separação de proteínas em leito fixo. Nesta tese, dar-se ênfase aos efeitos em mesoescala para elucidar a relação entre a interação proteína—adsorvente e as condições da fase fluida: força iônica, pH e os tipos de íons em solução.

Objetivos específicos:

- (1) Apresentar uma abordagem, com base termodinâmica, para o cálculo de interações entre proteínas e superfícies carregadas;
- (2) Calcular o potencial de campo médio a partir da Equação de Poisson-Boltzmann modificada e aplicá-lo na obtenção do parâmetro de Henry (relativo a ensaios de adsorção);
- (3) Análise da especificidade iônica para sistemas contendo anticorpos monoclonais e lisozima;
- (4) Estimativa da área superficial acessível ao solvente para ensaios de adsorção em leito fixo de lisozima, tendo um material à base de sílica como fase estacionária;
- (5) Treinamento de modelos empíricos, com base na técnica de aprendizado de máquina, para obtenção do parâmetro de Henry em relação às condições da fase fluida (pH, força iônica e tipo de íon em solução);
- (6) Aplicar as informações obtidas em mesoescala, por meio do uso de um modelo empírico, à simulação do perfil de concentração de proteínas em leito fixo.

## 1.2 Contribuições à literatura

Dentre as linhas de pesquisa do ATOMS<sup>1</sup>, pode-se encontrar contribuições à literatura que listam o estudo de interfaces voltado ao comportamento de proteínas em superfícies carregadas. Moreira et al. [16] apontam uma interessante crítica a modelos simplificados que apresentam base na teoria de Debye-Hückel<sup>2</sup>. O estudo apresentado por Moreira mostra que os efeitos de polarizabilidade dos íons, que são usualmente negligenciados, devem ser tratados na mesma ordem que a contribuição eletrostática no potencial químico. O desenvolvimento deste estudo permitiu uma posterior contribuição [17], que utiliza a termodinâmica para calcular o segundo coeficiente do virial de lisozima em NaCl em pH 4.5.

Uma abordagem bastante utilizada na literatura surge da descrição do perfil de íons em interfaces de acordo com a teoria de Gouy-Chapman. Conforme reportado por Alijó et al. [18], essa teoria diverge para sistemas confinados e/ou para elevadas concentrações de eletrólitos. Para o potencial químico, adicionam-se dois potenciais não-eletrostáticos: o potencial de dispersão dos íons e um potencial correspondente ao modelo de Boublik-Mansoori-Carnahan-Starling-Leland. Este último termo surge ao assumir a hipótese de que os íons podem ser considerados como esferas rígidas com diâmetros distintos.

As contribuições de Moreira et al. [16, 17] e de Alijó et al. [18] apresentam a mesma metodologia para resolver a equação de Poisson-Boltzmann de forma não-linearizada e em coordenadas cartesianas, com a inclusão dos termos não-eletrostáticos. Lima et al. [19, 20] reporta um método para a resolução da Equação de Poisson-Boltzmann em coordenadas esféricas, mostrando maior exatidão da representação dos fenômenos em relação ao trabalho de Moreira et al. [17] ao comparar o resultado do modelo com o segundo coeficiente do virial para a lisozima. As hipóteses termodinâmicas apresentadas por Lima seguem similares àquelas de Moreira, entretanto utiliza-se um conjunto diferente de coordenadas para a discretização das equações de derivadas parciais (EDPs). Apresenta-se com isso uma proposta mais amigável para modificações na Equação de Poisson-Boltzmann

---

<sup>1</sup>O laboratório ATOMS - *Applied Thermodynamics and Molecular Simulation* - é um grupo de pesquisa formado por professores, alunos e pesquisadores de duas unidades da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/Brasil): a Escola de Química, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos (EPQB/UFRJ); e ao Programa de Engenharia Química (PEQ/COPPE) vinculado ao Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia (COPPE).

<sup>2</sup>Para uma leitura fluida do texto, é importante ressaltar o uso do hífen nesta tese. Além do uso respeitando a normal gramatical brasileira, utiliza-se o hífen curto (-) em duas ocasiões: (1) quando é referido a contribuição entre diferentes autores, e.g., Poisson-Boltzmann. Neste exemplo, é mencionando um modelo que é fruto do trabalho dos autores citados; (2) quando utilizado ao lado de um parâmetro e entre colchetes, remete-se a indicação que o parâmetro é adimensional, e.g.,  $\epsilon [-]$ .

e possíveis mudanças entre as geometrias esfera—esfera ou esfera—plano <sup>3</sup>.

De forma a cumprir os objetivos propostos, utiliza-se nesta tese a abordagem matemática reportada por Lima et al. [19, 20] para a solução da equação de Poisson-Boltzmann em coordenadas biesféricas. O potencial eletrostático obtido por essa abordagem é utilizado para o cálculo da energia livre de interação entre as superfícies. Com posse dessa ferramenta para o cômputo do potencial de campo médio, tem-se como intuito aqui calcular os parâmetros relacionados ao fenômeno de adsorção. Logo, apresenta-se a primeira contribuição à literatura da tese no artigo intitulado "*A modified Poisson-Boltzmann equation applied to protein adsorption*" (Apêndice C), publicado na *Journal of Chromatography A*. Este artigo mostra um estudo em mesoescala, relativo à validação do cômputo da energia livre de interação entre superfícies (proteína e adsorvente) para o cálculo do parâmetro de isoterma, denominado de parâmetro de Henry, em diferentes condições de concentração de sal, tipo de sal e pH do meio.

Uma extensão desse estudo é apresentado no segundo artigo: "*The binding interaction of protein on a charged surface using Poisson-Boltzmann equation: lysozyme adsorption onto SBA-15*" (Apêndice D), publicado na *Adsorption*. Nesta segunda etapa, teve-se como objetivo tornar um parâmetro da isoterma de Langmuir dependente tanto das condições da fase líquida, quanto da densidade de carga superficial do adsorvente e do adsorvato. O sucesso nesta etapa foi alcançado ao calcular o parâmetro de isoterma por meio do cômputo da Equação de Poisson-Boltzmann modificada e do potencial de campo médio. Os resultados mostram excelente concordância entre as isotermas calculadas e experimentais em diferentes concentrações de NaCl [21], para a lisozima com um adsorvente mesoporoso à base de sílica.

A gradual validação das etapas possibilitou a descrição do sistema para uma abordagem multi-escalar, ou seja: a predição das informações em mesoescala são incluídas em um modelo que descreve fenômenos em macroescala, de sua coluna de adsorção para separação de proteínas.

Com foco em apresentar o potencial de uso do modelo que descreve as interações entre superfícies, as informações termodinâmicas do domínio coloidal (mesoescala) são incluídas no cômputo do balanço de massa em leito fixo (macroescala). Para

---

<sup>3</sup>Para a tese, tem-se como alvo principal de estudo a escala mesoscópica (região entre 1 nm até 1  $\mu\text{m}$ ) que compreende um domínio chamado de coloidal. Essa classificação é melhor descrita nos capítulos a seguir, entretanto, pode-se apontar a priori que a descrição dos fenômenos interfaciais são os parâmetros-chave para entender a natureza das interações observadas em macroescala. O termo *proteína—adsorvente* (hífen longo), por exemplo, refere-se não a uma simples junção de palavras, mas a um sistema em que a superfície carregada da proteína interage com a superfície carregada do adsorvente. De forma similar, o termo *proteína—íons—adsorvente* é um sistema proteína—adsorvente em que os íons interagem também com ambas as superfícies. Logo, a ordem das palavras não apresenta importância: adsorvente—proteína e proteína—adsorvente possuem o mesmo significado.

essa etapa, aplica-se a resolução das equações diferenciais parciais que descrevem o fenômeno de separação em leito fixo conforme descrito por Severo [22] para sistemas mono/multicomponente. É válido ressaltar que a modelagem e simulação de uma coluna de separação em leito fixo é descrita por uma série de equações de derivadas parciais que apresentam hipóteses físicas referentes ao sistema em estudo (e.g.<sup>4</sup>, termos relativos ao balanço de massa e difusão axial).

Para uma análise termodinâmica e fenomenológica da adsorção de proteínas, as informações em mesoescala devem ser devidamente contabilizadas durante a resolução do balanço de massa em leito fixo. Vale ressaltar que, para determinar o parâmetro de interação entre proteína—adsorvente, as seguintes etapas são necessárias:

- (1) Obtenção da distribuição do potencial eletrostático pela resolução do sistema de Equações Diferenciais Parciais, em coordenadas esféricas, que descrevem a Equação de Poisson-Boltzmann modificada;
- (2) Determinar a força devido ao efeito eletrostático entre a proteína e a superfície do adsorvente;
- (3) Calcular o potencial de campo médio pela integral da força de interação devido ao efeito eletrostático mais a força devido ao potencial atrativo de van der Waals entre proteína—adsorvente;
- (4) Aplicar a energia total obtida para o cálculo do parâmetro de Henry;
- (5) Por fim, utilizar esse parâmetro no cálculo da capacidade adsorptiva pela equação de isoterma do tipo Langmuir.

Essa metodologia de cálculo é válida para a análise em mesoescala, mas torna-se inviável o seu acoplamento ao sistema de equações diferenciais parciais que descrevem o balanço de massa em leito fixo. Uma solução para esse problema surge a partir do treinamento de um modelo substituto, como exemplo, uma rede neuronal. Para o treinamento do modelo, se utiliza como variáveis de entrada as informações de densidades de cargas superficiais de proteínas e do adsorvente, bem como o pH, a concentração e o tipo de íons em solução. Como variável de saída do modelo, tem-se o parâmetro de Henry. Logo, o uso de um modelo substituto faz com que se tenha o parâmetro de isoterma sem a necessidade de resolver novamente as EDPs que descrevem o modelo em mesoescala, tornando possível a inclusão deste fenômeno em um modelo em macroescala.

Esta etapa foi desenvolvida em parceria com o prof. Idelfonso Nogueira, filiado à Universidade Norueguesa de Ciência e Tecnologia (NTNU); e de seu aluno Vinícius

---

<sup>4</sup>expressão em latim que significa “por exemplo”

Santana, membro do *Laboratory of Separation and Reaction Engineering* e do grupo ALiCE (Associate Laboratory in Chemical Engineering), vinculado à Universidade do Porto (Portugal). Dessa colaboração, o artigo disponibilizado no Apêndice E apresenta o uso da rede neuronal para resolução de equações diferenciais parciais (PINN). Como estudo de caso, foi aplicada a proposta de solução numérica de um modelo que representa a separação de um anticorpo monoclonal em leito fixo.

Não faz parte do escopo desta tese apresentar a metodologia PINN. Contudo, a metodologia de otimização da rede aplicada nesta tese é similar com a reportada pelo artigo desenvolvido pela colaboração (Apêndice E). Logo, tanto a etapa de revisão da literatura sobre a rede neuronal, quanto ao treinamento da rede, não seriam possíveis sem a colaboração com o grupo ALiCE.

Um manuscrito científico referente ao conteúdo do Capítulo 5 está em fase de preparação e será enviado para a revista *Adsorption* (artigo convidado).

## 1.3 Estrutura da tese

Este capítulo apresenta os conceitos de adsorção e alguns aspectos que devem ser levados em consideração antes da leitura deste trabalho. Os objetivos gerais e específicos, bem como as contribuições à literatura, podem ser encontradas neste capítulo inicial. Em seguida, no Capítulo 2, é realizada uma revisão da literatura juntamente com a fundamentação teórica. Mostram-se, neste capítulo, as definições dos principais termos utilizados nesta tese: a representação de proteínas em mesoescala, a definição do termo "macropartícula", do potencial de campo médio, série de Hofmeister, entre outros. No Capítulo 3 são apresentados os modelos aplicados, além das modificações realizadas na equação de Poisson-Boltzmann, a descrição da técnica de construção da rede neuronal e o balanço de massa para uma coluna de troca iônica em leito fixo. Descreve-se também as hipóteses utilizadas para o cálculo de propriedades relacionadas à interação de uma proteína e uma superfície carregada de um adsorvente. Com a finalidade didática, divide-se os capítulos posteriores da seguinte forma: no Capítulo 4 são apresentados as metodologias e os resultados para o cálculo do parâmetro de Henry e cômputo de isotermas de adsorção; no Capítulo 5 são apresentadas as metodologias propostas para a geração do modelo substituto e os resultados quanto ao seu acoplamento ao balanço de massa em leito fixo. Por fim, o Capítulo 6 reporta as principais conclusões, além de sugestões para trabalho futuro.

# Capítulo 2

## Revisão Bibliográfica

Proteínas são definidas como macromoléculas formadas por uma cadeia de aminoácidos. Apesar de existirem somente 20 tipos de aminoácidos, o comprimento da cadeia e a ordem em que os aminoácidos estão ligados tornam possíveis a existência de diferentes tipos de proteínas [23]. Esse tipo de ligação ocorre entre todos os aminoácidos presentes, sendo encontrada as seguintes denominações de estruturas formadas [23]: (1) a estrutura primária é a sequência linear em que os aminoácidos estão ordenados; (2) a estrutura secundária é a observação da organização da cadeia ocasionados pela natureza do grupo lateral e pela presença de ligações de hidrogênio; (3) a forma final da proteína, globular ou elíptica por exemplo, é o produto das interações intermoleculares entre os aminoácidos presentes em toda a cadeia. Esta estrutura tridimensional da proteína, denominada por sua vez como estrutura terciária, é de grande interesse para os estudos de purificação e separação; (4) a estrutura tridimensional de proteínas pode ser constituída por mais de uma cadeia de aminoácidos, como é o caso da hemoglobina. Esta formação é denominada de estrutura quaternária.

Na Figura 2.1, pode-se observar cada uma destas diferentes estruturas na visualização para a lisozima. A depender de condições tais como temperatura, presença de diferentes eletrólitos ou pH do meio, existe a possibilidade da proteína perder sua conformação (estrutura secundária, terciária ou quaternária); fenômeno denominado de desnaturação [24]. A lisozima, por exemplo, é uma proteína que apresenta diversas características farmacológicas, tais como as anti-inflamatórias [25] e antivirais [26]. De forma geral, as propriedades das proteínas são observadas para uma faixa definida de pH e temperatura [27].

Dentre as proteínas com uso farmacológico, os anticorpos monoclonais (mAbs - do inglês: *monoclonal antibodies*) apresentam maior enfoque na literatura pelo seu uso em diferentes áreas [28].



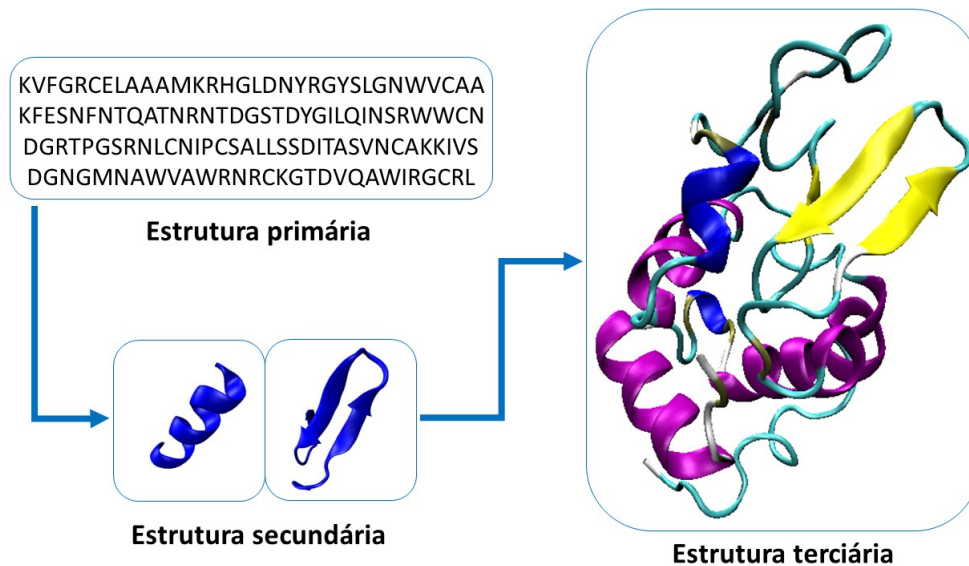


Figura 2.1: Visualização estrutural da lisozima (PDB: 1GXV). As letras na configuração da estrutura primária representam tipos diferentes de aminoácidos.

## 2.1 Aplicações e uso de anticorpos monoclonais

Os mAbs são agentes ativos de diversos tipos de medicamentos. Em países como Estados Unidos, em torno de 45% desse bioproduto é aplicado para o tratamento de câncer, seguindo de outras categorias como doenças infecciosas, tratamento de reações imunomediadas, doenças cardiovasculares, e 5% estão destinadas a outros tipos de aplicações terapêuticas [29].

Em 2010, 75% das vendas globais de anticorpos terapêuticos foram relacionadas pelos seguintes mAbs [28]: bevacizumabe, rituximabe, adalimumabe, trastuzumabe e infliximabe. Em 2019, as vendas no mercado brasileiro do trastuzumabe (tratamento de câncer de mama e câncer gástrico) e bevacizumabe (tratamento de câncer colorretal, glioblastoma e câncer de mama) faturaram acima de R\$ 500 milhões para cada um [30].

Além destes cinco bioprodutos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconhece em 2021 o uso de outros 17 tipos de mAbs. Pode-se ressaltar que nos últimos 9 anos, 33 medicamentos foram catalogados contendo como princípio ativo os mAbs, sendo 88% destes medicamentos aprovados para a compra no Brasil [31].

De acordo com o relatório da ANVISA [30], para o período de 2015 a 2019 foi observado um crescimento do faturamento da indústria biofarmacêutica no Brasil de 64,5 bilhões para 86,0 bilhões, sendo 16,2% deste valor relacionado a agentes antineoplásicos (tratamento de tumores) e imunomoduladores (fortalecimento do sistema imunológico). Como é inexistente uma divisão de categorias para a compra de mAbs no portal da ANVISA, supõem-se que nesse período entre 2015 a 2019

foram investidos em torno de 3 bilhões para a compra de mAbs visando unicamente o tratamento oncológico [30, 31].

Não obstante ao tratamento de tumor e câncer, é importante citar a recente aplicação dos mAbs no tratamento viral. A humanidade ainda enfrenta um conturbado período de pandemia decorrente da transmissão humana do vírus da família SARS-CoV iniciada em dezembro de 2019 (Covid-19), fazendo com que ocorresse uma corrida global para a produção de vacinas. A constante conscientização e estímulo mundial para a sua aplicação é necessária, entretanto o uso da vacina apresenta um desempenho reduzido em indivíduos imunocomprometidos [32]. Logo, surge a necessidade do uso de medicamentos para o auxílio ao combate viral.

Estudos apontam que os mAbs são altamente efetivos no combate à Covid-19 para casos leves e moderados, diminuindo com isso o agravamento da doença e, conseqüentemente, o número de possíveis internações [29, 33]. No Brasil, a ANVISA autorizou o uso de medicamentos contendo como princípios ativos o casirivimabe com imdevimabe [34], banlanivimabe com etesevimabe [35], regdanvimabe [36] e sotrovimabe [37] para o tratamento emergencial da Covid-19. Vale ressaltar que o primeiro medicamento de uso autorizado para profilaxia (Evusheld®) foi aprovado no Brasil, tendo em sua composição como princípios ativos os mAbs: cilgavimabe e tixagevimabe [32].

Apesar da elevada eficácia dos mAbs nas suas diferentes aplicações, os altos e crescentes valores associados a compra deste bioproduto compromete significativamente a sustentabilidade econômica do sistema de saúde [28, 31]. Para entender a origem do alto custo dos mAbs, deve-se analisar a sua linha de produção industrial.

## 2.2 Etapas de separação e purificação para mAbs

Em termos gerais, anticorpos são macromoléculas de defesa produzidas naturalmente pelos linfócitos. Estas macromoléculas se ligam de forma específica a espécies desconhecidas como fungos, vírus, dentre outros antígenos. Conforme descrito por Lu et al. [38], a primeira técnica desenvolvida visando a produção e aplicação em larga escala consiste na fusão de linfócitos de camundongos (vida curta) com células de mieloma (imortais). O resultado é a síntese do anticorpo de interesse farmacológico, seguido de uma etapa de clonagem para a sua produção em larga escala. Os anticorpos produzidos por essa técnica, i.e. hibridoma, são denominados de anticorpos monoclonais.

De acordo com Vidal et al. [28], a etapa de desenvolvimento dos mAbs vem apresentando aperfeiçoamentos para minimizar efeitos colaterais adversos, uma

vez que era comum a ampla comercialização de mAbs com sequenciamento de aminoácidos híbridos entre camundongo-humano (quiméricos). Desde 1980 [28], a indústria biofarmacêutica utiliza alguns mAbs com estruturas humanizadas, de forma a reduzir possíveis efeitos colaterais e aumentar a eficácia do bioproduto. Entretanto, independente se o mAb é quimérico ou humanizado, as etapas de produção biotecnológica são similares.

Durante o processo atual de produção em larga escala dos mAbs, e de forma similar a outros produtos biofarmacêuticos, os bioprodutos podem ser expostos a fatores de estresse, como tratamento ácidos ou térmicos, que conduzem à formação de agregados [24]. Os agregados são definidos como uma junção reversível/irreversível de duas ou mais estruturas terciárias que estão desnaturadas, formando uma nova estrutura sem finalidade terapêutica e que aumenta a possibilidade de efeitos indesejados. Portanto, é necessário alcançar um bioproduto contendo um alto grau de pureza, tornado a etapa de separação e purificação um gargalo na indústria.

Conforme relatado por Yavuz e Denizli [39], o processo de separação de proteínas é desafiador desde a primeira tentativa de Antoine François de Fourcroy, em 1789, de isolar por precipitação as proteínas presentes em plantas. Exatamente cem anos depois, Hofmeister (1889) apresentou um interessante estudo que apontava diferentes condições de precipitação da lisozima pela influência de diferentes tipos de sais [40]. Apesar do estudo de Hofmeister ser mencionado até os dias atuais, esforços relativos à separação em larga escala surgiram na Segunda Guerra Mundial, pelo projeto de Edwin Joseph Cohn, devido à necessidade da obtenção de proteínas como albuminas e outras proteínas presentes no plasma para auxiliar na regularização da pressão osmótica dos vasos sanguíneos de soldados feridos [41].

Para exemplificar o processo de obtenção atual de mAbs em larga escala, divide-se aqui as principais etapas em duas seções [42]: *upstream* e *downstream*. O estágio de *upstream* está relacionado à cultura e crescimento de células que foram geneticamente modificadas para produzir os bioprodutos de interesse. É fora do escopo deste trabalho apresentar os processos presentes neste primeiro estágio. Nesta tese, tem-se como interesse o estágio seguinte, denominado de *downstream*. No estágio de *downstream* para os mAbs, o bioproduto e seus contaminantes passam por uma série de etapas visando a purificação e separação.

As técnicas e a ordem das etapas de processo de *downstream* são desenvolvidas de acordo com as propriedades e características da proteína-alvo, e diferem de indústria para indústria [43]. De forma geral, a corrente de efluente da etapa de *upstream* é tratada primeiramente por uma técnica denominada de cromatografia por afinidade após a remoção de células. Esta técnica é amplamente utilizada devido à alta seletividade da matriz que compõe o adsorvente com o mAb de interesse. Apesar de

enorme eficácia, o custo desta etapa é em torno de 35% do custo total do processo de *downstream* [44]. Devido aos contaminantes ainda presentes, o bioproduto passa por etapas de polimento para aumentar o grau de pureza. As principais técnicas nesta etapa são a cromatografia por interação hidrofóbica e a cromatografia por troca iônica, intercaladas por etapas de ultrafiltração e diafiltração (UF/DF) [44]. Por fim, etapas adicionais de UF/DF são utilizadas para garantir que a solução contendo o mAb esteja dentro das especificações para a esterilização e estoque [43].

Diante do exposto, pode-se observar o amplo uso da cromatografia no processo de *downstream*. Esta técnica de separação foi primeiramente desenvolvida em 1903 por Tswett e é classificada como um marco na história de purificação de proteínas [39]. O processo cromatográfico foi aperfeiçoado desde então, tornando a cromatografia como uma poderosa ferramenta para separação e purificação de bioprodutos. Existem várias maneiras de se realizar a separação com base na natureza do bioproduto de interesse [45]. Devido à presença de cargas na superfície das proteínas, a diferença do comportamento eletrostático entre a proteína-alvo e as impurezas faz com que colunas por troca iônica possam ser utilizadas convenientemente neste processo [44, 46].

Os estágios do processo de troca iônica (IEC, do inglês *Ion Exchange Chromatography*) podem ser resumidos da seguinte forma [45]: No primeiro estágio, Figura 2.2A, a IEC encontra-se em um pH e concentração de íons especificados. Isto permite que o adsorvente esteja nas condições adequadas para o início da etapa de adsorção. Na segunda etapa, Figura 2.2B, o efluente contendo o bioproduto é alimentado à coluna de IEC. A interação eletrostática entre a proteína-alvo e o adsorvente provoca a retenção da proteína na coluna, enquanto que os demais componentes em solução são eluídos do leito fixo.

Alterações no pH ou na concentração de íons, representado pela cor laranja na Figura 2.2C, promovem mudanças das condições do meio e desfavorecem a interação entre o adsorvente—proteína-alvo. Na saída do leito fixo é observado a eluição dos componentes pela ordem de afinidade: o primeiro componente que sai do leito fixo possui uma menor afinidade com o adsorvente, enquanto que o de maior afinidade torna-se o último a sair. Por fim, na Figura 2.2D, é realizada a regeneração do adsorvente para o retorno ao estágio inicial.

A presença de colunas de troca iônica pode ser observada em diferentes cenários de purificação. Por exemplo, com o intuito de avaliar a purificação da enzima alfa-galactosidase, presente em sementes de girassol, Porter et al. [47] realizou estudos de purificação em que a ordem das colunas de troca iônica foram definidas de duas formas: na primeira, duas colunas de troca catiônica foram colocadas após a coluna de separação por afinidade; e na segunda, as duas colunas de troca catiônica foram aplicadas antes da coluna de separação por afinidade. O resultado é que a segunda

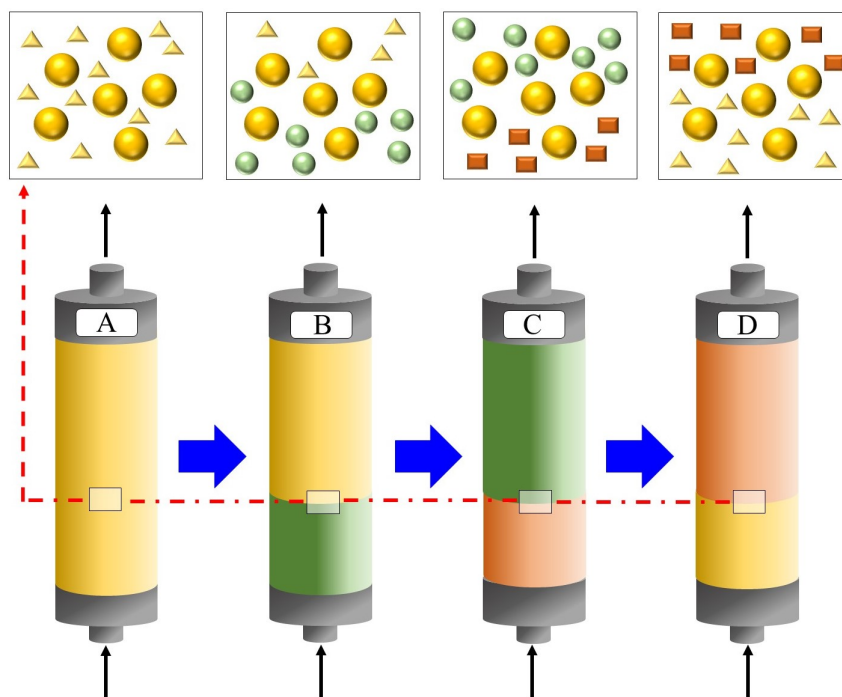


Figura 2.2: Representação didática das etapas da cromatografia de troca iônica. As setas pretas indicam a direção do fluxo, as azuis mostram a sequência de cada estágio, enquanto que a seta vermelha tracejada mostra uma representação em cada estágio: Primeiro estágio (A), em que as esferas amarelas representam o adsorvente e os triângulos os componentes de uma solução tampão especificada; em (B) é a adsorção da proteína-alvo (esferas verdes); para a etapa de dessorção (C), é realizada alterações na concentração ou tipo de eletrólitos (representado pelos quadrados alaranjados); por fim, a regeneração (D) é alcançada ao retornar as condições da fase fluida para o estágio inicial. Adaptado de Amersham Biosciences [45].

forma apresentou uma melhoria da atividade da enzima purificada em 63 vezes.

Lee et al. [48] apresenta um amplo estudo de otimização das etapas de *upstream* e *downstream* de uma proteína recombinante (RBD219-N1C1), que possui a capacidade de neutralizar o vírus SARS-CoV-2 em camundongos. Para a etapa de *downstream*, foram estudados 3 métodos de purificação:

- 01: Coluna de separação por afinidade, seguida pela técnica de cromatografia de exclusão por tamanhos;
- 02: Coluna de separação por afinidade, seguida pela técnica de cromatografia de troca aniônica;
- 03: Coluna de troca catiônica, seguida pela técnica de cromatografia de troca aniônica. Todos os métodos propostos tiveram etapas de UF/DF intercalados.

De acordo com Lee et al. [48], o segundo método foi capaz de remover de forma efetiva as impurezas presentes (>95.0%) na purificação da RBD219-N1C1. Vale

ressaltar que o objetivo do trabalho de Lee et al. [48] foi desenvolver um processo de produção que seja viável para países de baixa renda e livre de patente. Logo, as informações de produção foram disponibilizadas para a fabricante de vacinas Biological E (Índia) e, atualmente, a vacina Corbevax® foi desenvolvida por esta plataforma sustentável. A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elena Bottazzi, cientista da *Medical School in Houston, Texas*, e responsável pelo trabalho citado, foi indicada ao Prêmio Nobel da Paz de 2022 [49, 50].

Ainda sobre o trabalho de Lee et al. [48], o terceiro método foi reportado contendo pureza de 83.0%. Este resultado é bastante promissor, pois um processo de *downstream* contendo somente IECs permitiria maior sustentabilidade e baixo custo ao processo de purificação da RBD219-N1C1. No entanto, o projeto de condições de operação de unidades cromatográficas demanda o conhecimento de fenômenos interfaciais presentes.

## 2.3 Origem dos fenômenos interfaciais: definição da carga efetiva das proteínas

A carga da proteína provém da natureza dos aminoácidos presentes em sua estrutura. De forma geral, os aminoácidos são moléculas orgânicas constituídas por um carbono ligado a um grupo carboxila (-COOH), um grupo amino (-NH<sub>3</sub>), um hidrogênio e a um grupo lateral. Os aminoácidos existentes apresentam diferentes propriedades devido à natureza deste grupo lateral. Na formação da cadeia de proteínas, um grupo carboxila de um aminoácido se liga covalentemente ao grupo amino do aminoácido subsequente (ligações peptídicas). Por este efeito, os grupos terminais (-COOH e -NH<sub>3</sub>) perdem a capacidade de ionização dentro da cadeia. Logo, a carga da proteína provém dos grupos ionizáveis pertencentes aos grupos laterais [23].

Nota-se na Figura 2.3 os aminoácidos que possuem grupos laterais com propriedades de ionização, são eles: ácido aspártico e ácido glutâmico (grupos aniônicos); lisina, arginina e histidina (grupos catiônicos).

Existem diferentes formas, de acordo com a literatura, para o cálculo da carga da proteína, levando em conta a quantidade presente destes grupos iônicos. É importante mencionar que a estrutura da proteína pode ser facilmente encontrada no *Protein Data Bank* (PDB - sítio eletrônico: [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), que trata de um enorme acervo contendo informações estruturais de diferentes proteínas. A partir da identificação da estrutura pelo PDB, propriedades como: ponto isoelétrico, massa molecular, carga e porcentagem de cada resíduo presente na estrutura da proteína, podem ser calculadas por um método empírico utilizando softwares

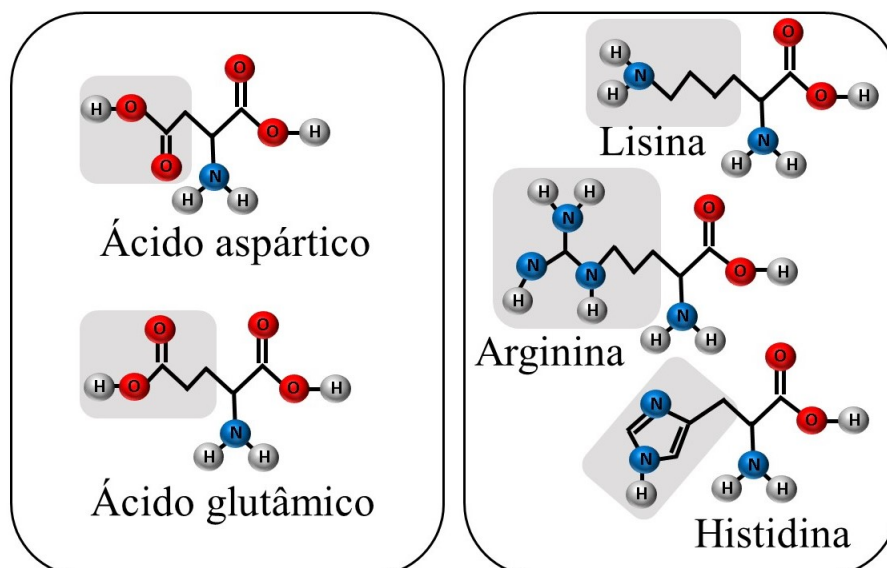


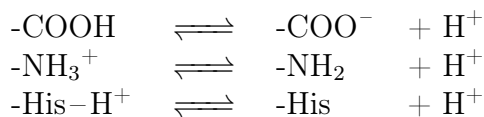
Figura 2.3: Representação dos aminoácidos com grupos laterais que possuem propriedades de protonação/desprotonação. Do lado esquerdo estão os aminoácidos de carácter aniônico; da direita estão representados os catiônicos.

livres de código aberto. O PropKa [51, 52] é um *software* livre (disponível no sítio: [www.ddl.unimi.it/vegaol/propka.htm](http://www.ddl.unimi.it/vegaol/propka.htm)) que realiza rápidos cálculos empíricos, capazes de identificar quais aminoácidos estão presentes na superfície acessível ao solvente e o valor da constante de dissociação (pKa) para cada resíduo.

Cada grupo iônizável apresenta um valor distinto de pKa, sendo este parâmetro definido como o logaritmo negativo da contante de acidez ( $K_a$ ). Este parâmetro tem sua importância no estudo de estabilidade, pois como os resíduos são afetados por mudanças do pH do meio, predição do comportamento da proteína torna-se complexa sem o valor correto deste parâmetro [53]. Vale ressaltar que é de amplo conhecimento a relação entre as propriedades da proteína com o pH do meio [54].

Esta tese tem como interesse o estudo de proteínas globulares, como é o caso da lisozima [55] e dos mAbs [56]. Algumas propriedades, como raio hidrodinâmico, e a hipótese de cargas uniformemente distribuídas na superfície dependem da estrutura da proteína em análise.

Definindo anticorpos monoclonais como proteínas globulares, Guélat et al. (2010, 2012) [7, 56] apresentou bons resultados de correlação ao utilizar uma forma simplificada para a determinação da carga líquida. Baseia-se na quantificação dos grupos carboxila (-COOH), amino (-NH<sub>2</sub>) e histidina (-His) presentes na estrutura primária. O estudo reportou a modelagem da interação entre diferentes tipos de mAbs com trocadores iônicos em leito fixo, em que a carga da proteína é estabelecida com base nos seguintes grupos:



Logo, a constante de dissociação do grupo carboxila é definida por:

$$K_a = \frac{[-\text{COO}^-][\text{H}^+]}{[-\text{COOH}]} \quad (2.1)$$

Uma forma de entender melhor a relação entre o pKa e o pH é a partir da equação de Henderson–Hasselbalch, deduzida pela expressão do  $K_a$ :

$$pH = pK_a + \log \left( \frac{[-\text{COO}^-]}{[-\text{COOH}]} \right) \quad (2.2)$$

Pode-se definir três regiões: (1) em  $pH > pK_a$  favorece a dissociação do grupo  $-\text{COOH}$ ; (2) na região  $pH < pK_a$ , tem o favorecimento da não-dissociação do grupo e (3) para  $pH = pK_a$ , tem que  $[-\text{COOH}] = [-\text{COO}^-]$ . Essa relação pode ser deduzida para os grupos amino e histidina. Por esta razão, torna-se necessário a identificação dos valores de pKa visando um mapeamento da carga da proteína levando em consideração a quantidade de cada grupo ionizado. O cálculo da carga da proteína é de vital importância para a etapa de *downstream*, uma vez que a especificação da coluna de troca iônica depende deste fator.

### 2.3.1 Série de Hofmeister

Não somente o pH, mas a concentração de eletrólitos desempenha um papel importante na estabilidade do estado coloidal. Bončina (2010) [57] menciona estudos de espalhamento de raio-X em baixo ângulo (SAXS) e de neutrons (SANS) para avaliar a estabilidade, atividade e solubilidade da lisozima em decorrência da presença de íons. Em seu trabalho, Bončina e colaboradores realizaram estudos de titulação calorimétrica para a análise da interação íon–lisozima. De acordo com o resultado, a seguinte intensidade de interação é observada:  $\text{NaSCN} > \text{NaI} > \text{NaNO}_3 > \text{NaBr} > \text{NaCl}$ . Interessante salientar que outros ensaios foram realizados modificando somente os co-íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , entretanto os efeitos de interação foram baixos em comparação com a série de ânions.

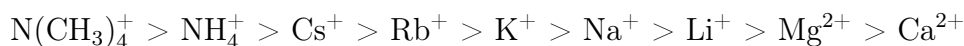
Essa sequência segue a conhecida série de Hofmeister. Em 1888, Hofmeister e colaboradores [58] desenvolveram um estudo sobre a estabilidade de uma solução constituída de proteínas presentes na clara do ovo. Seu trabalho é considerado como pioneiro pela extensa avaliação empírica na observação de efeitos de precipitação e solubilidade da lisozima para diferentes sais neutros. O trabalho de Hofmeister também foi pioneiro nas discussões acerca do efeito de íons em propriedades



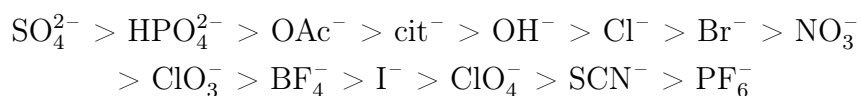
como variação da pressão osmótica, pressão de vapor e diminuição do ponto de congelamento.

Um fato interessante é que Hofmeister classificou a série pela ordenação dos sais neutros estudados. Com o decorrer dos anos, a série foi substituída pela sequência de íons. Uma típica ordenação da série pode ser apresentada da seguinte forma [59]:

A série de cátions:



Para os ânions:



À direita da série, o efeito do íon contribui para a diminuição da estabilidade da solução, ocasionando um efeito de agregação de partículas conhecido como *salting-out*. À esquerda da série, os íons auxiliam na formação de cavidades e desnaturação da proteína, além de aumentar o efeito de solubilidade (*salting-in*).

*Salting-out* era o método mais utilizado para purificação de proteínas antes do surgimento da cromatografia [60]. Acreditava-se que este efeito era ocasionado por mudanças das propriedades da água, no seio da fase fluida, pela interação entre as ligações de hidrogênio com os íons [40]. O estudo em dinâmica molecular de Omta et al. [61] teve como foco em desbancar esta teoria, mostrando que a estrutura das moléculas de água são afetadas na primeira camada de hidratação dos íons. Não foram observados efeitos de longo alcance, ocasionados pelos íons, para possíveis mudanças nas ligações de hidrogênio no seio da fase fluida. Portanto, é improvável que a série de Hofmeister seja originada por variações de propriedades que estejam distantes de fenômenos interfaciais.

É importante salientar que a sequência da efetividade proposta para cátions e ânions é apenas uma sugestão para avaliar a estabilidade da solução coloidal. A série não deve ser avaliada como uma regra universal, sendo possível identificar situações em que uma ordem direta ou inversa da série é observada. O efeito (direto/inverso) da série é mais pronunciado longe do ponto isoelétrico e o efeito do íon é menos pronunciado, podendo desaparecer, perto ponto isoelétrico [62].

A contabilização das interações diretas íons—proteínas e a dependência de parâmetros como carga, polarizabilidade, temperatura, pH, concentração e tipo de sal [63], apresentam significativa importância em determinar os efeitos de *salting-in* ou *salting-out*.

## 2.4 Representação de proteínas como partículas coloidais

Existe um domínio em que proteínas são sinônimos de macropartículas. É notório que os íons atuam na mudança de propriedades de soluções contendo proteínas (e.g., pressão osmótica, viscosidade e deformação). Tais efeitos foram observados no início do século XX [64, 65] e desde então, apesar desse termo ter sofrido melhorias em sua definição, a representação de proteínas como macropartículas carregadas e dispersas em solução, i.e. coloides, ainda é uma hipótese amplamente consolidada na literatura [66–68].

O termo coloide foi definido inicialmente pelas publicações de Thomas Graham [69, 70]. Na primeira parte do seu trabalho, Graham [69] apresentou uma analogia entre uma solução de ácido silícico com uma solução gelatinosa, classificando ambas como pertencentes a um novo estado da matéria. Graham [70] reportou algumas propriedades deste domínio, tais como: baixos coeficientes de difusão, alta viscosidade e formação de agregados quando submetidos a variação no pH da solução. Em seus estudos, reportou-se como soluções pertencentes a esta classe: a goma, o caramelo, albumina e extratos de animais e vegetais. Dentre estas substâncias, a gelatina foi proposta por Graham como a que representaria esta nova classe de materiais. Tem-se com isso a criação da palavra coloide, como origem da palavra grega *kolla* que significa algo parecido com cola ou gelatinoso [71]. Observa-se na Figura 2.4 uma melhor representação deste domínio.

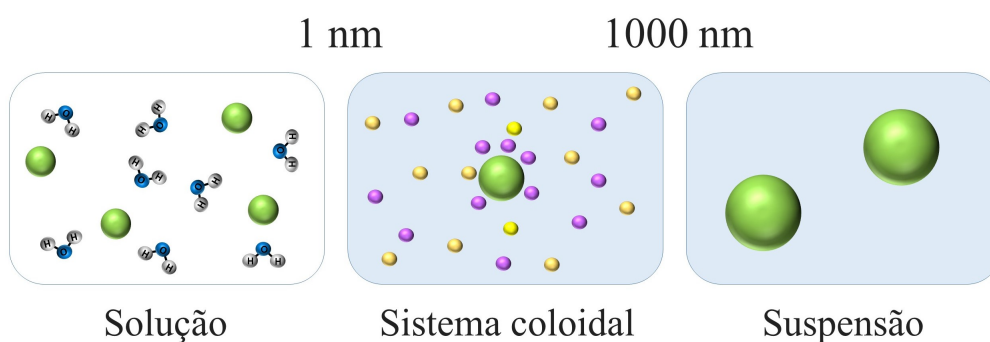


Figura 2.4: Classificação das partículas quanto ao tamanho. Soluções verdadeiras apresentam diâmetros similares ao diâmetro das moléculas do solvente. Acima de  $1 \mu m$ , efeitos gravitacionais se tornam relevantes. O estado intermediário é dito como o domínio coloidal.

Como pode é observado na Figura 2.4, partículas menores que  $1 \text{ nm}$  estão na mesma ordem de grandeza do tamanho de partícula das moléculas de água (solvente). Entende-se que o sistema coloidal é constituído por um grande número de partículas que se movem livremente em um meio contínuo. Algumas destas partículas irão se colidir devido ao movimento Browniano, podendo gerar uma nova partícula que irá

se mover de forma mais lenta que as partículas individuais, mas ainda deverá se colidir com outras de forma a promover o crescimento do agregado. Isso irá ocorrer até que a partícula se torne bem menos móvel e os efeitos gravitacionais se tornem relevantes para promover a sedimentação ( $> 1 \mu m$ ) [72]. Logo, do ponto de vista do estado coloidal, o sistema é dito estável quando as partículas permanecem dispersas no meio.

## 2.5 Dupla camada elétrica

O único real requisito para a existência do domínio coloidal é que a área superficial por unidade de volume seja grande o suficiente para que forças de área, tais como os efeitos eletrostáticos, interfiram na estabilização do sistema.

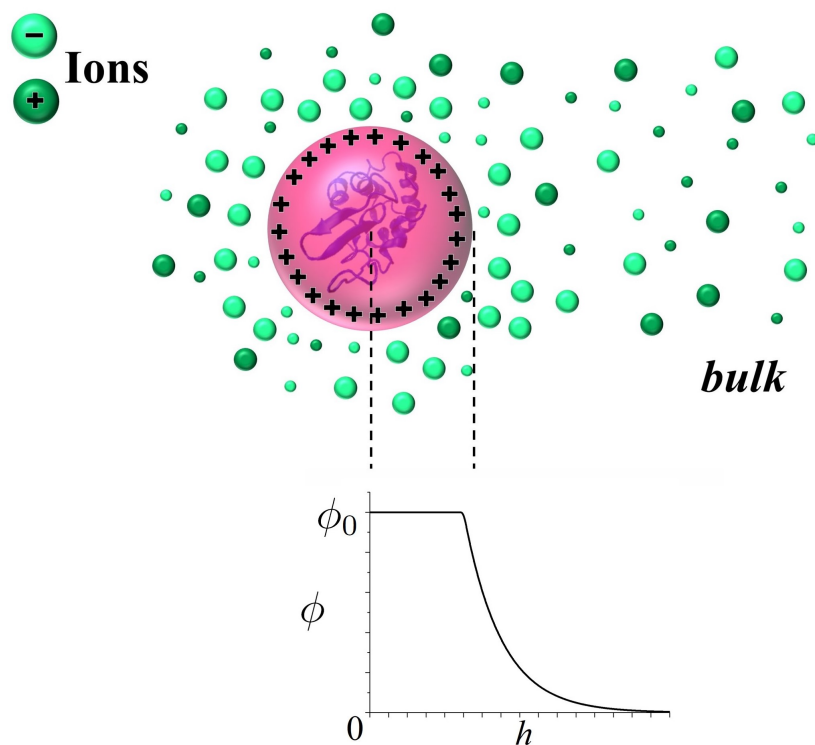


Figura 2.5: Representação esquemática da dupla camada pela teoria de Gouy-Chapman. A letra  $\phi$  representa o potencial eletrostático, sendo  $\phi_0$  o potencial de superfície.

O primeiro modelo denominado de dupla camada, surgiu em 1879 por Helmholtz-Perrin [73]. A teoria consiste em apresentar uma camada compacta de íons de carga oposta à carga da superfície, sendo válida somente para elevadas concentrações de eletrólitos. A negligência da camada difusão, provocada pelos movimentos singulares dos íons, fez com que surgisse a necessidade de melhores modelos para representar a dupla camada. Contudo, o modelo de Helmholtz-Perrin considera os

íons como cargas pontuais e que o solvente é um meio contínuo. Estas duas hipóteses permanecem aplicadas nas demais teorias clássicas de dupla camada.

O conceito de uma superfície carregada contendo em sua vizinhança uma camada difusa de íons foi questionado nos trabalhos independentes de Gouy (1910) [74] e Chapman (1913) [75] para superfícies metálicas. Chapman [75] supôs que o potencial eletrostático possa ser expresso, para quaisquer sistemas de coordenadas, pela diferença de potencial entre a solução e a superfície do metal, utilizando a equação de Poisson:

$$\nabla^2\phi = -\frac{\rho}{\epsilon\epsilon_0} \quad (2.3)$$

em que  $\rho$  representa a densidade volumétrica de íons.

Observa-se na Figura 2.5 o modelo proposto por Gouy-Chapman. Contudo, apesar do arranjo sugerido para os íons em solução concordar com as teorias propostas pela literatura, o embasamento do cálculo de  $\rho$  era específico para uma superfície metálica [76]. A diferença entre os trabalhos atuais e o modelo original proposto por Gouy-Chapman se resume na definição da densidade volumétrica dos íons ( $\rho$ ) como uma função espacial, de acordo com a distribuição de Boltzmann.

## 2.6 Teoria DLVO

### Equação de Poisson-Boltzmann

Desde meados da década de 1920, a indústria aponta uma necessidade na obtenção de uma teoria geral de coloides a fim de compreender os fenômenos de agregação e a descrição das suas várias propriedades físico-químicas [77]. A simples formulação de um modelo de carácter qualitativo, capaz de descrever a estabilidade do sistema, deve levar em consideração os efeitos de superfície pertencentes neste domínio.

Somente na década de 40, pelos trabalhos independentes de Boris Derjaguin e Lev Landau [78] e Evert Verwey e Theodor Overbeek [79] que foram obtidas formulações do comportamento de coloides com carácter tanto qualitativo como quantitativo. Por esta teoria, denominada de teoria DLVO, a estabilidade do estado coloidal é mensurada pelas contribuições termodinâmicas de energia livre dos termos repulsivos, de natureza eletrostática, e os atrativos resultante das forças de London-van der Waals.

Para o cálculo do termo repulsivo da energia livre pela teoria DLVO, é necessária a definição do perfil do potencial eletrostático aplicando a teoria eletroquímica da dupla camada. Desta forma, é necessário assumir que a concentração média dos íons, a uma distância da superfície carregada, pode ser calculada de acordo com o valor

médio do potencial eletrostático conforme descrito pela distribuição de Boltzmann [79]. Sua formulação tem como hipótese que o termo eletrostático é o único termo que contribui para a não idealidade do potencial químico do íon (Equação B.1). Tem-se com isso que a distribuição de Boltzmann é capaz de relacionar diretamente o perfil da concentração de íons com o potencial eletrostático provido pela superfície da macropartícula, sendo a distribuição obtida pela igualdade do potencial químico em qualquer ponto. Logo:

$$c_i = c_i^b \exp\left(-\frac{z_i e \phi}{\kappa_B T}\right), \text{ para } \phi^\infty = 0 \quad (2.4)$$

A equação de Poisson-Boltzmann é expressa ao contabilizar a equação de Poisson com a densidade volumétrica de cargas dos eletrólitos presentes nas vizinhanças ( $\rho = \sum z_i e c_i$ ). Logo, com as devidas substituições:

$$\nabla^2 \phi = -\frac{e \sum z_i c_i^b \exp\left(-\frac{z_i e \phi}{\kappa_B T}\right)}{\epsilon \epsilon_0} \quad (2.5)$$

em que  $z$  e  $c^b$  são, respectivamente, a valência e a concentração no seio da fase líquida do íon  $i$ ,  $e$  a carga elementar do elétron,  $\kappa_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura do sistema.

A Equação 2.5 é denominada de Equação de Poisson-Boltzmann (PBE). Na abordagem de Debye-Hückel [80], considera-se ainda que a energia térmica é superior à contribuição eletrostática ( $e\phi \ll \kappa_B T$ ). Nesta condição, a PBE pode ser facilmente resolvida pela linearização do termo exponencial ( $\exp x \approx 1 + x$ , para  $x \ll 1$ ) independente do sistema de coordenadas. Tem-se portanto, a possibilidade da formulação de uma equação analítica capaz de contabilizar a distribuição média dos íons, e o potencial eletrostático correspondente, em função da distância da superfície.

Determinar o perfil de  $\phi$  é importante para obter as demais propriedades características do sistema. Para uma interação entre duas placas planas idênticas, que é uma aproximação válida considerando a interação entre duas grandes macropartículas, a força eletrostática exercida por esta interação resulta em uma pressão de carácter repulsivo que age em cada superfície. De acordo com Debye-Hückel [79], a força para esse sistema é dado por:

$$p(h) = \frac{\epsilon \epsilon_0}{2} \left[ \left( \frac{d\phi}{dx} \right)_\infty^2 - \left( \frac{d\phi}{dx} \right)_h^2 \right] \quad (2.6)$$

em que  $p$  é a força por unidade de área entre duas placas planas como função da distância entre as superfícies ( $h$ ). A contribuição do termo repulsivo da energia livre por unidade de área pode ser calculada de acordo com a integral da força ( $p = -\frac{\partial W}{\partial h}$ ):

$$W^R(h) = -2 \int_{\infty}^h p dh \quad (2.7)$$

para  $W^R$  sendo o termo repulsivo.

O cômputo do termo repulsivo representa uma das contribuições ao potencial de campo médio. A variação da energia livre em relação ao potencial de campo médio (PMF, *Potential of Mean Force*) pode ser tanto em relação às interações superfície—íon como às interações superfície—superfície. Logo, para um ponto arbitrário em relação à distância à superfície, o PMF naquele ponto descreve um valor médio entre todas as interações que atuam no sistema.

Pela teoria DLVO, as forças atrativas também devem ser contabilizadas no cálculo do PMF. Em 1930 [81], havia o conhecimento de interações entre moléculas neutras (carga líquida igual a zero) denominadas de forças de van der Waals, cujas energias atuam com intensidades proporcionais a  $-\frac{1}{r^6}$ . A depender das características das moléculas, a natureza dessas interações podem ser classificadas como forças de dispersão de Keesom, com dipolo permanente—dipolo permanente; ou de Debye, para dipolo permanente—dipolo induzido; ou de London, para dipolo induzido—dipolo induzido [82]. De acordo com Hamaker (1937) [83], os conceitos de van der Waals podem ser aplicados para macropartículas, ao integrar a força de interação descrita localmente em relação ao volume. As constantes são atribuídas a um único parâmetro, denominado de constante de Hamaker (tratada nesta tese como  $H$ ) [81]. Esse parâmetro depende da geometria estabelecida ao resolver a integral (e.g., esfera—esfera, esfera—plano), sendo função da natureza da macropartícula e do meio em que se encontram.

## Aplicações do Potencial de Campo Médio

O principal conceito da teoria DLVO é supor que as energias de interação de origem eletrostática e não eletrostática podem ser calculadas de forma independente, sendo o potencial total a soma desses termos.

Essa abordagem é, também, reportada pela teoria com base na mecânica estatística aplicada a soluções de eletrólitos por McMillan e Mayer [84]. As contribuições de esferas rígidas, hidrofóbicas e eletrostáticas são correlacionadas com as interações entre proteína—proteína. McMillan-Mayer [84] quantificaram o segundo coeficiente do virial osmótico ( $B_{22}$ ):

$$B_{22} = 2\pi N_{Av} \int_0^{\infty} \left[ 1 - \exp\left(-\frac{W(h)}{\kappa_B T}\right) \right] h^2 dh \quad (2.8)$$

em que  $W$  é o potencial de campo médio e  $N_{Av}$  é a constante de Avogadro.

O  $B_{22}$  é parte da expansão do virial em termos de pressão osmótica, e seu uso

descreve de forma prática a estabilidade do sistema para soluções diluídas [85]. Na condição em que  $W > 0$ , tem-se que a repulsão eletrostática entre macropartícula—macropartícula domina os fenômenos. O valor de  $B_{22}$  para esta região é positivo e condiz com a estabilidade do estado coloidal. De forma análoga, para a região de contribuição atrativa ( $W < 0$ ), o valor de  $B_{22}$  torna-se negativo (dependendo da temperatura), podendo permitir a observação dos efeitos de *salting-out* a depender do sistema em estudo. A comprovação experimental desse estudo é frequentemente validada utilizando ensaios de pressão osmótica, espalhamento de luz e ponto de turbidez [86, 87].

O cômputo do fator de retenção,  $k$ , é amplamente utilizado em análises experimentais para quantificar a interação entre proteínas com a fase estacionária em colunas de separação. Por definição, este parâmetro é obtido pela razão entre o tempo que o componente reside na fase estacionária, com o tempo que permanece na fase fluida [88]. Esta relação também é descrita em função dos volumes entre as fases:  $\frac{V_r}{V_0}$  (em que  $V_r$  é o volume de retenção, caracterizado pelo volume do componente desde o início até a saída da coluna;  $V_0$  é o volume morto, definido aqui como a soma do volume total de poros com o volume intersticial entre as partículas dos adsorventes) [89].

Dentre as equações que descrevem o fator de retenção para colunas de separação, Ståhlberg et al. [90] reporta o cômputo do fator de retenção em função da energia livre de interação entre proteínas e adsorventes comerciais de troca iônica. A energia livre é obtida com base na solução da equação unidimensional e linearizada da PBE entre duas placas planas [91, 92]. Conforme reportado por Ståhlberg et al. [90], uma boa predição foi obtida para o fator de retenção da ovalbumina em uma faixa de pH entre 6.0 - 8.0 e força iônica de 0.05 - 0.10 M, sendo a magnitude de  $k$  calculada de acordo com:

$$k = \frac{A_s}{V_0} \int_0^\infty \left[ \exp\left(-\frac{W(h)}{\kappa_B T}\right) - 1 \right] dh \quad (2.9)$$

em que  $V_0$  é o volume morto da coluna e  $A_s$  é a área superficial do adsorvente acessível à proteína.

Tem-se com isso uma relação direta de um parâmetro de processo com a energia livre de interação. Portanto, torna-se importante salientar que uma predição dos fenômenos de estabilidade e adsorção de proteínas, i.e. cálculo de  $B_{22}$  e  $k$ , dependem da robustez do cálculo do PMF.

## 2.6.1 Limitações da teoria DLVO

A teoria DLVO teve sua importância histórica devido a uma amigável abordagem aplicada ao termo eletrostático do PMF, obtendo-se a partir da solução da PBE linearizada e unidimensional. Por conta disso, permitiu-se pela teoria DLVO a abertura de novas estratégias teóricas e de cálculos.

São nítidas as limitações devido às aproximações impostas por Debye-Hückel. Contudo, uma problemática maior na teoria DLVO provém da hipótese que os íons contribuem somente com a sua respectiva valência. A teoria negligencia quaisquer efeitos que indiquem o porquê das variações de *salting in* e *salting out* para diferentes íons de mesma valência, e a origem da série de Hofmeister.

Algumas hipóteses, como a contabilização do volume dos íons, devem ser aplicadas para sistemas específicos. Para fluidos confinados, por exemplo, a representação da dupla camada pode ser obtida de forma acurada, quando se considera no potencial químico os diferentes tamanhos dos íons em uma mistura [18]. Contudo, para baixas concentrações iônicas, esse efeito pode ser negligenciado.

Uma inconsistência da teoria DLVO, que deve ser corrigida em todos os modelos que tratam do domínio coloidal, provém da completa separação do comportamento eletrostático da formulação da dupla camada e as forças atrativas do tipo van der Waals na interação íons—superfícies [93–95]. É incontestável a fundamentação que íons possuem diferentes polarizabilidades e, conseqüentemente, um potencial de dispersão específico nas proximidades de interfaces. Tratando-se do domínio coloidal, Boström et al. [93] propõe que a acurácia de um modelo macroscópico é alcançada quando se considera ambas as interações eletrostáticas e de dispersão iônica na definição do potencial químico. Na análise de um estudo de caso da interação entre placas planas, força iônica de 0.3 M e potencial de superfícies de 100 mV, Boström et al. [93] reporta que a inclusão do termo de dispersão iônica contribui para o aparecimento de forças atrativas em grandes e curtas distâncias entre as interfaces, apresentando também uma barreira repulsiva na região de separação intermediária. Mostra-se ainda por Boström et al. [93] que a inclusão de um potencial de dispersão iônica promove o aparecimento de forças atrativas, surgindo mesmo sem a inclusão da contribuição de Hamaker entre macropartícula—macropartícula.

Para um sistema de interação entre íon—superfície plana em um meio contínuo, o potencial de dispersão iônico é aproximado para [93, 94]:

$$U_i \approx \frac{B_i}{r^3} \quad (2.10)$$

sendo  $r$  a distância entre o centro de massa do íon e a superfície da macropartícula e  $B$  a constante de dispersão. O índice  $i$  indica que a equação pode ser usada tanto



para o cálculo de interação entre cátion—superfície (+) ou ânion—superfície (-).

Tem-se, portanto, que a concentração de íons descrita pela distribuição de Boltzmann assume o seguinte formato:

$$c_i = c_i^b \exp\left(-\frac{z_i e \phi}{\kappa_B T} + U_i\right), \text{ para } \phi^\infty = 0 \quad (2.11)$$

Mostra-se pela Equação 2.11 o tratamento do potencial de dispersão iônico no mesmo nível que o potencial eletrostático. Antes de qualquer imposição metodológica para a solução da equação de Poisson-Boltzmann, o potencial  $U$  deve ser relacionado a cada tipo de íon disperso no meio. Equações descritas com base na teoria de Lifshitz são frequentemente aplicadas na literatura [18, 96–98] para descrever o cálculo de  $B$  (Equação 2.10), que representa a magnitude dos efeitos de interação entre íon—macropartícula.

A teoria Lifshitz assume que cada macropartícula pode ser aproximada como um meio contínuo, possuindo característicos valores da constante dielétrica, energia de ionização e índice de refração; enquanto que a energia de ionização e a polarizabilidade são as propriedades necessárias para descrever a natureza dos íons [99]. Mostrou-se pelo uso dessa teoria a predição do segundo coeficiente osmótico do virial ( $B_{22}$ ) para a lisozima em NaCl na faixa até 1.5 M em pH 4.5 [16, 20]. Reporta-se pelo trabalho de Lima et al. [20] que um aumento da polarizabilidade do íon ( $I^- > Br^- > Cl^-$ ) diminui a contribuição repulsiva lisozima—lisozima, podendo-se observar um potencial eletrostático atrativo de pequena intensidade quando  $I^-$  é considerado como contra-íon.

Diante disto, o modelo que descreve o processo de adsorção de proteínas deve incluir o termo de especificidade iônica, pois sua negligência no modelo compromete a reprodutibilidade de dados experimentais. Logo, a especificidade é um termo vital para determinar a estabilidade de soluções coloidais [93, 100]. Tal abordagem apresenta impactos nas demais escalas do sistema, permitindo, por exemplo, uma acurada descrição em processos de separação pelo cômputo do balanço de massa em leito fixo.

## 2.7 Estratégia para integração de propriedades calculadas em diferentes escalas

Para a separação em colunas de troca iônica, são observadas pela Figura 2.2 as etapas atribuídas a este processo. Realizando-se uma ampliação em uma seção arbitrária da coluna durante a etapa de separação, teria como observar, em mesoescala, as interações eletrostáticas entre as superfícies presentes (proteína—íons—adsorvente). Podemos observar na Figura 2.6 a esquematização destas interações, apresentando como interesse final a obtenção da concentração do componente na fase fluida na saída da coluna (representada usualmente por um gráfico  $C/C_0$  versus tempo de operação).

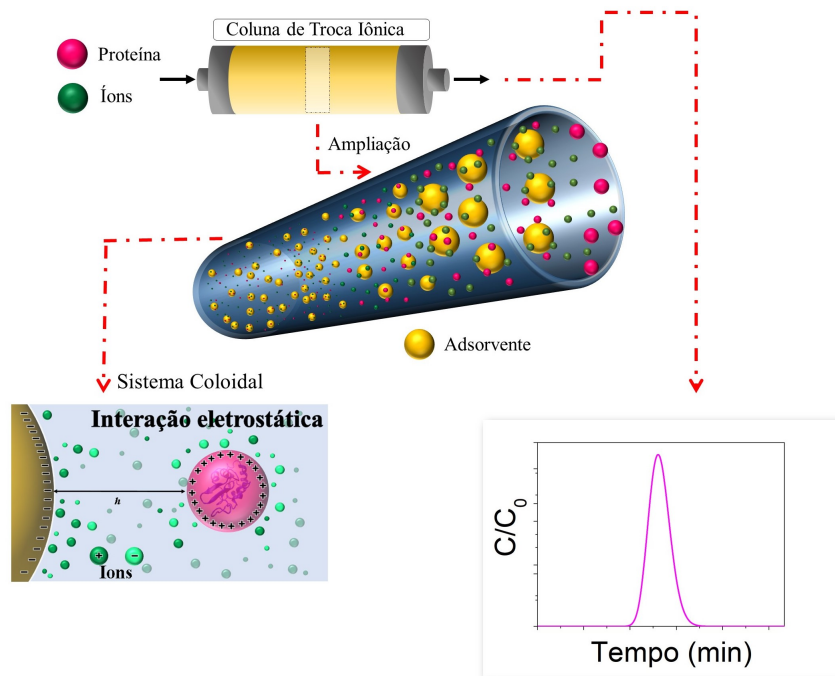


Figura 2.6: Representação esquemática do fenômeno de interação eletrotática que ocorre dentro de uma coluna de separação por troca iônica. Por conta deste fenômeno, a separação de proteínas torna-se função das diferentes condições da fase fluida.

O balanço de massa em leito fixo é estabelecido na literatura, assim como as técnicas matemáticas capazes de resolver as equações diferenciais parciais oriundas da física do sistema. Sabe-se que o leito fixo possui uma eficiência finita e algumas contribuições devem ser incluídas para melhor representar os perfil de eluição, como os efeitos de dispersão descritos por difusão molecular e o efeito de resistência a transferências de massa. Estes efeitos e contribuições são descritos por um conjunto de equações de derivadas parciais (EDP), das quais contém as informações dos componentes na fase fluida e na fase estacionária [101]. Entretanto, para uma

correta predição dos perfis, a solução do balanço de massa dos componentes requer o conhecimento prévio das isotermas de equilíbrio.

A velocidade de um componente no leito fixo está relacionada ao modelo de isoterma de adsorção, de acordo com a equação [101]:

$$w = \frac{u}{1 + F_v \frac{dq}{dC}} \quad (2.12)$$

em que  $w$  é a velocidade na direção longitudinal,  $u$  é a velocidade efetiva do fluido,  $F_v$  é a razão entre o volume da fase estacionária com o volume da fase móvel,  $C$  é a concentração do componente e  $q$  é a concentração local do componente na superfície da fase estacionária, em equilíbrio com a concentração na fase móvel.

Caso o modelo de isoterma seja linear para todos os componentes (e.g.,  $q(C_i) = a_i C_i$ , sendo  $a$  uma constante genérica do componente  $i$ ), o valor de  $\frac{dq}{dC}$  é constante para cada um. Logo, a velocidade para cada componente (Equação 2.12) e, conseqüentemente o tempo de permanência do componente no leito fixo, se torna independente da concentração dos componentes presentes.

A problemática surge porque as isotermas de equilíbrio nem sempre são lineares. Desta forma, as velocidades dos componentes dependem tanto da sua concentração, como da concentração de todos os componentes presentes no sistema. A resolução de tal problema é complexo, tornando de difícil predição dos perfis de eluição. Dentre os modelos que são aplicados para a descrição de isotermas em colunas de separação, o modelo de Langmuir é uma alternativa conveniente [102]. Entretanto, torna-se uma desvantagem utilizar este modelo para representar a concentração de proteína em equilíbrio com a fase sólida para ensaios em leito fixo, pois o modelo de isoterma do tipo Langmuir não é, a priori, uma função de variações no pH e força iônica.

Para correção desse impasse, Guélat et al. (2012) [7] apresenta uma forma de relacionar o parâmetro de Henry com as propriedades da fase fluida, i.e., pH e força iônica. Reporta-se por Guélat et al. [7] o comportamento multicomponente de mAbs utilizando um modelo de isoterma com base na teoria de Debye-Hückel. O trabalho apresenta um modelo de transporte de massa para troca catiônica considerando efeitos de dispersão axial e a lei da força motriz linear. Para o estudo de proteínas em leito fixo, Guélat inclui o termo atrativo de Hamaker no PMF (proteína—adsorvente), porém negligencia efeitos de dispersão iônica (íons—superfícies). Apesar de reportar uma boa correlação na modelagem dos perfis de eluição multicomponente de mAbs, realiza-se a estimativa das densidades de carga das proteínas e é reportado um modelo com base na aproximação de Debye-Hückel.

Kumar et al. (2021) [102] desenvolve um modelo para o cálculo da isoterma de equilíbrio, igualmente com base na teoria de Debye-Hückel, para a adsorção de

lisozima e de anticorpos monoclonais em diferentes colunas de troca catiônica. Como hipótese, impõem-se que as proteínas estão uniformemente distribuídas de forma hexagonal na superfície do adsorvente. Para atingir uma boa correlação entre o perfil modelado com os dados experimentais, foi necessário a estimação do parâmetro de equilíbrio e de um parâmetro relativo à interação proteína—proteína. Os modelos descritos por Kumar et al. [102] e Guélat et al. [7] apresentam simplificações matemáticas e estimação de parâmetros, para obtenção de um modelo analítico capaz de descrever isotermas com base na teoria de Debye-Hückel. Tem-se como objetivo por essa prática, facilitar o cômputo do balanço de massa no leito fixo.

Diferente da abordagem de Debye-Hückel, assumir que o potencial químico apresenta outros efeitos que não são de carácter puramente eletrostático, implica que a PBE não apresenta uma solução analítica. A PBE é uma equação diferencial parcial de segunda ordem, podendo ser resolvida por diferentes formas. Alijó et al. [18] apresenta uma solução para esta equação em coordenadas cartesianas, por meio de uma abordagem algébrico-diferencial através do integrador DASSL. Um distinto método de resolução é proposto por Carnie et al. [103] e Stankovich et al. [104], em que apresentam o uso de coordenadas biesféricas para a representação da interação entre esfera—esfera, ou esfera—plano. O uso deste diferente tipo de coordenadas mostra uma série de vantagens no estudo de coloides:

- (1) Independente do método de divisão de domínios, utilizado para a discretização espacial do sistema, é garantido uma boa convergência com o uso de poucos pontos de colocação interno;
- (2) Na transferência das coordenadas biesféricas para coordenadas cartesianas, verifica-se uma maior quantidade de informações a respeito do potencial eletrostático na região entre as superfícies;
- (3) Por fim, obtendo-se o potencial eletrostático, a força de interação é calculada a partir do tensor tensão de Maxwell.

O trabalho pioneiro de Carnie e Stankovich possibilitou a Lima et al. [19] aplicar esse sistema, levando em consideração os efeitos de dispersão iônica. É reportado no trabalho de Lima et al. [19] a solução da PBE em coordenadas biesféricas utilizando a divisão de domínios em volumes finitos e os efeitos de dispersão de acordo com a teoria de Lifshitz, apresentado por Tavares et al. [96]. Tem-se com isso uma boa predição do  $B_{22}$  para lisozima até 0.5 M para NaCl, em comparação com dados experimentais disponibilizados na literatura (conforme reportado no material suplementar de Lima et al. (2007) [20]). Em adição, pode-se salientar que a carga da lisozima foi calculada com base nos aminoácidos presentes em sua superfície e regulada conforme o pH na interface, para uma análise auto-consistente.

É importante salientar que a modelagem do parâmetro de Henry usando a solução da PBE em coordenadas esféricas, modificado de acordo com a teoria de Lifshitz, é uma lacuna presente na literatura. Entretanto, quanto mais robusto o modelo que representa os fenômenos em mesoescala, i.e., maior acurácia e generalização dos fenômenos interfaciais, maior é a complexidade para o acoplamento no balanço de massa.

A literatura é escassa em apresentar diferentes formas de contornar esse problema para separação de proteínas. Contudo, a técnica de reconhecimento de padrões pelo uso do aprendizado de máquinas tem emergido recentemente na literatura para o ramo da adsorção e áreas correlacionadas. Pode-se resumir o termo de *aprendizado de máquina* como um algoritmo capaz de tomar decisões, sem ser necessariamente imposto um caminho pelo programador, sendo sua construção com base em um conjunto prévio de dados. Portanto, este tipo de técnica apresenta um grande potencial em definir correlações entre propriedades mensuráveis na escala macroscópicas com propriedades microscópicas [105].

É bastante diversificado as variáveis utilizadas no treinamento de modelos com base no aprendizado de máquinas. Para a compreensão da origem da interação proteína—adsorvente, reporta-se a associação de propriedades estruturais, e informações do PDB, com a concentração de proteína adsorvida [106–108]. Ouassil et al. [109] aponta a construção de um algoritmo, utilizando o conceito de árvore de decisão (*Random Forest Classifier*), capaz de compreender como diferentes proteínas interagem na interface de nanotubos de carbono. O algoritmo mostrou possuir um bom carácter preditivo e apontou que a interação com a superfície de carbono é favorecida em proteínas flexíveis que apresentam uma grande quantidade de grupos glicina e frações de aminoácidos que não estão associados as estruturas secundárias.

Kwaria et al. [107] utiliza o aprendizado de máquina no estudo da adsorção de fibrinogênio em partículas de ouro funcionalizadas com complexas cadeias poliméricas. Realizou-se primeiramente a construção do algoritmo por diferentes técnicas, como: regressão linear, máquina de vetores de suporte (*support-vector machine*), processo Gaussiano e redes neurais artificiais (ANN, do inglês: *Artificial Neural Network*). Dentre estes, reporta-se que o ANN apresentou melhor acurácia, predição e reprodutibilidade com apenas uma única camada interna. Portanto, permitiu-se com isso a correlação entre a capacidade de adsorção da proteína (propriedade macroscópica) com propriedades obtidos por ferramentas analíticas, tais como a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia por raio-X (XPS).

Diante do exposto, modelos treinados por técnicas de identificação de padrões tornam-se uma poderosa ferramenta para compreensão dos fundamentos da adsorção. Entretanto, visando uma aplicação industrial, é necessária a adição de

variáveis de processo no treinamento do modelo. Schio et al. (2021) [12] reportaram dados experimentais de curvas de ruptura de corante vermelho (Red-40) em leito fixo, tendo espuma de poliuretano impregnadas com quitosana como fase estacionária. O treinamento por ANN foi realizado com sucesso, utilizando as variáveis tempo, vazão e comprimento do leito para predição da capacidade de adsorção do leito. Tal resultado indica que condições operacionais podem ser utilizadas como variáveis de treinamento.

Na Tabela 2.1 tem-se as diferentes aplicações do treinamento de modelos por ANN. Reporta-se ensaios mono/multicomponentes, apresentando bons desempenhos indiferentemente da natureza do adsorvato ou do adsorvente. Como é observado, além das condições da fase fluida, o emprego das propriedades texturais do adsorvente são utilizadas como variáveis de entrada.

Tabela 2.1: Sistemas em que se utilizou de uma rede neuronal artificial para o treinamento de modelos aplicados na predição da capacidade adsorvativa em junção das diferentes variáveis de entrada utilizadas para o treinamento do modelo.

Adsorvente	Adsorvato	Variáveis aplicadas no treinamento	Fonte
10 diferentes tipos	In(III)	Área superficial; Ponto de carga zero; Tempo; Dosagem	[10] <sup>a</sup>
Zeólitas	Ag <sup>+</sup> ; Co <sup>2+</sup> ; Cu <sup>2+</sup>	Temperatura; Razão Si/Al; Concentração inicial e o peso molecular dos íons	[13, 14] <sup>a,*</sup>
Materiais à base de quitosana	Corantes	Concentração molar inicial; Tempo; Porosidade; Porcentagem de carbono no adsorvente	[11] <sup>b</sup>
Carvão ativado	Nimesulida; Paracetamol	Diâmetro do adsorvente; Dosagem; Tempo; Concentração inicial	[15] <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ensaio monocomponente;

<sup>b</sup> Ensaio multicomponente;

\* Em [14], reporta-se o valor da capacidade de adsorção no equilíbrio; Para [13], teve-se como objetivo a predição dos parâmetros de isothermas (Langmuir e Sips).

Para a análise em macroescala do comportamento de proteínas em leito fixo, propõem-se a construção de um modelo substituto que possua como variável de saída o parâmetro de isoterma. O modelo substituto<sup>1</sup> é então utilizado no balanço de massa para análise dos perfis de eluição e transferência de massa em colunas de troca iônica. Para diferentes condições da fase fluida, será calculado um parâmetro de isoterma que é utilizado para o cômputo da capacidade de adsorção. Logo, torna-se necessário que o modelo substituto treinado por ANN consiga ser sensível

<sup>1</sup>Nesta tese, se define como modelo substituto o modelo obtido após o treinamento por técnicas de identificação de padrões.

às mudanças de pH, força iônica, temperatura e o tipo de eletrólitos que afetam o sistema.

Diante do exposto, a literatura apresenta diferentes abordagens para correlacionar dados experimentais com a capacidade de adsorção no equilíbrio. Contudo, a literatura é desprovida em abordagens relacionadas ao treinamento de modelos substitutos utilizando o parâmetro de Henry proveniente de um modelo do tipo PBE em coordenadas esféricas. Tal correlação permite uma integração das propriedades calculadas ao balanço de massa na coluna cromatográfica. Certamente, esta escassez é devido ao esforço computacional necessário. Logo, a aplicação de um modelo substituto como ANN é uma alternativa promissora.

# Capítulo 3

## Modelos matemáticos

### 3.1 Equação de Poisson-Boltzmann Modificada

Considerando-se a presença de eletrólito simétrico (1:1) no meio, a equação de Poisson-Boltzmann (Equação B.4) é modificada pela inclusão de um termo não eletrostático no potencial químico, Equação 2.11. Esse termo leva em consideração as contribuições de dispersão de íons na superfície:

$$\nabla^2\psi = \frac{1}{2}[\exp(\psi - U_-) - \exp(-\psi - U_+)] \quad (3.1)$$

em que  $U_{\pm}$  é o potencial de dispersão iônico entre os íons—superfícies e  $\psi = \frac{e\phi}{\kappa_B T}$  (potencial eletrostático adimensional), sendo:  $e$  carga elementar do elétron,  $\phi$  o potencial eletrostático,  $\kappa_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura do sistema.

Para a modelagem de proteínas, aplicam-se as seguintes hipóteses:

- (1) Anticorpos monoclonais são apresentados como sinônimos de macropartícula;
- (2) As macropartículas são descritas como esferas rígidas;
- (3) A quantidade de grupos ionizados na superfície será o fator determinante da carga total. Assume-se que estes grupos estão distribuídos homogeneamente na superfície;
- (4) Com foco em processos adsorptivos, o adsorvente possui tamanho muito maior (em ordem de grandeza) que a macropartícula. Logo, o adsorvente é aproximado como uma placa plana carregada.



Nota-se na Figura 3.1 a forma esquemática das hipóteses aplicadas e as contribuições que são calculadas em cada interação com superfícies.

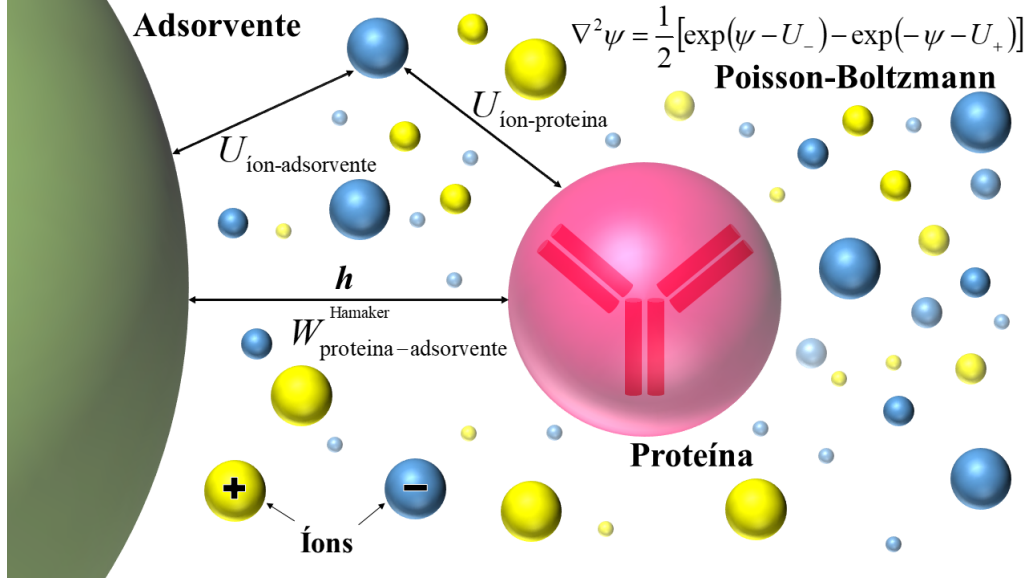


Figura 3.1: Representação das forças que regem a interação entre uma proteína e uma superfície carregada em um meio contendo íons como esferas rígidas de mesmo tamanho [110].

Tanto o potencial de Hamaker como o potencial da dispersão iônica dependem do sistema de coordenadas adotado. Para o potencial de dispersão, as seguintes contribuições devem ser aplicadas [17, 18, 20, 99]:

$$U_{\pm} = \frac{-B_{\pm P} r_{ion}^3}{(r_1 - r_p)^3 \left[ 1 + \frac{(r_1 - r_p)^3}{2r_p^3} \right]} + \frac{-B_{\pm S} r_{ion}^3}{r_2^3} \quad (3.2)$$

em que,  $r_{ion}$  é o raio do íon;  $r_1$  é a distância entre o centro da macropartícula e o íon e  $r_2$  representa a distância da superfície do adsorvente e do íon;  $r_p$  representa o raio hidrodinâmico da macropartícula, o  $B_{\pm P}$  e o  $B_{\pm S}$  são, respectivamente, a constante de dispersão adimensional íon-proteína e íon-adsorvente.

O primeiro termo da Equação 3.2 é referente à contribuição de dispersão entre íon—proteína; enquanto que o segundo termo é referente ao termo íon—adsorvente, devido a correlação com uma placa plana.

Assumir igualdade entre as constantes de dispersão, i.e.,  $B_{\pm P}$  e  $B_{\pm S}$ , implica supor que os seguintes parâmetros são similares entre o adsorvente e a proteína: constante dielétrica, energia de ionização e índice de refração. Entretanto, devido à carência destes dados para diferentes tipos de adsorvente, este trabalho segue o mesmo critério relatado por Lima et al. [20] para um sistema envolvendo duas partículas coloidais:

$B_{+P} = B_{+S} = B_+$  para a constante de dispersão de catiônica e  $B_{-P} = B_{-S} = B_-$  para a constante de dispersão aniônica.

O parâmetro  $B_{\pm}$  é obtido a partir da teoria Lifshitz, conforme apresentado por Tavares et al. [96]:

$$\frac{B_{\pm,i}}{\kappa_B T} = \frac{\alpha_i(0)}{4\epsilon_s(0)} \left( \frac{\epsilon_m(0) - \epsilon_s(0)}{\epsilon_m(0) + \epsilon_s(0)} \right) + \frac{\hbar}{4\pi\kappa_B T} \int_{v_{min}}^{\infty} \frac{\alpha_i(v)}{\epsilon_s(v)} \left( \frac{\epsilon_m(v) - \epsilon_s(v)}{\epsilon_m(v) + \epsilon_s(v)} \right) dv \quad (3.3)$$

em que o índice  $i$  refere-se que ao tipo de íon (e.g.  $\text{Na}^+$ , ou  $\text{Cl}$ ); o índice  $\pm$  indica que a equação pode ser aplicada tanto para o cálculo de interação entre cátion—superfície (+) ou ânion—superfície (-).  $\epsilon_m(0)$  e  $\epsilon_m(v)$  são as constantes dielétricas da macropartícula nas frequências 0 e  $v$ , respectivamente. Tem-se que  $v_{min} = \frac{2\pi\kappa_B T}{\hbar}$ , representa o primeiro termo não nulo de frequência, sendo resultado pelas forças de London por flutuação térmica (em que  $\hbar$  é a constante de Planck).  $\epsilon_s(0)$  e  $\epsilon_s(v)$  representam a estática constante dielétrica do solvente e a constante dielétrica na frequência  $v$ .

O primeiro termo da Equação 3.3 representa as contribuições das energias de Keesom e Debye, enquanto o segundo termo inclui a contribuição de London [99]. A polarizabilidade do íon  $\alpha$ , a constante dielétrica da macropartícula  $\epsilon_m$  e do meio  $\epsilon_s$  são funções da frequência  $v$  e descritos por um modelo de oscilação harmônica [96]:

$$\alpha(v) = \frac{\alpha(0)}{1 + (v/v^I)^2} \quad (3.4)$$

$$\epsilon(v) = 1 + \frac{n^2 + 1}{1 + (v/v^I)^2} \quad (3.5)$$

Apesar de parecer complexa, a Equação 3.3 é de fácil resolução, sendo solucionada em conjunto com as Equações 3.4 e 3.5. Estabelecendo como obter o valor do potencial de dispersão iônica, tem-se como próximo passo a escolha do sistemas de coordenadas.

Inicia-se a descrição de coordenadas bisféricas pela apresentação do operador Laplaciano  $(\eta, \theta)$ . Conforme apresentado por Moon e Spencer [111], tem-se que:

$$\nabla^2 \psi = \frac{\cosh \eta - \cos \theta}{\beta^2 \sin \theta} \left[ \frac{\partial}{\partial \theta} \left( \frac{\sin \theta}{\cosh \eta - \cos \theta} \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \right) + \sin \theta \frac{\partial}{\partial \eta} \left( \frac{1}{\cosh \eta - \cos \theta} \right) \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \right] \quad (3.6)$$

sendo  $\beta = \kappa h \sinh(\eta_0)$ , para  $\kappa = \sqrt{\left( \frac{2c_0 z^2 e^2}{\epsilon \epsilon_0 \kappa_B T} \right)}$ , denominado como comprimento de Debye; redefinimos  $h$  como a distância entre a superfície da macropartícula e do

adsorvente;  $\eta_0$  está relacionado com a coordenada inicial do raio da macropartícula.

As condições de contorno aplicadas em  $\eta$ :

$$\begin{aligned}\left(\frac{\partial\psi}{\partial\eta}\right)_{\eta=0} &= -\frac{\sigma_2}{\epsilon\epsilon_0} \frac{\beta}{\cosh(\eta_0) - \cos(\theta)} \\ \left(\frac{\partial\psi}{\partial\eta}\right)_{\eta=\eta_0} &= -\frac{\sigma_1}{\epsilon\epsilon_0} \frac{\beta}{\cosh(\eta_0) - \cos(\theta)}\end{aligned}\quad (3.7)$$

Para  $\theta$ , as condições de contorno são:

$$\left(\frac{\partial\psi}{\partial\theta}\right)_{\theta=0} = \left(\frac{\partial\psi}{\partial\theta}\right)_{\theta=\pi} = 0 \quad (3.8)$$

em que  $\epsilon$  é a constante dielétrica do meio,  $\epsilon_0$  é a permissividade do vácuo ( $8.854 \cdot 10^{-12}$  F m<sup>-1</sup>);  $\sigma_1$  e  $\sigma_2$ , são, respectivamente, a densidade de carga superficial da proteína e do adsorvente. A densidade de carga superficial é obtida de acordo com o somatório da carga dos grupos ionizáveis na superfície da macropartícula, ou do adsorvente, conforme:

$$\sigma(pH, I) = \sum \sigma_+ + \sum \sigma_- \quad (3.9)$$

em que  $\sigma_+$  é a contribuição dos grupos positivos e  $\sigma_-$  dos negativos.

Vale ressaltar que é aplicada aqui a hipótese que todos os grupos ionizáveis estão na superfície e em contato com o solvente. Desta forma, de acordo com variações das propriedades da fase fluida no equilíbrio, a carga total é regulada devido à associação/dissociação dos íons nos grupos iônicos.

## 3.2 Cálculo do PMF e do parâmetro de adsorção

Conforme apresentado anteriormente, o potencial de campo médio ( $W$ ) representa todas as contribuições a energia livre que engloba interfaces, sendo representado aqui pela soma de três contribuições: a eletrostática, o potencial de Hamaker e o potencial de esfera rígida.

Utiliza-se o potencial de Hamaker para representar a contribuição atrativa não-Coulombica. Como define-se aqui uma interação entre esfera—plano em associação a macropartícula—adsorvente, o termo atrativo é calculado de acordo com [81]:

$$W^{Ham} = \begin{cases} -\frac{H}{6} \frac{r_p}{r_p+r_H} & \text{para } h \leq r_p + r_H \\ -\frac{2H}{9} \left(\frac{r_p}{h}\right)^3 & \text{para } h > r_p + r_H \end{cases} \quad (3.10)$$

em que  $W^{Ham}$  é o potencial de Hamaker,  $r_H$  é a espessura da camada de hidratação (1.5 Å para proteínas) e  $H$  é a constante de Hamaker (magnitude em ordem de  $\kappa_B T$ ).

Em teoria,  $W^{PB}$  pode ser obtido utilizando uma expressão que envolva o volume e a integral do potencial de superfície. Entretanto, Stankovich et al. [104] aponta a presença de divergências numéricas por esta abordagem em coordenadas biesféricas, devido a integral do volume resultar em valores infinitos de energia (para o caso da interação entre esfera—plano).

Sabe-se que a força de interação é obtida de acordo com o tensor tensão de Maxwell, conforme descrito em coordenadas biesféricas  $(\eta, \theta)$  por Carnie et al. [103]:

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

Para uma melhor acurácia, o cômputo da força é realizado na superfície em  $\eta = \frac{\eta_0}{2}$  [104]. Uma forma eficiente de obter  $W^{PB}$  é reportado por Stankovich et al. [104] pela integral da força de interação entre as superfícies nas coordenadas  $(\eta, \theta)$ :

$$\frac{W^{PB}(\kappa h)}{\kappa_B T} = -\epsilon \epsilon_0 \left( \frac{\kappa_B T}{e^2} \right) \int_\infty^{\kappa h} f(h) dh \quad (3.11)$$

A relação entre  $\kappa h$  e  $\eta_0$  é dado por:

$$\begin{aligned} \frac{\beta}{\sinh(\eta_0)} &= \kappa r_p \\ \frac{\beta}{\tanh(\eta_0)} &= \kappa (r_p + h) \end{aligned} \quad (3.12)$$

Portanto, o potencial total de campo médio entre proteína—adsorvente:

$$W = W^{Ham} + W^{PB} + W^{hs} \quad (3.13)$$

em que,  $W^{hs}$  a contribuição de esferas rígidas:  $W^{hs} = \infty$  se  $h < 0$  e  $W^{hs} = 0$  para  $h \geq 0$ .

Apresenta-se por Ståhlber et al. [90] uma relação entre o PMF e a constante de retenção de proteínas. Devido à relação entre a constante de retenção com o parâmetro de afinidade, uma adaptação é realizada pela literatura para o cômputo de  $K$  [7, 56]:

$$K = \int_0^\infty \left[ \exp\left(-\frac{W(I, pH, h)}{\kappa_B T}\right) - 1 \right] dh \quad (3.14)$$

em que  $K$  é o parâmetro de Henry ( $m^3/m^2$ ).

Para ser utilizado no modelo de isoterma, é necessário tornar adimensional o parâmetro de Henry. Utiliza-se a seguinte equação [7]:

$$K^* = \frac{K(pH, I) \cdot A_s}{(1 - F_v)} \quad (3.15)$$

em que  $A_s$  é a área superficial acessível à macropartícula por unidade de volume empacotado ( $m^2/m^3$ );  $F_v$  é a razão de volumes (volume de fluido e volume total do sistema).

Assume-se aqui que a proteína é adsorvida na superfície do adsorvente, formando uma monocamada conforme descrita pela equação de Langmuir. Logo, a isoterma pode ser escrita da seguinte forma [7]:

$$q^{eq} = \frac{K^*(pH, I) \cdot C^*}{1 + \frac{K^*(pH, I) \cdot C^*}{q^{sat}}} \quad (3.16)$$

em que  $q^{eq}$  é a concentração na fase adsorvida (unidades de  $mg\ mL^{-1}$ ) em equilíbrio com a concentração de proteína na fase líquida ( $C^*$ ,  $mg\ mL^{-1}$ ),  $q^{sat}$  é a capacidade de saturação aparente ( $mg/mL_{sólido}$ ) da proteína.

Para multicomponente:

$$q_i^{eq} = \frac{K_i^* \cdot C_i^*}{1 + \frac{\sum_i^n (K_i^* \cdot C_i^*)}{q^{sat}}} \quad (3.17)$$

em que  $q_i^{eq}$  representa o valor de  $q^{eq}$  para uma dada proteína  $i$ , sendo  $n$  o número total de proteínas no sistema.

### 3.3 Balanço de massa por componente em leito fixo

Aplica-se, neste trabalho um modelo matemático para o balanço de massa em um leito fixo previamente utilizado por Severo [22]. A equação de balanço de massa adimensional é descrita como segue:

$$\frac{\partial C}{\partial \tau} + \frac{1 - \omega_T}{\omega_T} \frac{\partial q}{\partial \tau} + \frac{\partial C}{\partial z} = \frac{1}{Pe} \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (3.18)$$

em que  $C$  é a concentração adimensional de proteína na fase móvel,  $q$  é a quantidade adsorvida de proteína na fase sólida,  $\omega_T$  é a porosidade total da coluna,  $z$  é a coordenada axial da coluna ( $0 \leq z \leq 1$ );  $\tau$  é o tempo adimensional, obtido por:  $\tau = \frac{t \cdot u}{L}$ , sendo  $L$  o comprimento total da coluna,  $t$  é o tempo; e  $u$  a velocidade efetiva do fluido  $\left(u = \frac{v}{\omega_T}\right)$ , em que  $v$  é a velocidade superficial do fluido.

O número de Peclet é calculado conforme:

$$Pe = \frac{L \cdot u}{D_{ax}} \quad (3.19)$$

em que  $D_{ax}$  é o coeficiente de dispersão axial.

As condições iniciais e de contorno, adimensionadas, são:

$$\tau = 0, C(z, 0) = 0, q(z, 0) = 0 \quad (3.20)$$

Contorno 1:

$$z = 0, -\frac{1}{Pe} \frac{\partial C}{\partial z} \Big|_{z=0} + C \Big|_{z=0} = C_s(\tau) \quad (3.21)$$

Contorno 2:

$$z = 1, \frac{\partial C}{\partial z} \Big|_{z=1} = 0 \quad (3.22)$$

em que  $C_s$  é a concentração adimensional da proteína na fase estacionária. O transporte de massa na fase sólida é modelado considerando-se uma representação LDF (*Linear Driving Force*):

$$\frac{\partial q(z, \tau)}{\partial \tau} = \frac{k_m L}{u} [q^{eq}(z, \tau) - q(z, \tau)] \quad (3.23)$$

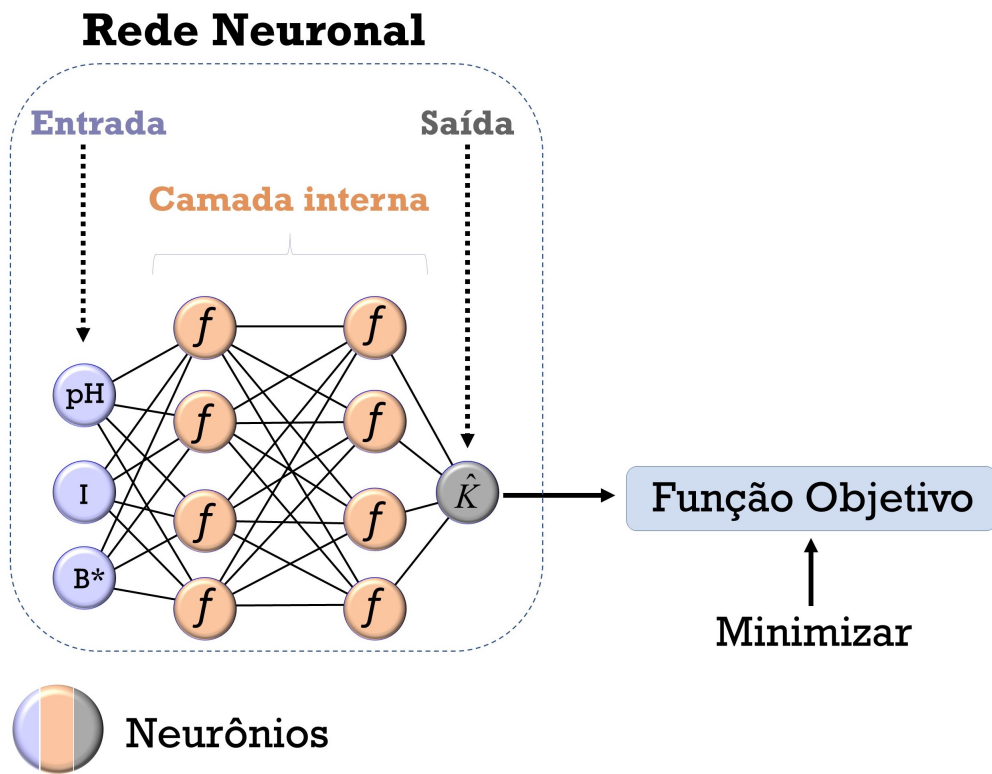
em que  $q_i^{eq}$  é o valor de equilíbrio da proteína, descrito pela Equação 3.16; e  $k_m$  é o coeficiente de transferência de massa em  $\text{min}^{-1}$ .

Para a resolução das equações algébrico-diferenciais (Equações 3.18 - 3.23, foram realizadas aproximações parabólicas em elementos finitos para a discretização na coordenada axial e integração no tempo usando o método BDF (*Backward Differentiation Formula*) [22].

A função que descreve o comportamento de  $q^{eq}$ , em relação às propriedades termodinâmicas do sistema, é de extrema importância para uma correta análise do comportamento da frente de massa da proteína. Neste trabalho será usado o modelo de Langmuir com o parâmetro  $K$  calculado via PBE<sub>m</sub> (Equação 3.16).

### 3.4 Geração do modelo substituto

Como alternativa, propõe-se aqui a aplicação de um modelo empírico obtido com base no treinamento de uma rede neuronal artificial a partir dos dados gerados pelo modelo detalhado descrito na seção 3.2. O modelo deve utilizar como variáveis de entrada as propriedades da fase fluida (i.e., pH, força iônica e o parâmetro de Lifshitz), e como variável de saída o valor de  $K$  (Figura 3.2). Logo, o modelo treinado é utilizado como ferramenta para informar o valor de  $K$  em substituição as etapas de resolução da PBEm.



\* Parâmetro de Lifshitz

Figura 3.2: Representação do processo de construção de rede neuronal para treinamento de um modelo empírico.

Caso a rede neuronal abstenha-se de camadas internas e apresente uma função de ativação do tipo linear na camada de saída, o treinamento do modelo resume-se em um método de regressão linear:

$$y = f \left( \sum_{i=1} w_i x_i + b \right) \quad (3.24)$$

em que  $w$  e  $b$  são os parâmetros a serem treinados,  $x$  representa o vetor contendo as variáveis de entradas,  $y$  é a variável treinada e  $f$  representa uma função de ativação característica (e.g., linear:  $f(c) = c$ ).



Para melhor eficácia do treinamento do modelo empírico, torna-se necessário a inclusão de  $m$  camadas internas da rede. Cada camada interna apresenta valores para os parâmetros  $w$  e  $b$  que devem ser estimados. Desta forma, a informação processada por cada neurônio é definida por:

$$z_j^{[k]} = \sum_{i=1}^{n_k} w_{j,i}^{[k]} a_{j,i}^{[k-1]} + b_j^{[k]}$$

para,  $a_j^{[k]} = f^{[k]}(z_j^{[k]})$  (3.25)

em que  $z_j^{[k]}$  é valor do neurônio  $j$  na camada interna  $k$ ,  $n_k$  representa a quantidade  $n$  de neurônios em  $k$ . O super-índice  $[k]$  aponta que cada camada interna poderá apresentar uma função de ativação e número  $n$  de neurônios característicos. Por fim,  $a^{[k]}$  é o valor que será transferido para a camada seguinte, após passar pela função de ativação  $f$  da respectiva camada  $k$ .

Existem diferentes funções de ativação que podem ser atribuídas às camadas internas. Aplica-se aqui as funções [112]: linear  $f(x) = x$ , exponencial  $f(x) = \exp(x)$ , ReLU, SELU e ELU. A função de ativação denominada de unidade linear retificada (ReLU), é definida por:

$$f(x) = \begin{cases} x & \text{para } x \geq 0 \\ 0 & \text{para } x < 0 \end{cases} \quad (3.26)$$

A função de ativação denominada de unidade linear exponencial escalada (SELU), é definida por:

$$f(x) = \begin{cases} \lambda x & \text{para } x > 0 \\ \lambda \alpha_1 (\exp(x) - 1) & \text{para } x \leq 0 \end{cases} \quad (3.27)$$

em que  $\lambda \approx 1.051$  e  $\alpha_1 \approx 1.673$ .

A função de ativação denominada de unidade linear exponencial (ELU), é definida por:

$$f(x) = \begin{cases} x & \text{para } x > 0 \\ \alpha_2 (\exp(x) - 1) & \text{para } x \leq 0 \end{cases} \quad (3.28)$$

em que  $\alpha_2 = 1.0$ .

A etapa de construção da rede neuronal é análoga a reportada por Viena et al. [113], em que utiliza-se o algoritmo de treinamento de redes neuronais conhecido como *back-propagation*. Logo, a taxa de aprendizado é um hiper-parâmetro que relaciona-se com a magnitude da propagação de erro reversa e o número de camadas internas representa a estrutura em que apresenta-se o algoritmo. Por último, o

número de mini-lotes é a quantidade de repartições de  $\delta$ . Dessa forma, a otimização é feita em um ciclo de sequências aleatórias para cada mini-lote. Essa abordagem evita que a otimização use de uma só vez todos os pontos pseudo-experimentais, o que poderia ocasionar em um custo na utilização da memória da máquina.

Os hiper-parâmetros (i.e., função de ativação, número de neurônios e camadas ocultas, quantidade de mini-lotes e o valor da taxa de aprendizado) podem ser obtidos pelo método de tentativa e erro, ou por um método de otimização. Detalhes sobre esse processo são apresentados na Seção 5.1.

Com a escolha dos valores dos hiper-parâmetros, o método de otimização foi construído na linguagem Python utilizando as ferramentas do *Keras/TensorFlow*. Tem-se como objetivo analisar a acurácia da predição pelo minimização do erro percentual absoluto médio:

$$l = \frac{100\%}{|\delta|} \sum_{(pH, I, B) \in \delta} \left| \frac{\hat{K} - K}{K} \right| \quad (3.29)$$

em que  $K$  é o valor pseudo-experimental calculado via PBEm (parâmetro de Henry) para o ponto  $(pH, I, B)$  escolhido pela LHS;  $\delta$  é a quantidade total do conjunto de pontos; e  $\hat{K}$  é o parâmetro calculado pela rede neuronal.

## Capítulo 4

# Cálculo do parâmetro de Henry e cômputo de isothermas de adsorção

A metodologia e os resultados obtidos nesta tese são divididos nos Capítulos 4 e 5. Para o estudo entre mAbs e adsorventes comerciais, apresenta-se aqui a metodologia para o cômputo do PMF e do parâmetro de Henry. Para o sistema envolvendo a interação entre lisozima e um adsorvente a base de sílica, a metodologia é estendida para determinação de isothermas do tipo Langmuir. Para isso, calcula-se a capacidade máxima de adsorção por um modelo de densidade de empacotamento de partículas; e é estimado o parâmetro relacionado a área superficial acessível do adsorvente. Nota-se na Figura 4.1 o diagrama da metodologia proposta aqui.

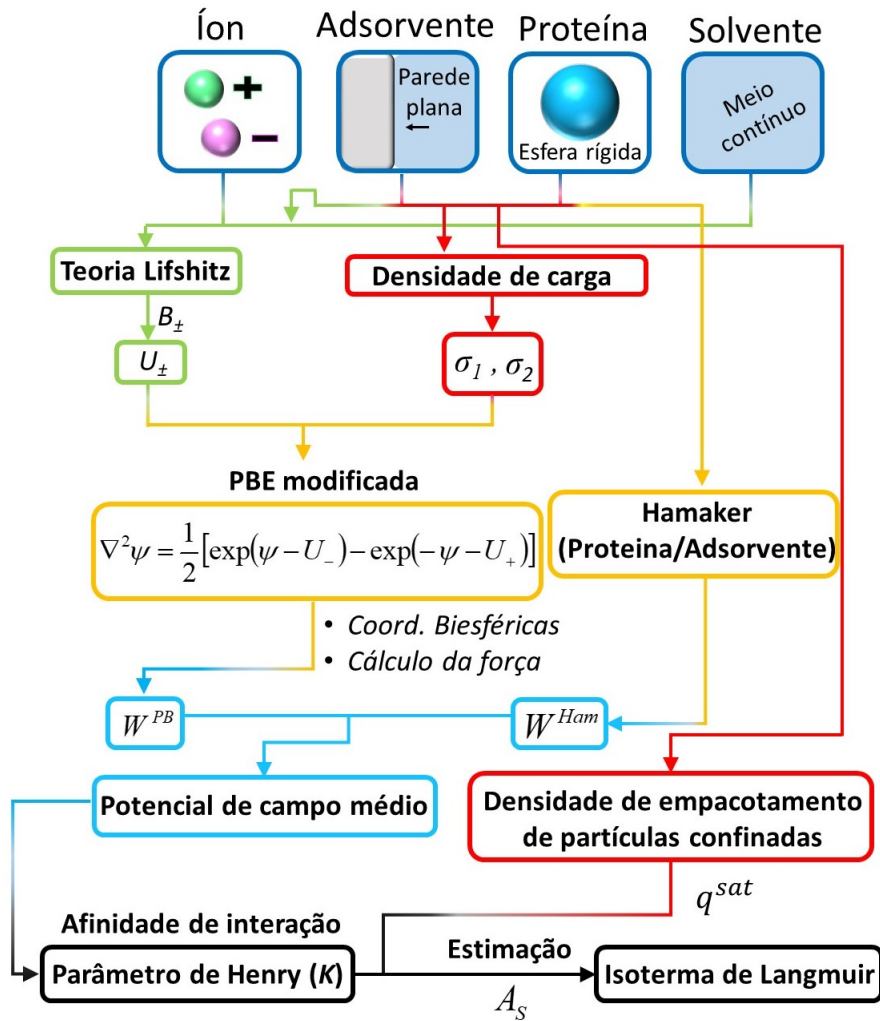


Figura 4.1: Representação esquemática dos estágios utilizados para obtenção do parâmetro de Henry e obtenção da isoterma do tipo Langmuir em função das condições da fase fluida.

## 4.1 Metodologia

### 4.1.1 Interação eletrostática entre mAbs e adsorventes comerciais

Reportam-se por Guélat et al. [56] o parâmetro de Henry para a interação entre diferentes proteínas e diferentes adsorventes comerciais em leito fixo. Nesta tese, comparam-se as curvas teóricas de  $K$ , em função da força iônica e pH, com valores de  $K$  experimentais para diferentes sistemas mAbs—adsorventes [7, 56]. O parâmetro de Henry obtido aqui provém da solução das Equações 3.1 até 3.14.

A metodologia de solução da PBE é análoga ao reportado por Lima et al. [19]. A equação de Poisson-Boltzmann é uma equação diferencial parcial de segunda ordem que é discretizada pelo método de volumes finitos. Se tem como objetivo pela discretização gerar um sistema de equações algébricas não-lineares para cada volume.

Este sistema é representado por uma matriz pentadiagonal, sendo solucionada por um procedimento iterativo. Para cada iteração, resolve-se um sistema tridiagonal pelo método de Thomas [19]. Após a convergência do procedimento, obtém-se o campo de  $\psi$  no plano formado pelas coordenadas  $\eta$  e  $\theta$ .

Para o cálculo do PMF e do parâmetro de adsorção de mAbs—adsorvente, informações adicionais às apresentadas na Seção 3.2 devem ser aplicadas. Para a Equação 3.3, supõe-se que todos os íons possuem o mesmo raio de 2 Å[20]. O valor dos índices de refração e polarizabilidade utilizados aqui é similar ao reportado por Tavares et al. [96]. Assume-se, em carácter de simplificação de cálculos, que todas as macropartículas pertencentes ao estado coloidal apresentam o mesmo valor de índice de refração ( $n = 1.6$ ) e constante dielétrica ( $\epsilon_m(0) = 2.56$ ) [96, 99]. Com isso, apresenta-se na Tabela 4.1 a solução da equação 3.3 para diferentes íons na interação íon—proteína:

Tabela 4.1: Constante de dispersão adimensional entre íon—superfície [96]

Íon	$B/(r_{ion}^3 \kappa_B T)$
Na <sup>+</sup>	0.138
K <sup>+</sup>	0.574
Sr <sup>2+</sup>	0.575
Cl <sup>-</sup>	1.086
Br <sup>-</sup>	1.348
I <sup>-</sup>	1.735

Calcula-se a densidade de carga superficial de mAbs de acordo com a quantidade de grupos amino, histidina e carboxila presentes em sua superfície [56]. Logo, a Equação 3.9 é re-escrita conforme:

$$\sigma_1(pH, I) = \sigma_{NH_3^+} + \sigma_{His^+} + \sigma_{COO^-} \quad (4.1)$$

sendo  $\sigma_{NH_3^+}$  a contribuição da densidade dos grupos amino,  $\sigma_{His^+}$  para os grupos histidina,  $\sigma_{COO^-}$  para os grupos carboxílicos e  $I$  é a força iônica. Para o adsorvente da coluna de troca iônica, a densidade de carga superficial  $\sigma_2$  está relacionada com a densidade de grupos sulfonato ligados à matriz cromatográfica.

O valor da contribuição da densidade de carga superficial de um grupo é calculado conforme Ehrl et al. [114]. Em que  $\sigma_{NH_3^+}$  e  $\sigma_{His^+}$  são obtidos de acordo com:

$$\sigma_+ = \frac{+F \Gamma_i}{1 + (K a_{i+}/c_{H^+}) + c_{anion} \gamma \cdot K s_{iCl}} \quad (4.2)$$

em que  $F$  é a constante de Faraday (96 485 C mol<sup>-1</sup>);  $\Gamma$  representa a densidade de superfície (mol m<sup>-2</sup>) dos grupos  $i$ , amino ou histidina;  $K a_{i+}$  é a constante de dissociação efetiva dos grupos ácidos (mol L<sup>-1</sup>);  $\gamma$  é o coeficiente de atividade do sal em solução, determinado por [115];  $K s_{iCl}$  é a constante de associação efetiva dos

ânions nos grupos  $i$  ( $\text{L mol}^{-1}$ );  $c_{anion}$  é a concentração do ânion ( $\text{mol L}^{-1}$ ) e  $c_{H^+}$  é referente a concentração dos íons  $\text{H}^+$ , expresso pela equação  $c_{H^+} = 10^{-pH}$ .

Para os grupos carboxila da proteína ( $\sigma_{COO^-}$ ) e para os grupos sulfonato do adsorvente ( $\sigma_2$ ):

$$\sigma_- = \frac{-F \Gamma_j}{1 + (c_{H^+}/Ka_{j-}) + c_{cation}\gamma \cdot Ks_{jNa}} \quad (4.3)$$

em que  $\Gamma$  representa aqui a densidade de superfície ( $\text{mol m}^{-2}$ ) dos grupos  $j$ , carboxila e sulfonato;  $Ka_{j-}$  é a constante de dissociação efetiva dos grupos básicos ( $\text{mol L}^{-1}$ );  $Ks_{jNa}$  é a constante de associação efetiva dos cátions nos grupos  $j$  ( $\text{L mol}^{-1}$ ) e  $c_{cation}$  é a concentração do cátion ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

Adotam-se, respectivamente, os seguintes valores de  $pKa$  para a constante de dissociação dos grupos carboxílicos, histidina, amino e sulfonados [116–118]: 4.45, 6.02, 10.69 e 1.68. A constante de associação dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Sr}^{2+}$  no grupo carboxila é de -0.26, -0.41 e 0.49 [56, 116]; e para a associação com o grupo sulfonato: 0.64, 0.85 e 2.20 [56, 118]. Para todos os ânions, o valor do  $pKa$  de associação é estabelecido como 0.20.

A densidade superficial ( $\Gamma$ ) de cada grupo amino, histidina e carboxila foi obtida pela seguinte proposta: (1) contabiliza-se a quantidade do componente amino pela quantidade de grupos lisina e arginina; (2) a quantidade de carboxila representa a soma dos aminoácidos ácido aspártico e ácido glutâmico; (3) o valor de histidinas é dado pela soma direta destes aminoácidos na estrutura; (4) assume-se que estes grupos, quando ionizados, estão na superfície em contato com o solvente. Logo, utilizam-se as informações das estruturas primárias dos mAbs reportadas por Guélat et al. [56, 119]. A densidade é então calculada ao dividir estes valores pela área superficial da proteína ( $4\pi r_p^2$ , em que  $r_p$  é o raio da proteína).

Reporta-se por Guélat et al. [56] informações para um anticorpo monoclonal genérico, sem citar as informações do PDB. Entretanto, é disponibilizado no trabalho de Guélat et al. [56] a quantidade de grupamentos aminoácidos para a respectiva mAb, o que possibilita o cálculo de densidade de cargas superficiais. O valor do raio hidrodinâmico para esse mAb e para o Trastuzumabe (145.5 kDa) é de 5 nm [7, 120]; e, para o Bevacizumabe (149.0 kDa), de 6.3 nm [121]. A Tabela 4.2 apresenta os valores de  $\Gamma$  calculados e utilizados para obtenção das densidades de carga.

As informações apresentadas anteriormente são suficientes para determinar a contribuição eletrostática no cômputo do PMF. Para a obtenção do valor de  $W(I, pH)$ , o potencial atrativo de van der Waals é calculado considerando o valor da constante de Hamaker como  $2 \kappa_B T$  [7], para a interação entre todos os mAbs e o adsorvente YMC BioPro SP; e  $5 \kappa_B T$  [96] para a interação entre todas os mAbs e o adsorvente Fractogel EMD SE HiCap. Ambos adsorventes são do tipo troca

Tabela 4.2: Densidade de superfície para diferentes mAbs e das fases estacionárias. O valor das densidades dos grupos sulfonato são reportadas por [56, 119].

Proteína	$\Gamma$ (mol m <sup>-2</sup> )		
	$\Gamma_{NH_3^+}$	$\Gamma_{His^+}$	$\Gamma_{COO^-}$
mAb	$7 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$
Bevacizumabe	$5 \cdot 10^{-7}$	$10 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-7}$
Trastuzumabe	$8 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$

Fase estacionária	$\Gamma_{SO_3^-}$ (mol m <sup>-2</sup> )
Fractogel EMD SE HiCap	$5.64 \cdot 10^{-6}$
YMC BioPro SP (10 $\mu$ m)	$1.90 \cdot 10^{-6}$
YMC BioPro SP (5 $\mu$ m)	$1.22 \cdot 10^{-6}$

catiônica [56, 119].

### Estimação da densidade de grupos para mAbs

Podemos observar na Figura 4.1 a metodologia proposta para o cálculo do parâmetro de Henry. Com as devidas informações em mesoescala, o potencial de campo médio e o parâmetro de adsorção podem ser calculados. Com a validação da rota de cálculos da meso para a macroescala, a rota reversa pode ser utilizada sem comprometer o embasamento termodinâmico do modelo. Define-se aqui como rota reversa, quando o parâmetro de Henry é reportado na literatura. Entretanto, há uma escassez nos parâmetros necessários para a resolução da PBE<sub>m</sub>; logo, é necessário uma etapa de estimação de parâmetros (Figura 4.2).

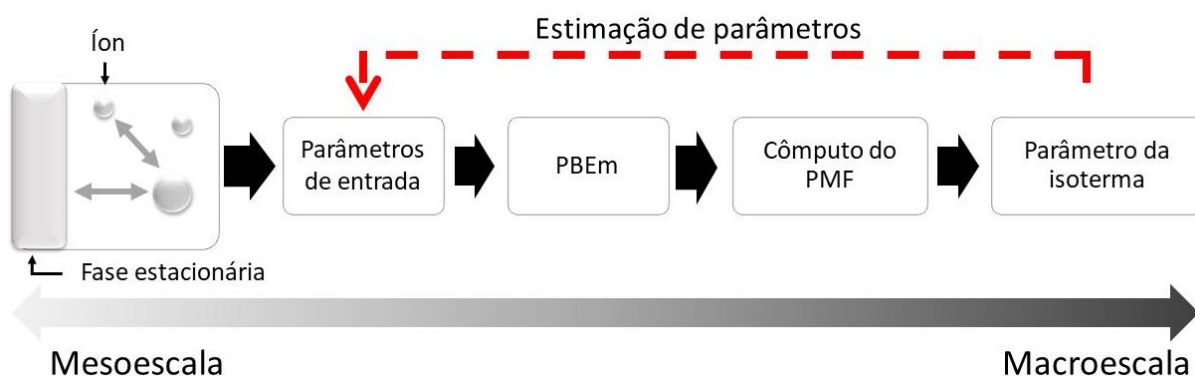


Figura 4.2: Representação da metodologia aplicada para o cálculo do parâmetro de adsorção a partir de propriedades em mesoescala. Com a validação da metodologia, a rota reversa pode ser aplicada para estimar parâmetros.

Como estudo de caso, utilizam-se os dados experimentais obtidos por Guélat et al. [7], em que é reportado o fator de retenção obtido experimentalmente de proteínas em uma coluna de troca iônica. Apesar do amplo estudo experimental, são escassas as informações em mesoescala de densidade de grupamentos iônicos

na superfície dos mAbs. Logo, torna-se necessário a metodologia de estimação de parâmetros para a devida modelagem do sistema. A proteína-alvo para a separação multicomponente é denominada de mAb P, sendo o objetivo do estudo a separação de anticorpos monoclonais que possuem pequenas variações de densidade de cargas superficiais em comparação com o mAb P.

Uma metodologia similar à proposta por Guélat et al. [7] será aplicada aqui:

- (1) Reportam-se 26 grupos histidina ( $1.374 \cdot 10^{-7}$  mol  $m^{-2}$ ) e 130 grupos amino ( $6.872 \cdot 10^{-7}$  mol  $m^{-2}$ ) para o mAb P. Logo, estima-se a densidade superficial do grupo carboxila para o cálculo da densidade total de carga superficial;
- (2) Existem 3 (três) variantes com uma menor densidade de carga superficial que o mAb P. Estas mAbs são denominadas de W1, W2 e W3; e possuem iguais densidades superficiais de grupos amino e histidina que o mAb P. Estima-se somente o grupo carboxila para cada uma delas ( $\Gamma_{COO^-}$ );
- (3) Existem 2 (duas) variantes com uma maior densidade de carga superficial que o mAb P, denominadas de S1 e S2. De forma similar, assume-se que a quantidade de grupos histidina e grupos carboxílicos são iguais aos do mAb P. Logo, a estimação ocorrerá somente na densidade superficial de grupos amino para estas mAbs ( $\Gamma_{NH_3^+}$ ).

A fase estacionária é o adsorvente YMC BioPro SP ( $10 \mu m$ ) e assume-se aqui um raio hidrodinâmico para todos os mAbs de  $5 nm$ . Por fim, a estimação é realizada por um algoritmo de otimização com base no método de enxame de partículas [122], desenvolvido na linguagem Python <sup>1</sup>. Para a estimação: 20 iterações foram realizadas (sendo 10 partículas para cada iteração no otimizador), tolerância da função objetivo de  $1 \cdot 10^{-6}$ , tolerância do passo e perturbação da derivada numérica de  $1 \cdot 10^{-10}$ , com nível de confiança estatístico de 95%. Em todos os casos, a função objetivo de mínimos quadrados ponderados foi utilizada.

---

<sup>1</sup><https://sites.google.com/eq.ufrj.br/iurisegtovich-scipy/ac-projetos>



## 4.1.2 Isotermas de adsorção de lisozima em SBA-15

Pela ausência de dados na literatura envolvendo isotermas de adsorção das proteínas nos adsorventes citados na Tabela 4.2, avalia-se aqui o comportamento da lisozima por tratar-se de uma proteína globular e rígida em uma ampla faixa de pH e força iônica [27]. Pode-se assumir ainda que a lisozima conserva sua estrutura quando adsorvida e confinada em matrizes porosas [123]. A escolha do adsorvente resume-se na seleção de um material que possua elevadas propriedades texturais e ordenação estrutural, além de estabilidade térmica e hidrotérmica. A sílica mesoporosa do tipo *Santa Barbara Amorphous* - 15 (SBA-15) apresenta tais características [124, 125], tornando-se uma boa escolha como adsorvente.

Portanto, para o estudo de extensão de escala é analisado a isoterma de adsorção proveniente da interação entre lisozima—SBA-15. Para a metodologia dessa etapa, aplicam-se os seguintes protocolos:

- (1) Utilizam-se aqui os parâmetros apresentados na Tabela 4.1 para o cálculo do potencial de dispersão entre íon—superfície;
- (2) Obtém-se a quantidade de grupos de aminoácidos na superfície da lisozima, para o cálculo da densidade de carga superficial;
- (3) Para a sílica, a quantidade de grupos silanóis responsáveis pela densidade de carga superficial do adsorvente;
- (4) A capacidade máxima ( $q^{sat}$ ) de proteína adsorvida é um parâmetro necessário para o cômputo da isoterma. Tem-se aqui que o valor de  $q^{sat}$  é obtido pela solução de uma equação que informa o valor de densidade de partículas esféricas empacotadas em ambientes confinados.

A sílica mesoporosa do tipo SBA-15 apresenta uma estrutura hexagonal com elevado grau de ordenação [124] e apresenta uma isoterma do tipo IV para nitrogênio a 77K, indicando a presença de poros cilíndricos e paralelos para materiais mesoporosos [6, 21, 126]. Portanto, assume-se que o limite da capacidade de saturação corresponde ao empacotamento máximo de partículas rígidas e esféricas em poros cilíndricos. Para o cálculo de  $q^{sat}$ , utiliza-se a seguinte equação [127, 128]:

$$q^{sat} = \frac{M_a v_p \rho_{ads}}{N_{Av} (2r_p)^3} \left\{ a_1 - a_2 \exp \left[ a_3 \left( 0.5 - \frac{r_s}{2r_p} \right) \right] + a_4 \exp \left[ a_5 \left( 0.5 - \frac{r_s}{2r_p} \right) \right] \right\} \quad (4.4)$$

em que  $r_s$  é o raio de poro do adsorvente;  $M_a$  é a massa molecular da proteína (lisozima, 14.4 kDa),  $N_{Av}$  é o número de Avogrado,  $\rho_{ads}$  é a densidade do adsorvente

e  $v_p$  é o volume de poro;  $a_1 = 1.158$ ,  $a_2 = 0.479$ ,  $a_3 = 0.621$ ,  $a_4 = 0.595$ , e  $a_5 = 4.014$  [127, 128].

Logo, o valor relativo ao parâmetro de Henry é calculado utilizando as Equações 3.1 até 3.14, com as modificações apresentadas nos itens 2 e 3. Em sequência, o parâmetro de Henry é adimensionado pela Equação 3.15. Os parâmetros obtidos de  $q^{sat}$  e  $K^*$  são então utilizados no cálculo da isoterma de adsorção do tipo Langmuir (Equação 3.16).

Para isso, é ainda necessário estimar o parâmetro relacionado à área superficial acessível do adsorvente ( $A_s$ ). Conforme apresentado pela Equação 3.15, este parâmetro é constante e está relacionado neste estudo às limitações geométricas do acesso da proteína na superfície total da sílica. Nota-se ainda que esta propriedade é indiferente do cômputo do PMF.

Para o ajuste do modelo, utilizou-se neste trabalho os dados experimentais provenientes de Nogueira [21] que reporta o comportamento de adsorção da lisozima em SBA-15. O ajuste é realizado simultaneamente para as quatro isotermas reportadas em diferentes forças iônicas no pH 10.0 a 25 °C. Por tratar-se de uma estimativa relativamente simples, pois é uma etapa realizada após o extensivo cálculo do PMF, as ferramentas do software *Origin* 8.0 são utilizados para obtenção de  $A_s$ .

É importante salientar que  $K$  depende dos valores das cargas presentes na superfície e das condições da fase fluida, tais como o valor de pH, força iônica, tipos de íons interagindo com a superfície e a temperatura do sistema. Tem-se com isso que a abordagem apresentada aqui tem como objetivo permitir que o modelo de isoterma do tipo Langmuir seja função destas condições. Por fim, apresentam-se aqui previsões do comportamento do modelo de acordo com a série de Hofmeister. A sensibilidade do modelo de adsorção é analisada para diferentes valores de pH e tipos de sais.

## Propriedades da lisozima

O raio hidrodinâmico da lisozima ( $r_p$ ) apresenta um valor médio de 2.3 nm [55]. Utilizam-se os seguintes valores dos resíduos de aminoácidos e seus respectivos pKa conforme reportado por [129]:

Tabela 4.3: Número de resíduos de aminoácidos ( $N_{res}$ ) para a lisozima e os valores correspondentes de pKa [129].

	pKa	$N_{res}$
Asp	3.5	7
Glu	4.2	2
Tyr	10.3	3
Arg	12.0	11
His	6.6	1
Lys	10.5	6
Nt	7.7	1
Ct	3.3	1

A densidade dos grupos é calculada de forma similar ao descrito para os mAbs, logo:

$$\Gamma_l = \frac{N_{res,l}}{N_{Av} 4\pi r_p^2} \quad (4.5)$$

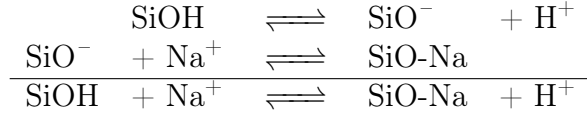
em que o índice  $l$  representa a sigla do grupo aminoácido descrito na Tab. 4.3.

Com o valor de  $\Gamma$  para cada resíduo, usa-se a Equação 4.2 para o cálculo da densidade de carga superficial dos grupos arginina (Arg), histidina (His), lisina (Lys) e do nitrogênio terminal (Nt); pela Equação 4.3 calcula-se a densidade de carga superficial dos grupos referentes ao ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), tirosina (Tyr) e do carbono terminal (Ct). O somatório das densidades de carga de todos os grupos mencionados é representativo da densidade de carga superficial da lisozima.

A literatura é escassa em relação aos valores das constantes de associação dos íons nos respectivos grupos de aminoácidos. Utilizam-se aqui os valores de  $K_{s_jNa} = 10^{-0.26}$  para a associação entre cátions e os grupos aminoácidos de natureza aniônica (Equação 4.3); e  $K_{s_iCl} = 10^{0.20}$  para a interação entre os ânions com os grupos catiônicos (Equação 4.2) [56].

## Propriedades dos grupos silanóis

Para a sílica, os seguintes reações de associação e dissociação dos grupos silanóis são consideradas [130]:



Estima-se o valor da densidade dos grupos silanóis de acordo com a soma dos grupos germinais e vicinais presentes na superfície do material [131]. A Tabela 4.4 apresenta os valores dos parâmetros característicos da SBA-15 modelada neste estudo, necessário para o cálculo do: potencial atrativo (Equação 3.10), da capacidade máxima de adsorção (Equação 4.4) e da densidade de carga superficial do adsorvente (i.e.,  $\sigma_2$  - Equação 4.3). O parâmetro  $pK_{a_{SiOH}}$  é a constante de dissociação ácido-base para o grupo silanol, obtido pela média entre os grupos germinais e vicinais.

Tabela 4.4: Parâmetros utilizados para a representação da sílica mesoporosa do tipo SBA-15.

Grupo de ligação	$\equiv$ SiOH	
$\Gamma_{SiOH}$ (mol m <sup>-2</sup> )	$1.54 \cdot 10^{-6}$	[130]
Hamaker ( $H$ )	$1.5 \kappa_B T$	[56, 132]
$pK_{a_{SiOH}}$	7.93	[133]
$pK_{s_{SiO-Na}}$	2.37	[134]
$(1-F_v)$	$2.56 \cdot 10^{-3}$	*
$v_p$ (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	2.52	[21]
$r_s$ (nm)	13.5	[21]
$\rho_{ads}$ (g cm <sup>-3</sup> )	1.95	[21]

\* Calculado de acordo com as informações disponibilizadas por Nogueira et al. (2016) [21].

O valor da constante de associação efetiva para o grupo SiO-Na foi calculado utilizando a seguinte equação:  $pK = \Delta G / (2.303RT)$ , em que  $\Delta G$  é a variação da energia livre de Gibbs para a ligação SiO-Na reportado no estudo químico-quântico por [134] para pH 10.0; e  $R$  é a constante dos gases.

Para a interação entre as superfícies envolvendo proteínas em solução, a constante de Hamaker é usualmente encontrada na faixa de  $\sim 1 - 4 \kappa_B T$  [132]. Assume-se aqui um valor médio de  $1.5 \kappa_B T$ , considerando o valor reportado por [56].

## 4.2 Resultados e Discussões

### 4.2.1 Interação eletrostática entre mAbs e adsorventes comerciais em leito fixo

A Figura 4.3 mostra os resultados de densidade de carga superficial para os anticorpos monoclonais e para os adsorventes. Os valores foram obtidos de acordo com as Equações 4.1 - 4.3, utilizando os valores de densidade de grupos na Tabela 4.2. O coeficiente de atividade do sal foi calculado de acordo a metodologia descrita por Lee et al. [115]. Podem ser observados nas Figuras 4.3(a), (b) e (c) o ponto isoelétrico dos anticorpos monoclonais, sendo: 9.73 para o mAb genérico, 10.09 para o bevacizumabe e 10.14 para o trastuzumabe. Nota-se que um aumento da força iônica desloca o valor do ponto de carga zero. Para o mAb genérico, por exemplo, foi obtido o valor de carga zero em pH 5.89 na concentração de  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$  para NaCl em  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Os resultados apresentados a seguir foram obtidos pela metodologia proposta na Seção 4.1.1. As Figuras 4.4 e 4.5 mostram a comparação entre o parâmetro de Henry, obtido ao resolver as Equações 3.1 até 3.14, e os resultados experimentais disponibilizados por Guélat et al. [56] para diferentes anticorpos monoclonais e adsorventes da colunas de troca iônica.

Nota-se pela Figura 4.4 (a) a previsão do parâmetro de Henry para a interação entre um mAb com um adsorvente comercial denominado de Fractogel EMD SE HiCap. Observa-se um perfil similar, na Figura 4.4 (b), utilizando o adsorvente comercial YMC BioProSP ( $10 \mu\text{m}$  em diâmetro).

Como é observado pela Figura 4.4, há uma diminuição na atração eletrostática entre a proteína e a fase estacionária com o aumento da força iônica. Isto ocorre devido ao acúmulo de íons dispersos nas vizinhanças de ambas as superfícies, diminuindo a carga superficial (blindagem eletrostática). Como as superfícies têm cargas opostas, os cátions contribuem para a blindagem eletrostática da fase estacionária (densidade de carga superficial negativa) e os ânions para os anticorpos monoclonais (densidade de carga superficial positiva). Como apresentado, mesmo em pHs tendendo ao pI, há interações eletrostáticas fracas devido à interação dos ânions na superfície da proteína.

Comparando-se ambos os perfis no pH 4.4, é observado que o mAb possui uma interação mais forte com a Fractogel do que com a YMC ( $10 \mu\text{m}$ ). Esse resultado está condizente com os valores reportados na Tabela 4.2, em que a quantidade de grupos sulfonato na Fractogel é superior ao dos outros adsorventes (Figura 4.3(d)). Indicando-se com isso que quantidades maiores de co-íons são necessários para diminuir a interação do sistema proteína—Fractogel.

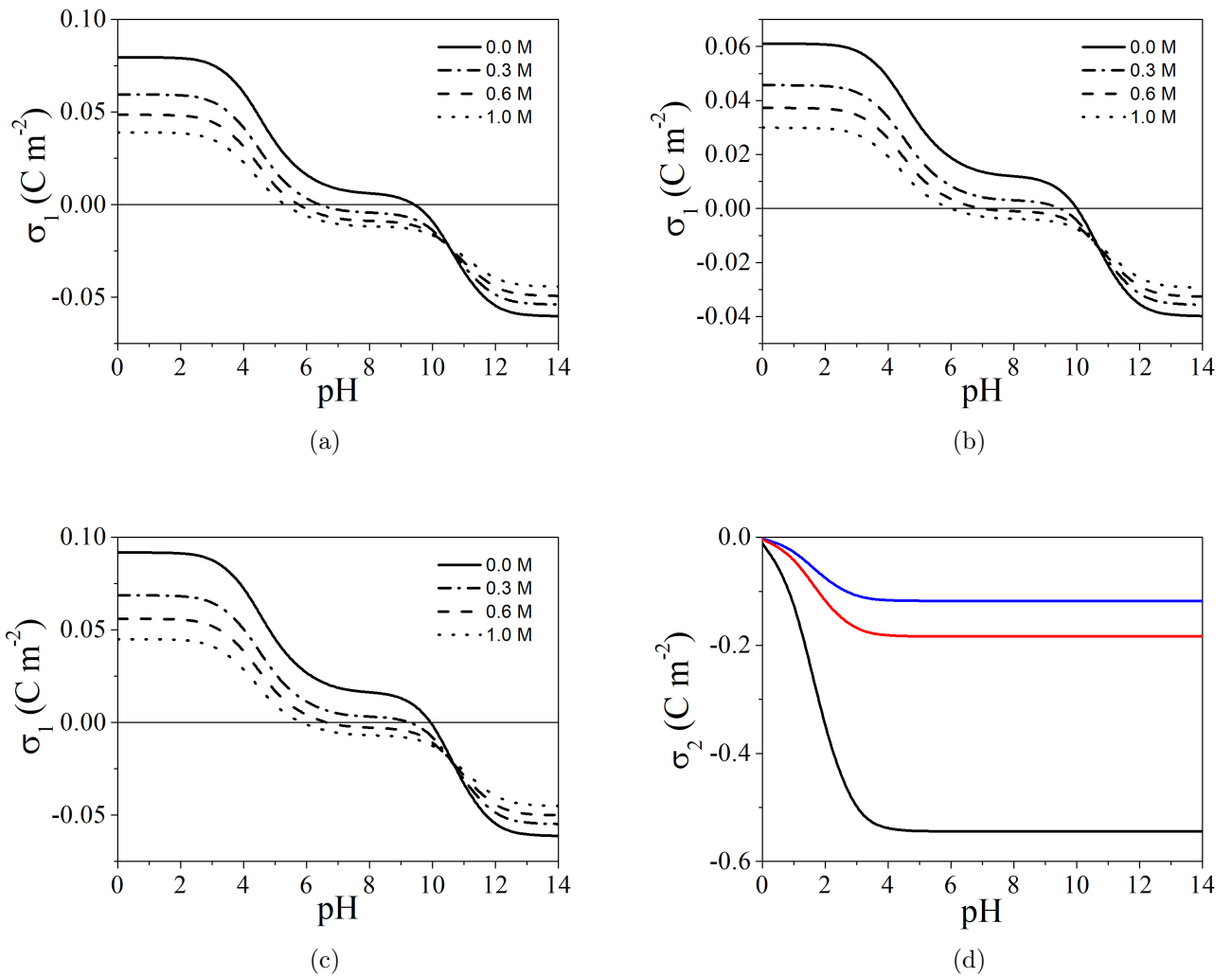
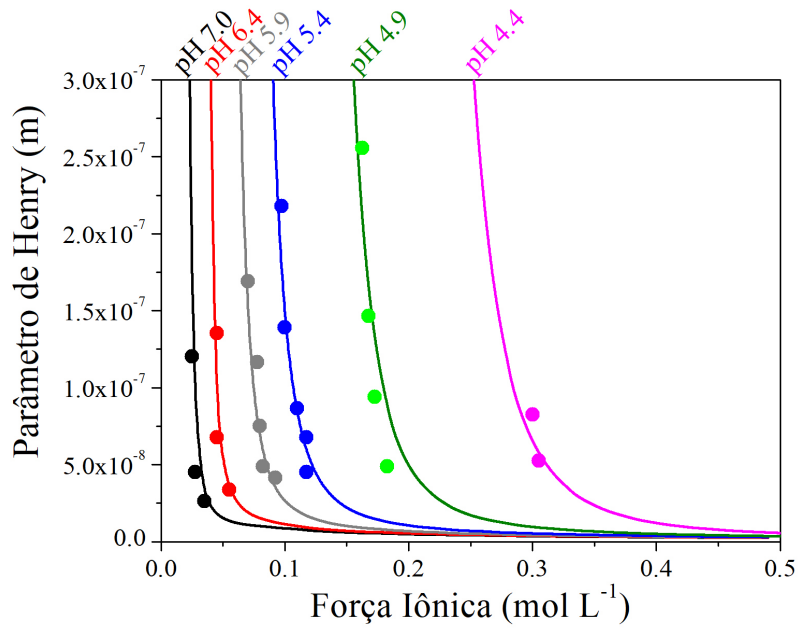
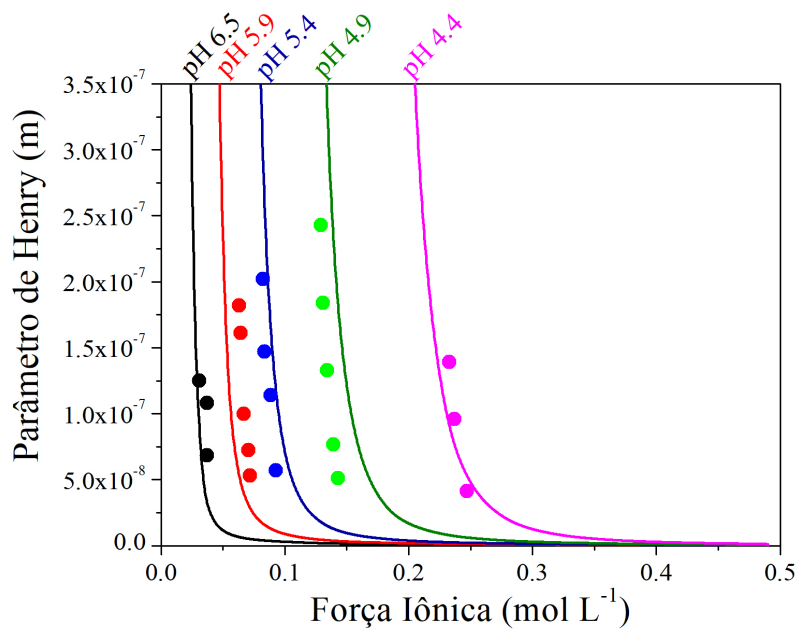


Figura 4.3: Densidade de carga superficial para diferentes mAbs e fases estacionárias.  $\sigma_1$  representa a soma total da contribuição das cargas dos aminoácidos para: um mAb genérico (a), bevacizumabe (b) e para o trastuzumabe (c) em NaCl. O parâmetro  $\sigma_2$  é a densidade de carga superficial dos adsorventes: Fractogel EMD SE HiCap (—), YMC BioPro SP (10  $\mu\text{m}$ ) (—), YMC BioPro SP (5  $\mu\text{m}$ ) (—) para uma solução sem eletrólitos em 25 °C.

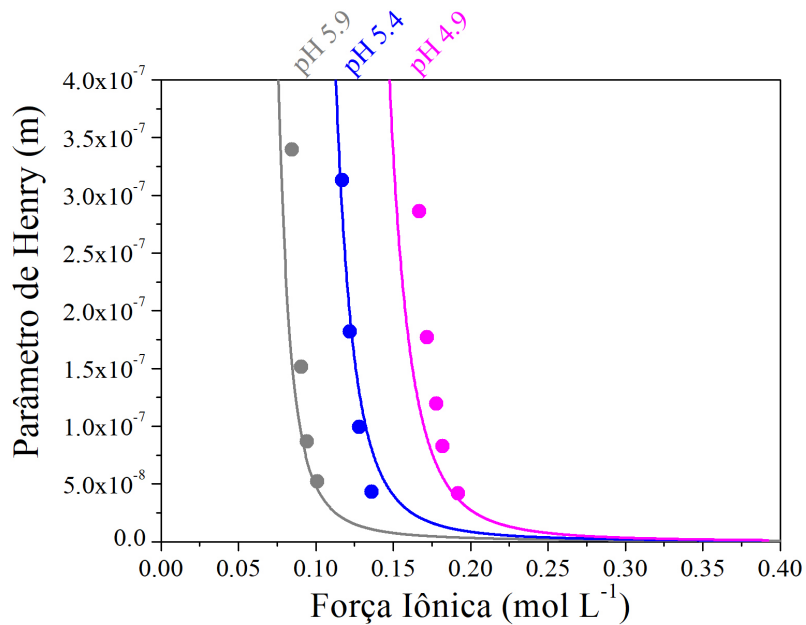


(a)

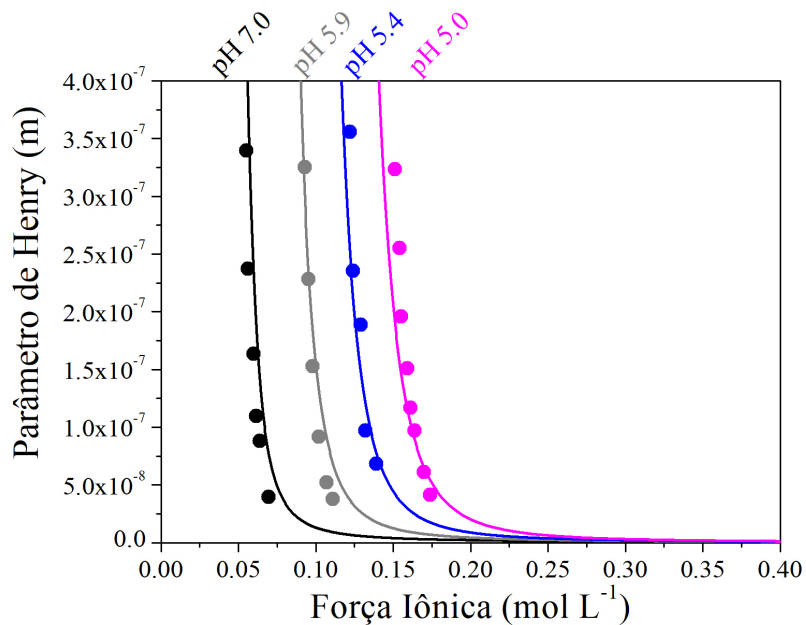


(b)

Figura 4.4: Perfis do parâmetro de Henry para a adsorção de proteínas em uma coluna de troca iônica: (a) representa a predição do perfil do mAb com (a) Fractogel EMD SE HiCap e (b) em YMC BioPro SP (10  $\mu\text{m}$ ) (adsorvente). Os perfis foram gerados sem a estimativa de parâmetros e os círculos são dados experimentais presentes na literatura [56].



(a)



(b)

Figura 4.5: Perfis do parâmetro de Henry para a adsorção de proteínas em uma coluna de troca iônica: (a) representa a predição do perfil do (a) Bevacizumabe (anticorpo monoclonal) e para (b) Trastuzumabe (anticorpo monoclonal), ambos em em YMC BioPro SP ( $5 \mu\text{m}$ ) (adsorvente). Os perfis foram gerados sem a estimação de parâmetros e os círculos são dados experimentais presentes na literatura [56, 119].



Pode-se observar também boas previsões para o Bevacizumabe (Figura 4.5 (a)) e para o Trastuzumabe (Figura 4.5 (b)), sendo estes com a fase estacionária composta por YMC BioProSP (5  $\mu\text{m}$  em diâmetro). Quanto o pH tende ao pI dos mAbs, o comportamento do parâmetro de equilíbrio apresenta decaimento acentuado em função da força iônica devido ao deslocamento do ponto de carga zero (Figura 4.3). Logo, quantidades pequenas de eletrólitos são suficientes para extinguir o potencial atrativo gerado pelo termo eletrostático.

A metodologia para o cálculo de  $K$  mostrou excelentes resultados para o cálculo do parâmetro de Henry entre anticorpos monoclonais e adsorventes comerciais estudados aqui (Figuras 4.4 e 4.5). Enfatiza-se que esses resultados são obtidos com cálculo preditivo, já que não foram incluídos parâmetros ajustados ao modelo.

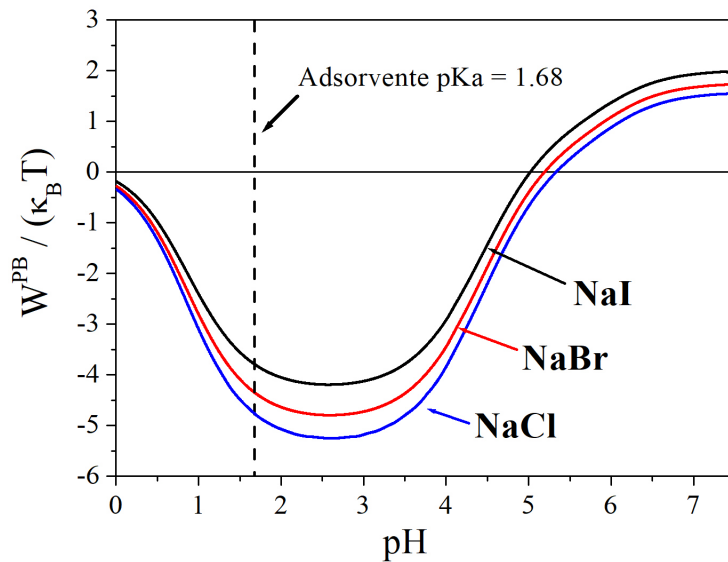
Para compreender os efeitos de especificidade iônica, avaliou-se a contribuição do potencial de dispersão (Equação 3.2) no cálculo da PBE<sub>m</sub> utilizando cinco diferentes tipos de sais: NaCl, NaBr e NaI para a análise da influência dos ânions; e NaCl, KCl e SrCl<sub>2</sub> para os cátions.

Nota-se na Figura 4.6 os resultados da contribuição eletrostática ao PMF para diferente série de cátions e ânions. Com um único propósito de facilitar a comparação dos perfis observados na Figura 4.6, foram escolhidos valores arbitrários para a força iônica e de distância de interação: 0.3 mol L<sup>-1</sup> e a distância de 1  $\kappa h$ , respectivamente.

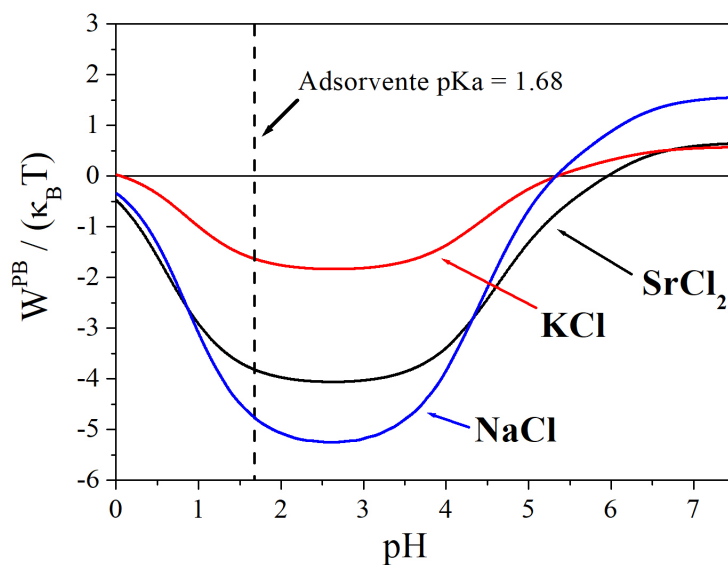
Como observado na Figura 4.6 (a), a interação entre proteína e adsorvente apresenta um comportamento diversificado em função dos tipos de ânions, mostrando deslocamento do ponto de carga neutra. Esse comportamento pode ser descrito pela interação íon—proteína na qual a série é seguida: I<sup>-</sup>  $\rightarrow$  Br<sup>-</sup>  $\rightarrow$  Cl<sup>-</sup>. Como o iodeto apresenta maior polarizabilidade (Tabela 4.1), acumula-se maior quantidade desse íon na superfície da proteína - devido aos efeitos de dispersão - em comparação com os outros íons. Faz-se com isso que a carga superficial da proteína seja menos positiva. Assim, é compreensível que a contribuição eletrostática dada pelo iodeto seja mais repulsiva (ou menos atrativa) do que para os outros ânions, uma vez que a carga do adsorvente é negativa (pH > pKa).

Os resultados para diferentes cátions são observados na Figura 4.6 (b). Como pode-se observar, os perfis para KCl e NaCl coincidem no ponto de carga neutra e apresentam diferentes intensidades do potencial de atração (valores negativos) e repulsão (valores positivos). Essa diferença de intensidade está de acordo com o íon sódio ter valor da constante de dispersão menor que o potássio (0.138 para Na<sup>+</sup> e 0.574 para K<sup>+</sup> [96]). Logo, para um mesmo valor de pH e força iônica, uma quantidade maior de íons K<sup>+</sup> se acumulam nas superfícies em comparação com Na<sup>+</sup>.

Comparando os perfis para os cátions estrôncio e potássio, ambos possuem valores similares para a constante de Hamaker entre as interações íon—proteína e íon—adsorvente. Para a obtenção de  $K$ , a diferença entre os dois íons surge por



(a)



(b)

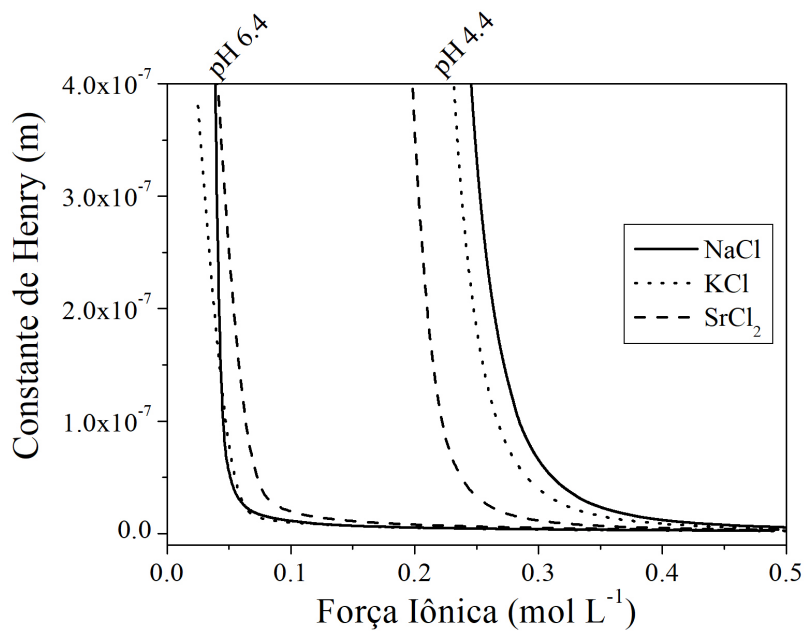
Figura 4.6: Comparação entre os potenciais de campo médio adimensionais para três diferentes tipos de (a) ânions e (b) cátions. A distância entre as superfícies foi fixada em  $\kappa h = 1$  para melhor análise, com força iônica igual a  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  (Fractogel EMD SE HiCap).

conta da valência e do coeficiente de atividade dos sais em solução ( $\gamma$ ), parâmetros utilizados no cálculo da densidade de carga superficial da proteína (Equação 4.2 e 4.3). O tipo de íon altera o comportamento da adsorção das proteínas (Figura 4.7) como observado anteriormente pela variação da contribuição do potencial de campo médio (Figura 4.6).

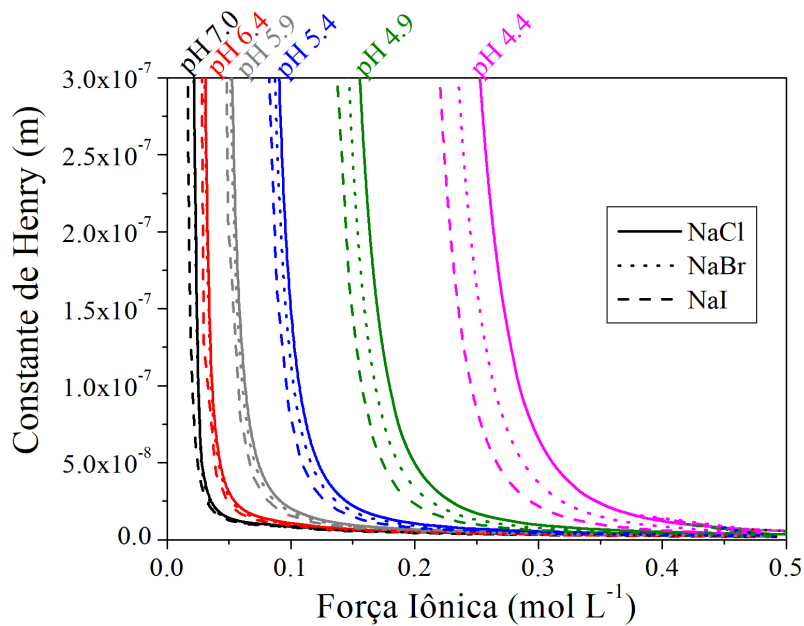
Os ânions testados tiveram grande influência no parâmetro de Henry, enquanto que o tipo de cátion apresentou grande influência apenas para o íon bivalente ( $\text{Sr}^{2+}$ ). Foram escolhidos dois pHs para análise da influência catiônica (Figura 4.7 (b)) pH 6.4 e pH 4.4, sendo o primeiro relacionado ao ponto de carga zero do anticorpo monoclonal e o segundo com o pH mais baixo estudado. Como o efeito do sal  $\text{SrCl}_2$  é maior do que os outros sais, a análise de uma curva em um pH na faixa de 4.4 - 6.3 compromete a visualização dos efeitos na figura.

O iodeto é mais polarizável do que outros ânions, contribuindo mais para a blindagem eletrostática da proteína. Portanto, para um mesmo valor de  $K$ , é necessária maior concentração de NaCl para realizar o mesmo efeito de blindagem do NaI. Conforme o valor de pH aumenta, as curvas do parâmetro de equilíbrio para os diferentes tipos de íons tendem a se sobrepor (Figura 4.7 (a)). Próximo ao ponto de carga neutra da proteína (em pH tendendo ao pI), a contribuição eletrostática é reduzida, minimizando a influência da interação de dispersão entre os íons e as superfícies e, portanto, a natureza iônica.

Para ânions, a série de Hofmeister foi analisada em toda a faixa de pH estudada. No entanto, foi observada uma inversão para o íon  $\text{Sr}^{2+}$ . Como esse íon é o mais polarizável do que outros cátions, há uma forte atração do termo de van der Waals entre  $\text{Sr}^{2+}$  e a proteína. Quando o pH tende ao pI da proteína, ocorre um aumento de íons  $\text{Sr}^{2+}$  dispersos na superfície, tornando-a mais positiva. Assim, há aumento no parâmetro de Henry em relação ao NaCl para a mesma força iônica. No entanto, em pH 4.4, longe do pI, a proteína é positivamente carregada e o fenômeno é determinado pela blindagem eletrostática da fase estacionária, que é maior para  $\text{Sr}^{2+}$  por ser um íon bivalente.



(a)



(b)

Figura 4.7: O efeito Hofmeister: a influência de três diferentes sais no parâmetro de Henry para anticorpos monoclonais na série de (a) ânions e (b) cátions. Para esta análise, tem-se como proteína o mAb em Fractogel EMD SE HiCap.

## 4.2.2 Estimação de parâmetros para mAbs

Tem-se aqui o resultado da rota reversa da metodologia aplicada para obtenção do parâmetro de Henry, em que estimam-se os valores de  $\Gamma_{NH_3^+}$  e  $\Gamma_{COO^-}$  para os diferentes mAbs. Se observa na Tabela 4.5 os valores estimados a partir dos dados experimentais da interação dos mAbs em YMC BioPro SP (10  $\mu\text{m}$ ) [7]. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi calculado considerando todos os pontos experimentais utilizados na etapa de estimação para cada proteína.

Tabela 4.5: Valores das densidades de grupos na superfície para diferentes mAbs:  $\Gamma_{NH_3^+}$  e  $\Gamma_{COO^-}$  são estimados e o valor da densidade do grupo histidina é reportado por [7]. O desvio padrão é informado, assim como o  $R^2$  resultante do ajuste do modelo.

mAb	$\Gamma_{COO^-}$ (mol m <sup>-2</sup> )	Desvio Padrão	$R^2$
P	$6.197 \cdot 10^{-7}$	$0.770 \cdot 10^{-7}$	0.9749
W1	$6.715 \cdot 10^{-7}$	$0.477 \cdot 10^{-7}$	0.9156
W2	$6.448 \cdot 10^{-7}$	$0.722 \cdot 10^{-7}$	0.9431
W3	$6.405 \cdot 10^{-7}$	$0.722 \cdot 10^{-7}$	0.9443

mAb	$\Gamma_{NH_3^+}$ (mol m <sup>-2</sup> )	Desvio Padrão	$R^2$
S1	$7.004 \cdot 10^{-7}$	$0.706 \cdot 10^{-7}$	0.9793
S2	$7.103 \cdot 10^{-7}$	$0.845 \cdot 10^{-7}$	0.9793

Nota-se ainda pela Tabela 4.5 valores de  $R^2$  maiores que 0.90, mostrando bons ajustes do modelo com os dados experimentais ao considerar toda a faixa de pH e força iônica. Guélat et al. (2012) [7] reporta uma melhor estimação dos parâmetros, para as mesma proteínas apresentadas aqui, utilizando um modelo com base na teoria de Debye-Hückel. Apesar do bom ajuste, o resultado do trabalho de Guélat et al. [7] apresenta grandes desvios em relação a sequência de aminoácidos utilizada como referência. Por exemplo, como o mAb P é um variante da trastuzumabe, os valores dos grupos iônicos devem ser próximos de 130 grupos amino, 118 grupos carboxila e 26 grupos histidina. Guélat et al. [7] reporta a estimação de 15.5 grupos histidinas na superfície de todas as proteína e 128.6 grupos carboxila na superfície do mAb P. Aqui, foi utilizado a mesma quantidade de grupos histidina da trastuzumabe (26 grupos), sendo estimados 117.2 grupos carboxila ( $\Gamma_{COO^-} - 4\pi r_p^2 N_{Av}$ ) na superfície do mAb P. Desta forma, pelas informações da sequência de aminoácidos, o uso da PBEm apresenta como vantagem em fornecer informações acuradas em relação a quantidade de grupos ionizáveis.

De acordo com as Equações 4.1, 4.2 e 4.3, a densidade de carga superficial da proteína é função da contribuição dos grupos  $\Gamma_{NH_3^+}$ ,  $\Gamma_{His^+}$  e  $\Gamma_{COO^-}$ . Como a mAb W1 possui o maior valor de  $\Gamma_{COO^-}$ , conclui-se que esta mAb apresenta o mais baixo valor da densidade total de cargas dentre as variantes observadas

e, conseqüentemente, menor interação com o adsorvente. Em contraste, o mAb S2 apresenta o mais elevado valor de  $\Gamma_{NH_3^+}$  dentre os mAbs em estudo. Tem-se, portanto, o valor maior para a densidade de carga superficial desta proteína e a maior interação com o adsorvente. Em resumo, é esperada a seguinte ordem crescente de afinidade dos mAbs em YMC BioPro SP (10  $\mu\text{m}$ ):  $W1 < W2 < W3 < P < S1 < S2$ .

Nota-se na Figura 4.8 a comparação entre as curvas estimadas do parâmetro de Henry com os dados experimentais da literatura. Em geral, é observada uma boa correlação entre a curva modelada e os dados. Pode-se observar uma escassez de pontos experimentais no pH 6.5, e os pontos experimentais no pH 5.9 estão agrupados em uma pequena faixa de força iônica. Este conjunto de fatores pode ter resultado na ineficácia da representação de  $K$  nesta faixa de pH.

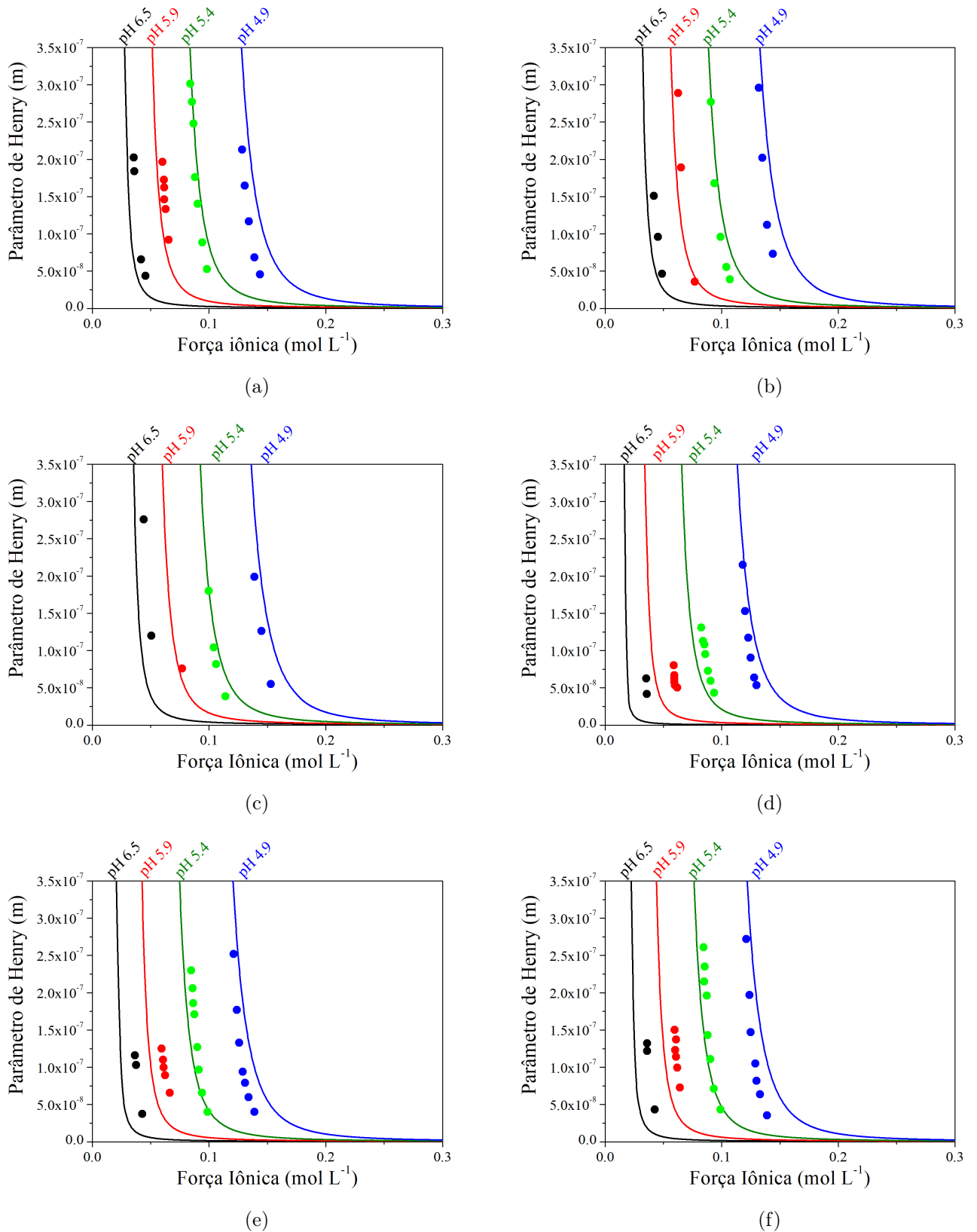


Figura 4.8: Curvas do parâmetro de Henry da interação entre YMC BioPro SP (10  $\mu\text{m}$ ) como os seguintes anticorpos monoclonais: (a) mAb P (b) S1 (c) S2 (d) W1 (e) W2 e (f) W3. As curvas foram obtidos após a etapa de estimação de parâmetros e os pontos representam os dados experimentais da literatura [7].  $T = 25^\circ\text{C}$ .

### 4.2.3 Isothermas de adsorção de lisozima em SBA-15

Como primeira abordagem, calculou-se o perfil de densidade de carga superficial em função do pH (Figura 4.9) utilizando as informações apresentadas dos resíduos de aminoácidos da lisozima (Tabela 4.3) e da densidade dos grupos silanóis (Tabela 4.4). O perfil de  $\sigma_1$  apresenta um valor de densidade de carga zero para o pH 10.8, consistente com o ponto isoelétrico da lisozima. O perfil modelado para a proteína está em concordância com o perfil de carga líquida reportada na literatura [129], enquanto que  $\sigma_2$  está em concordância com a reportada por [135, 136].

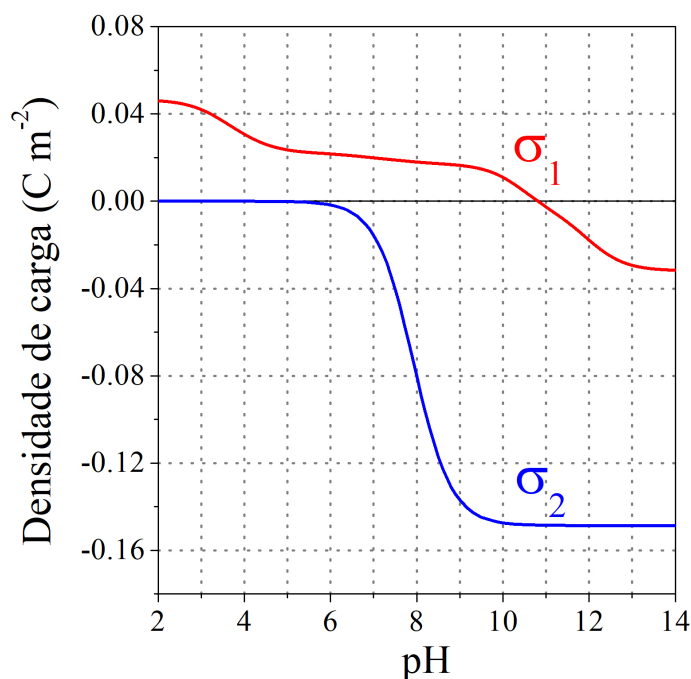


Figura 4.9: Perfis de densidade de carga superficial, em função do pH, utilizando parâmetros reportados na literatura.  $\sigma_1$  representa a soma total da contribuição das cargas dos aminoácidos da lisozima; e  $\sigma_2$  é a densidade de carga superficial do adsorvente (SBA-15) para uma solução sem eletrólitos.

As equações de densidades de cargas, Eqs. 4.3 e 4.2, podem ser simplificadas para a abordagem de Henderson-Hasselbalch (HH) ao negligenciar o termo de associação efetiva dos íons. Neste trabalho, mostrou-se que a inclusão da constante de associação e dissociação no cálculo da densidade de carga superficial, bem como a dependência de  $\sigma$  com o pH, apresentou bons resultados na predição do parâmetro de Henry para a interação entre anticorpos monoclonais com adsorventes comerciais de IEC. Na literatura, observa-se a aplicação da equação de HH para descrição das cargas da lisozima no estudo dos efeitos de Hofmeister para interações de proteínas [17], e para determinação do segundo coeficiente do virial [20]. É reportado por



Franco et al. [137] o desenvolvimento de uma equação, com base na equação de HH, para obtenção do parâmetro de solubilidade da  $\beta$ -lactoglobulina bovina para diferentes forças iônicas. Conforme descrito no trabalho de Franco et al. [137] há uma boa correlação entre os resultados obtidos e os dados experimentais nas proximidades do ponto isoelétrico, mesmo na ausência de dependência da força iônica com o parâmetro  $pK_a$ .

Bhattacharyya et al. [138] também investigou a adsorção de lisozima em materiais mesoporosos e altamente ordenados, reportando evidências experimentais da presença de forças eletrostáticas e não-eletrostáticas no processo de adsorção. Foi utilizado em seu trabalho ferramentas para o cálculo do  $pK_a$  (*software* PROPKA 2.0 [51, 52]), capaz de indicar a localização de grupos ionizáveis na estrutura cristalina da proteína (i.e, se está dentro da estrutura, ou se está na superfície). Utiliza-se aqui a quantidade de grupos iônicos presentes na lisozima conforme reportado por Hagemann et al. [129].

É uma tarefa desafiadora encontrar uma alta acurácia para o perfil de ionização. Gargalos na predição do  $pK_a$  podem aparecer devido a diferentes fatores, como a estimativa de alguns grupos tituláveis ao desconsiderar a presença de curvas que não seguem um perfil HH, ou em erros metodológicos de análise de dados experimentais de ressonância magnética nuclear [139]. Para um cálculo mais confiável, o valor de  $pK_a$  deve ser corrigido de forma a corresponder às possíveis mudanças experimentais no perfil de ionização devido a ligações químicas, ou pela presença de água/íons na estrutura [52, 139].

Apesar das diferentes metodologias de cálculo do  $pK_a$ , utiliza-se neste trabalho um modelo capaz de determinar um valor consistente para o pI. É de amplo conhecimento que a lisozima é uma proteína pequena; logo, uma hipótese que está sendo proposta é que todos os grupamentos funcionais ionizáveis contribuem para a determinação da carga. Alterações nas condições da fase fluida afetam os grupos ionizáveis, resultando em mudanças do ponto de carga neutra da proteína devido a efeitos eletrostáticos (Figura 4.10).

Utilizam-se as densidades de cargas  $\sigma_1$  e  $\sigma_2$  como valores de entrada no modelo de Poisson-Boltzmann modificado para obtenção da contribuição eletrostática do PMF entre lisozima e da superfície da sílica. Nota-se na Figura 4.11 o comportamento do parâmetro de Henry em função da força iônica para pH igual a 10.0, o mesmo valor de pH que é utilizado nos ensaios experimentais de isoterma de adsorção reportados por Nogueira [21]. Como observado, o parâmetro de Henry apresenta um valor reduzido com o aumento da força iônica. Esse comportamento é similar ao observado para anticorpos monoclonais, que está relacionado à blindagem eletrostática dos íons nas vizinhanças de ambas as superfícies (proteína—adsorvente). Vale ressaltar que a força iônica afeta a densidade de carga superficial diretamente (Equações 4.3 e

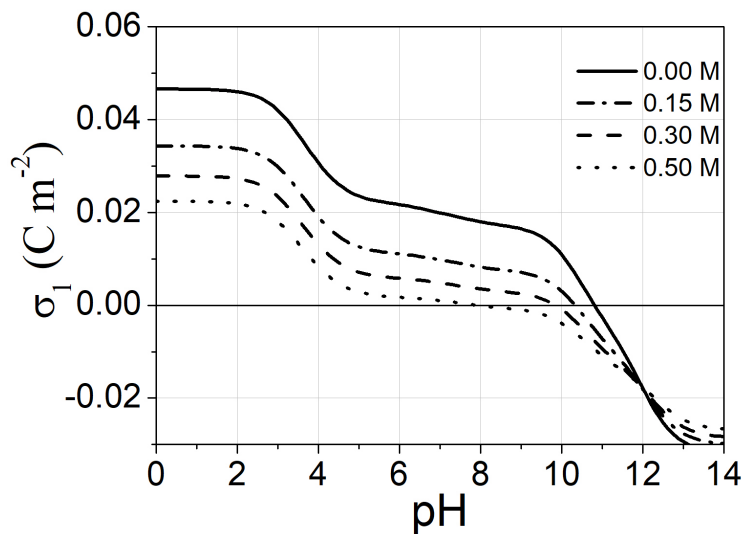


Figura 4.10: Densidade de carga superficial da proteína ( $\sigma_1$ ) como uma função do pH e da força iônica, utilizando NaCl à 25°C.

4.2), e a combinação de todos estes efeitos gera o perfil observado do parâmetro de adsorção.

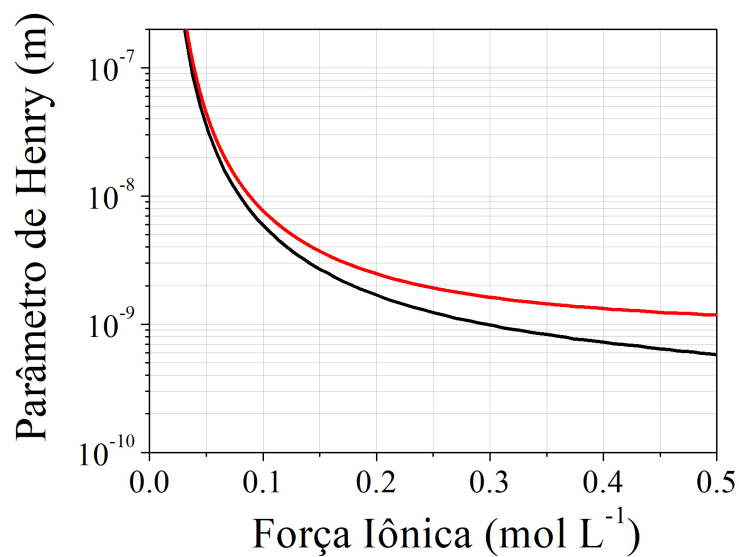


Figura 4.11: Perfil do parâmetro de Henry (Equação 3.14) para a adsorção de lisozima na superfície de sílica. A curva (—) é o perfil modelado ao negligenciar o potencial de dispersão ( $U_{\pm} = 0$ ), e (—) representa o modelo com  $U_{\pm} \neq 0$ . As condições aplicação são para NaCl com pH 10.0 à 25 °C.

Os resultados apresentados a seguir foram obtidos usando a metodologia proposta na Seção 4.1.2. Para obtenção de isotermas de adsorção para lisozima em sílica, primeiramente é apresentada aqui a curva do parâmetro de Henry em função da força iônica de NaCl e com pH 10.0 à 25 °C (Figura 4.11). Em adição a curva do

parâmetro de Henry, a figura apresenta o resultado de  $K$  ao zerar o potencial de dispersão iônica ( $U_{\pm} = 0$ ) na solução da Equação de Poisson-Boltzmann (Equação 3.1). Para este caso, é negligenciada a contribuição do íon na mesma ordem do potencial eletrostático. Como pode ser observado, um significativo desvio de  $K$  ocorre na faixa de força iônica entre 0.1 até 0.5 M.

Para o cômputo da isoterma de adsorção, o parâmetro relativo à capacidade máxima de saturação é de  $q^{sat} = 1295.09 \text{ mg mL}^{-1}$ , ou  $665.23 \text{ mg g}^{-1}$ , obtido pela Equação 4.4.

As isotermas de adsorção, Figura 4.12, foram calculadas seguindo as etapas do diagrama observados na Figura 4.1. Para a curva em que não é adicionada eletrólitos, considera-se a força iônica da solução tampão (50 mM). Os valores obtidos de  $K^*$  (Equação 3.15) foram:  $3.47 \cdot 10^4$  (50 mM),  $9.72 \cdot 10^3$  (0.1 M),  $3.27 \cdot 10^3$  (0.2 M) e  $1.14 \cdot 10^3$  (0.4 M).

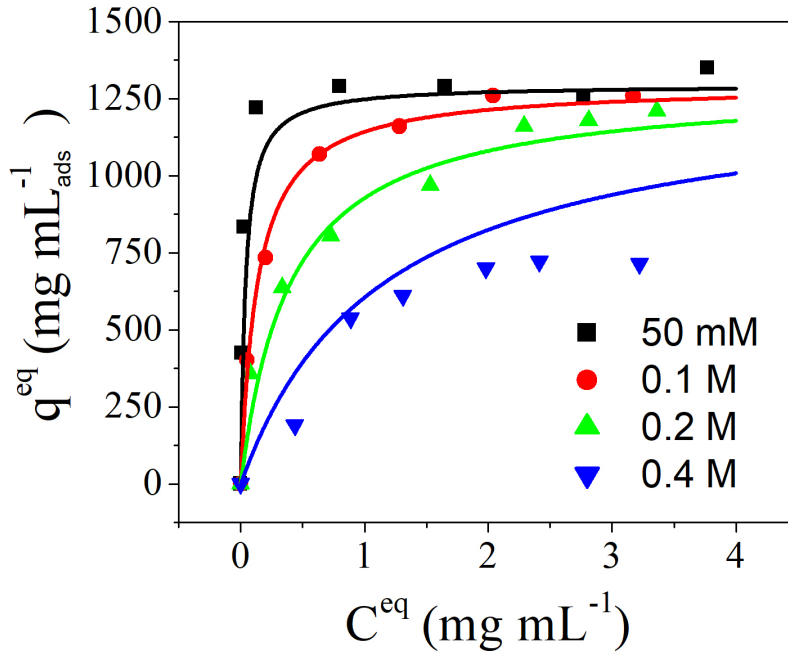


Figura 4.12: Isotermas de adsorção da lisozima em SBA-15. As linhas representam o modelo de Langmuir e os pontos são dados experimentais de Nogueira [21] para pH 10.0 à 25 °C. A metodologia para obtenção dos dados experimentais reportados por Nogueira [21] seguem o mesmo protocolo de Santos et al. [6].

O valor de  $A_s$  (Equação 3.15) foi determinado após uma etapa de estimação de parâmetros, obtendo-se o valor de  $1.65 \cdot 10^{10} \text{ (m}^2 \text{ m}^{-3}\text{)}$  com  $R^2$  de 0.93. É reportado por Guélat et al. [56] um valor de  $A_s$  de  $1.03 \cdot 10^8 \text{ (m}^2 \text{ m}^{-3}\text{)}$  para lisozima em leito fixo. Apesar das diferenças entre as propriedades texturais dos adsorventes, a discrepância de duas ordens de grandeza entre os valores de  $A_s$  pode também ser atribuída à negligência de mais efeitos ao PMF, e.g., efeitos hidrofóbicos, exclusão

de volumes dos íons. Tais inclusões devem ser analisadas para trabalhos futuros. Apesar disso, o parâmetro de Henry ainda preserva a dependência do pH e força iônica, tendo  $A_s$  como parâmetro constante e independente das condições da fase fluida.

Uma hipótese frequentemente utilizada na solução da equação de Poisson-Boltzmann é que as cargas devem ser igualmente distribuídas na superfície do material. Para a lisozima, esta hipótese não é respeitada devido a proteína apresentar momento de dipolo [55, 140]. A não-homogeneidade das cargas também pode ser visualizada em estudos em dinâmica molecular [141], em que o comportamento da lisozima foi estudado em baixa força iônica para pH 7.0. Reporta-se por Salvalaglio et al. [142] o uso de simulação molecular para obtenção do PMF para a interação entre lisozima com um adsorvente comercial de colunas de troca iônica, apresentando pequenos desvios entre os valores calculados do parâmetro de retenção e os dados experimentais. Apesar de resultados promissores obtidos por dinâmica molecular, tal metodologia apresenta como desvantagem um extensivo tempo computacional. Conforme apresentado aqui, a proposta de obtenção do PMF por um modelo em escala mesoscópica mostrou boas previsões ao analisarmos a adsorção de proteína em uma extensa faixa de pH e força iônica.

Conforme apresentado, obtivemos uma excelente correlação entre as isotermas com o ajuste de apenas um único parâmetro. Estes resultados mostram uma promissora aplicação para otimização de sistemas de adsorção. Uma vez que  $q^{sat}$  é conhecido, as dependências com as propriedades da fase fluida são adequadamente previstas pela metodologia proposta (Figura 4.1). O parâmetro de Henry, por sua vez, necessita ser calculado para cada variação de temperatura, tipo de sal e solvente, pH e concentração de eletrólitos.

Como podemos observar na Figura 4.9,  $\sigma_1$  e  $\sigma_2$  são fortemente influenciados pelo pH da solução, sendo que o potencial eletrostático atrativo é menos significativo para baixos valores de pH e em regiões próximas ao pI da proteína. Nestes extremos o termo não-eletrostático entre a proteína e a superfície do adsorvente representa a contribuição atrativa dominante.

Na Figura 4.13 é observado o parâmetro de Henry na região entre pH 6.0 até pH 10.3 para o estudo da influência do pH. Indica-se por este parâmetro de adsorção que, em média, no pH 9.0 é encontrado o valor máximo de  $K$  até  $0.30 \text{ mol L}^{-1}$ . Este resultado é devido às variações de densidades de cargas da proteína e do adsorvente nesta faixa. Pode-se observar, na Figura 4.9, a maior diferença entre as densidades de cargas para o pH 9.0, o que resulta na maior afinidade entre proteína—adsorvente.

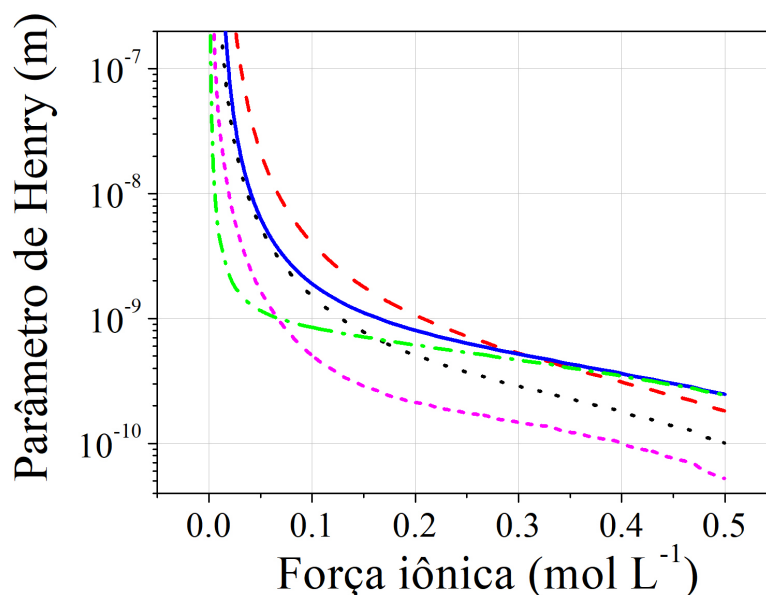
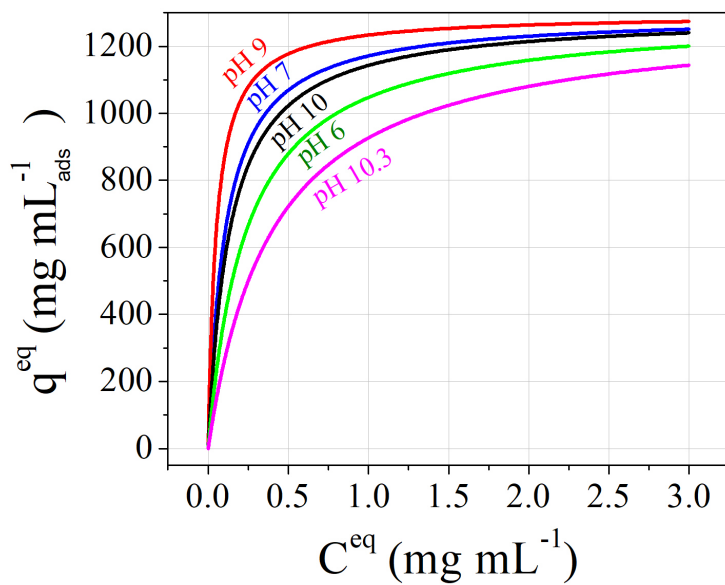


Figura 4.13: Curvas do parâmetro de Henry (3.14) para a região de força iônica de NaCl de: (---) pH 10.3, (.....) pH 10, (- - -) pH 9.0, (—) pH 7.0 e (-.-.-) pH 6.0. Todas as curvas representam a interação lisozima—sílica a  $25^{\circ}\text{C}$ .

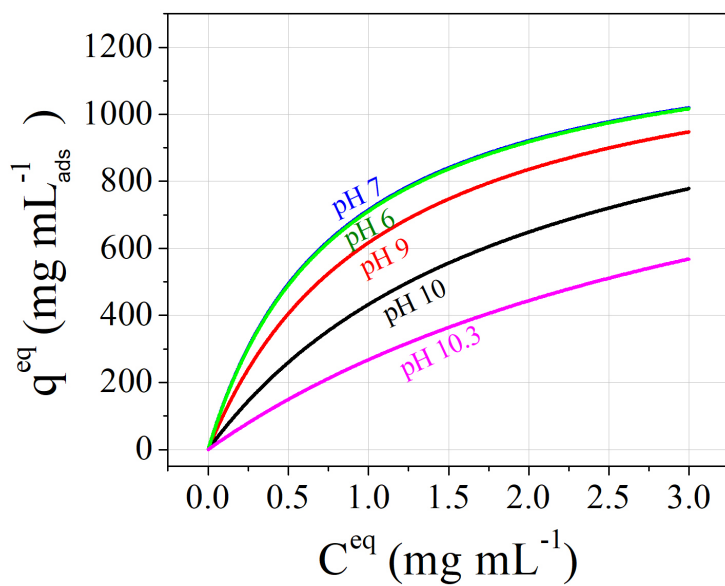
Ainda de acordo com os resultados observados na Figura 4.13, as curvas de  $K$  mostram diferentes formatos em função do pH. Estas variações estão relacionadas aos tipos e quantidade de resíduos de aminoácidos ionizáveis utilizados para o cálculo da densidade de carga superficial da lisozima (Tabela 4.3). Diante disto, a escolha do pH e da força iônica são importantes para o cálculo da isoterma de adsorção.

Para melhor entendimento, podemos ver na Figura 4.14 as isotermas de adsorção, para lisozima em SBA-15, em diferentes pHs ao fixar a força iônica. Observa-se na Figura 4.14(a) que o valor da capacidade de adsorção segue a seguinte série ao fixar a força iônica em  $0.10 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl:  $\text{pH } 10.3 < \text{pH } 6.0 < \text{pH } 10.0 < \text{pH } 7.0 < \text{pH } 9.0$ . Entretanto, as isotermas seguem uma diferente ordem ao fixar a força iônica em  $0.50 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl, como podemos observar na Figura 4.14(b):  $\text{pH } 10.3 < \text{pH } 10.0 < \text{pH } 9.0 < \text{pH } 7.0 = \text{pH } 6.0$ . Logo, tem-se que a metodologia proposta aqui foi capaz de apresentar a isoterma de Langmuir como uma função das curvas de  $K$ , o que pode ser útil para estudos de otimização e separação de proteínas.

Dentro da faixa de pH entre 6.0 até 10.3, a maior interação adsorvente—



(a)



(b)

Figura 4.14: Isothermas de adsorção para a lisozima em SBA-15 para diferentes pHs e em duas forças iônicas distintas de (a)  $0.10 \text{ mol L}^{-1}$  e (b)  $0.50 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl.

adsorvato é predominante no pH 9.0. Por conta disso e para a análise do efeito de Hofmeister, este pH foi escolhido na etapa de cálculo de diferentes isotermas para diferentes tipos de sais. Observa-se na Figura 4.15 uma análise de sensibilidade do parâmetro  $K^*$  para NaCl, NaBr e NaI. Conforme podemos observar na Figura 4.9, as diferenças no parâmetro de Henry são principalmente devido ao termo não-eletrostático dado pelo potencial de dispersão iônico (Equação 3.2).

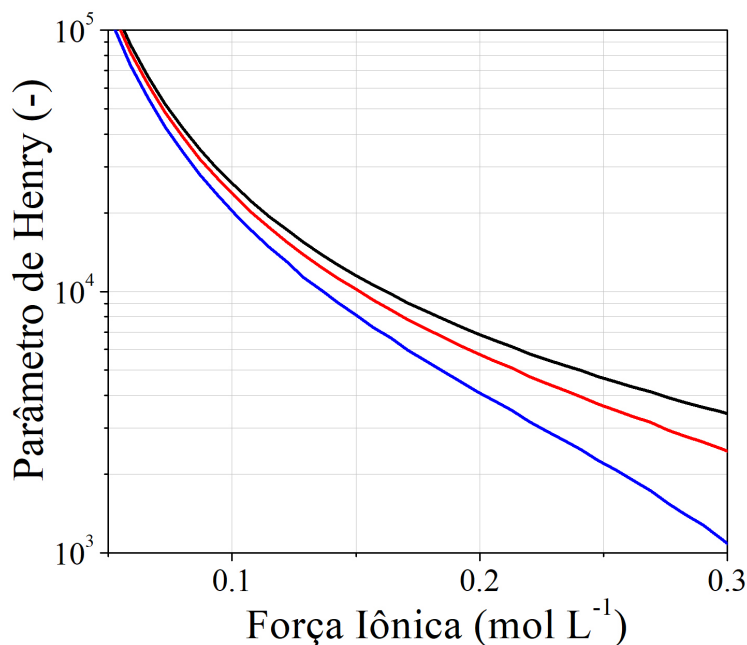


Figura 4.15: Curvas do parâmetro de Henry adimensional (3.15) para a interação entre a superfície da sílica na presença de diferentes tipos de sais: (—) NaCl, (—) NaBr, (—) NaI para pH 9.0 em 25 °C.

Reporta-se pela figura 4.15 um comportamento similar à série de Hofmeister para ânions, em termos da blindagem da carga da lisozima. É válido apontar que conforme a concentração de eletrólitos aumenta, o efeito de blindagem da proteína aumenta e o parâmetro de Henry diminui. Este efeito é relacionado à polarizabilidade dos ânions que segue a seguinte sequência:  $I^- > Br^- > Cl^-$ . Lembrando que a série de Hofmeister não é uma regra em que a sequência de interação dos íons deva seguir. Reporta-se por Salis et al. [136] uma inversão da série para uma SBA-15 funcionalizada (SBA-15-NH<sub>2</sub>) devido às diferenças entre as propriedades eletrostáticas da amino-funcionalizada SBA-15 e a mudança da polarizabilidade dos íons nas vizinhanças da superfície do material. Este resultado reconhece a significativa dependência dos efeitos dos íons para adsorção de proteínas.

Nota-se na Figura 4.16 que o sistema de adsorção segue o comportamento das

propriedades previamente descritas para o parâmetro de Henry (Figura 4.15) sem mudanças no valor da capacidade máxima de saturação. É válido apontar que  $q^{sat}$  é um parâmetro fixo e consistente para todas as isotermas de Langmuir nesta etapa. Esta hipótese implica que os sítios de adsorção são constantes e iguais para todas as proteínas; portanto, as modificações nos comportamentos das isotermas são exclusivamente por  $K^*$  devido à sua dependência com as condições da fase fluida. Ignorar o modelo termodinâmico e aplicar uma estimativa dos parâmetros de Langmuir ( $q^{sat}$  e  $K^*$ ) para cada isoterma, pode levar a um errôneo valor da capacidade máxima de saturação.

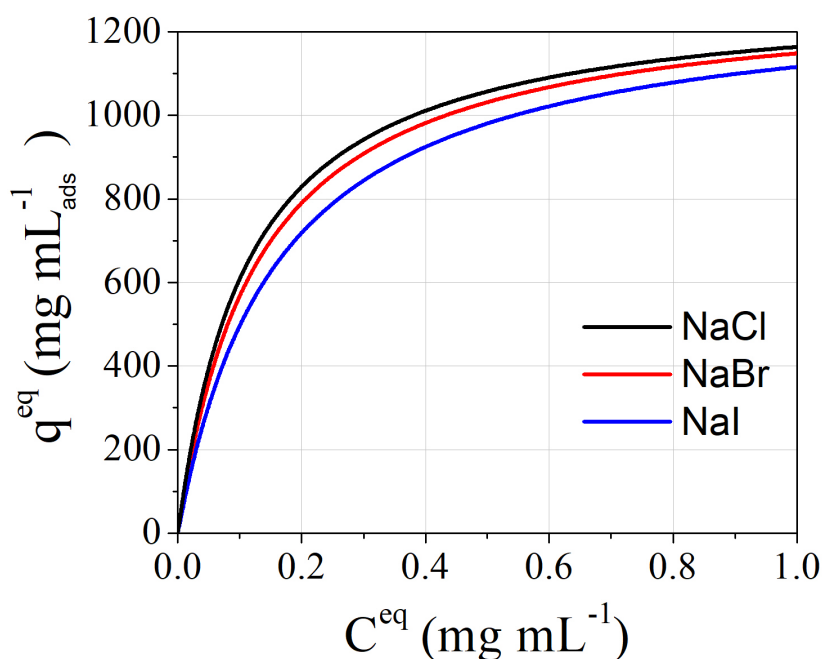


Figura 4.16: Isoterma de adsorção da lisozima em SBA-15 calculada para diferentes soluções de NaCl, NaBr e NaI, com força iônica de  $0.15 \text{ L}^{-1}$  em pH 9.0.

A etapa de estimativa de múltiplos parâmetros em modelos do tipo Langmuir é comum na literatura. Gomes et al. [143] aponta boas análises sobre a influência eletrostática para a interação entre a adsorção de albumina de soro humano e adsorvente de uma coluna multi-modal. Entretanto,  $q^{sat}$  e o parâmetro de adsorção do modelo são determinados em cada experimento de adsorção, reportando-se um decaimento de  $q^{sat}$  de acordo com o aumento do pH e da concentração de eletrólitos. Zhang et al.[144] reporta uma dependência similar para a adsorção de lisozima em colunas aniônicas, empacotadas com esferas de matriz polimérica. Zhang aponta um pequeno desvio na estimativa do  $q^{sat}$  para diferentes valores de pH. Apesar disso, é reportado um decréscimo da capacidade adsorvida com o aumento da concentração de sal para a faixa de 0.0 até 0.3 M NaCl.



Nesta etapa do estudo, foi negligenciada a hipótese de adsorção competitiva dos íons nos sítios ativos do adsorvente, mostrando que  $q^{sat}$  pode ser obtida ao considerar somente as propriedades texturais do adsorvente e do tamanho da proteína.

O parâmetro de Henry mostrou ser uma excelente ferramenta para tornar a isoterma de adsorção de Langmuir uma função das condições da fase fluida. Como as curvas de  $K$  mostram diferentes formatos em função do pH e da força iônica (Figura 4.14), o cálculo do parâmetro de afinidade através da resolução da equação de Poisson-Boltzmann modificada mostrou-se ser um robusto aperfeiçoamento para estudos de otimização de processos de adsorção.

## Capítulo 5

# Geração do modelo substituto e o seu acoplamento ao balanço de massa em leito fixo

Aqui, um modelo empírico é treinado utilizando como ferramenta a técnica de rede neuronal. O parâmetro de Henry, obtido pela metodologia do cômputo do PMF pela solução da PBE<sub>m</sub> em coordenadas biesféricas (Capítulo 4), é utilizado como ponto pseudo-experimental para a etapa de treino do modelo substituto. O modelo treinado é então acoplado ao balanço de massa em leito fixo. Em todas as etapas, avalia-se a especificidade iônica computada. Logo, nesta etapa são realizados:

- Treinamento de um modelo empírico com base em rede neuronal;
- Uso do modelo treinado para determinação do parâmetro de Henry em função do pH, força iônica, tipo de íon e densidade dos grupos iônicos da proteína; e acoplamento ao balanço de massa por componente;
- Previsão da evolução da frente de massa ao longo do tempo e do espaço em uma coluna de adsorção sujeito a gradientes de concentração de sal.

### 5.1 Metodologia

A análise multi-escalar aplicada neste trabalho consiste em calcular o perfil de concentração de proteínas em um leito fixo, utilizando as informações descritas em mesoescala (Figura 5.1). Para alcançar esse objetivo é proposto o treinamento de um modelo empírico, com base em rede neuronal, com o algoritmo de propagação reversa de erro (*back-propagation*). Para o treinamento, utiliza-se a plataforma *Keras* [112] e *TensorFlow* [145] do Python.

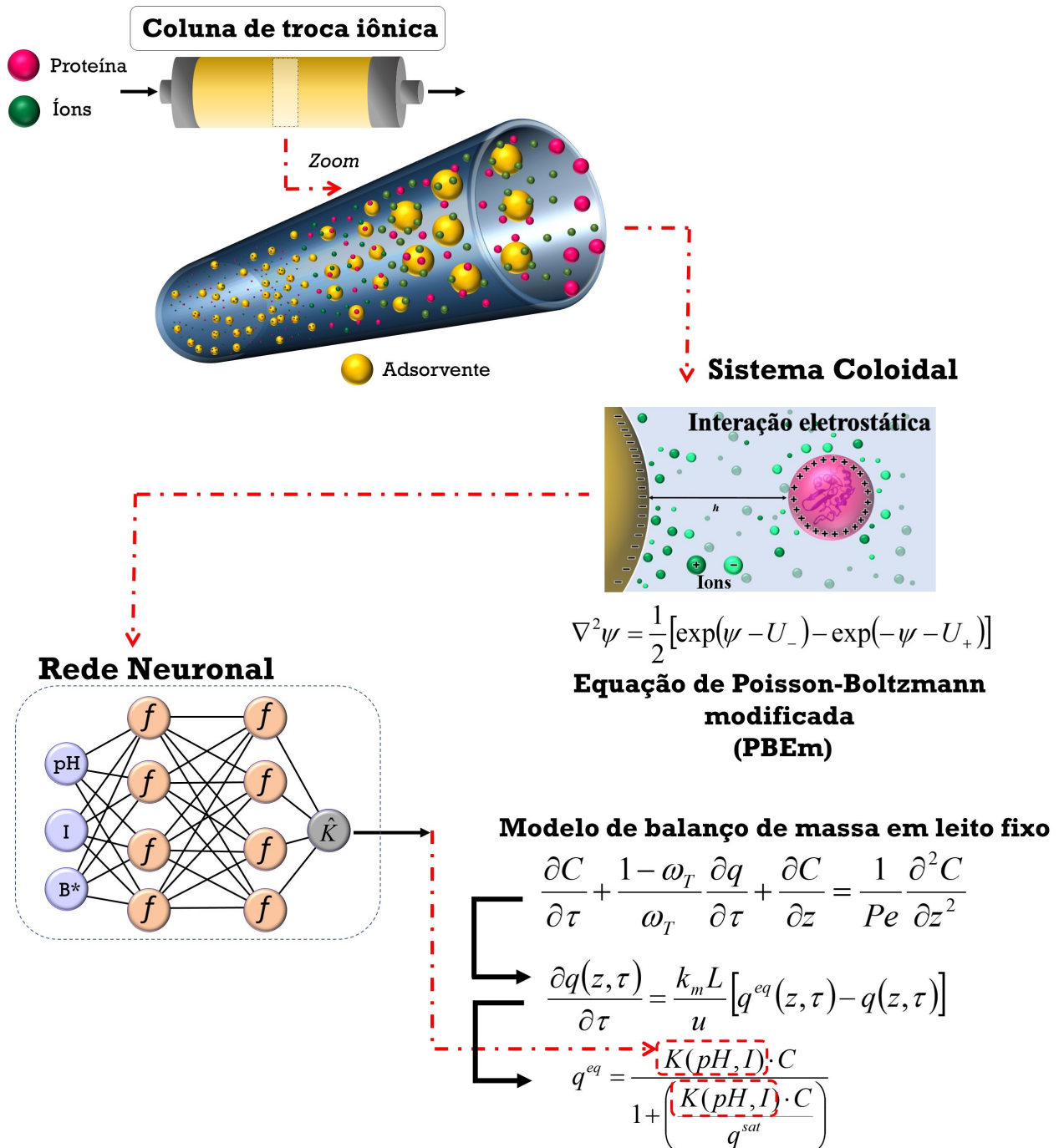


Figura 5.1: Representação da metodologia proposta para uso de um modelo substituto, com base no treinamento de uma rede neuronal, como uma ferramenta de conexão entre um modelo no nível do processo e outro no nível do poro.

Antes da criação da rede neuronal, necessita-se da seleção dos valores de entrada a serem usados no treinamento do algoritmo. A escolha do método de seleção deve possuir o mesmo nível de rigor estatístico que os apresentados para ensaios pseudo-experimentais, como a análise  $2^n$  fatorial.

O *Latin Hypercube Sampling* (LHS) [146] é um técnica estatística que permite uma precisão amostral a partir de uma quantidade menor de pontos em comparação com o método Monte Carlo. Tendo como objetivo uma rede neuronal que informa o parâmetro  $K$ , apresenta-se as seguintes variáveis de entrada: o valor de  $pH$ ; a força iônica do sistema; e os tipos de íons em solução, que é avaliado pelo parâmetro de Lifshitz adimensional:

$$B^* = \frac{B}{r_{ion}^3 \kappa_B T} \quad (5.1)$$

A definição da quantidade  $\delta$  de pontos pseudo-experimentais<sup>1</sup> e o intervalo de obtenção destes pontos são arbitrários, contudo o LHS aponta qual conjunto ( $pH$ ,  $I$ ,  $B^*$ ) de pontos deve ser escolhido de forma randômica e independente. Garante-se com isso que a presença de co-variâncias, se existirem, sejam frutos da natureza do sistema e não por conta de uma imposição proveniente da escolha dos pontos pseudo-experimentais.

Necessita-se ainda, antes da etapa de otimização, a definição de alguns parâmetros para a construção da rede neuronal, tais como: a taxa de aprendizado, o número de mini-lotes, a quantidade de camadas internas da rede, o número de neurônios e a função de ativação nas camadas internas. Estes parâmetros, denominados de hiper-parâmetros, são definidos por uma pesquisa de malha aleatória utilizando diferentes metodologias, nas plataformas de código aberto chamadas *Keras*[112] e *TensorFlow* [145].

---

<sup>1</sup>Para a rede neuronal, o parâmetro  $K$  utilizado no treinamento do modelo empírico é definido aqui como ponto pseudo-experimental.

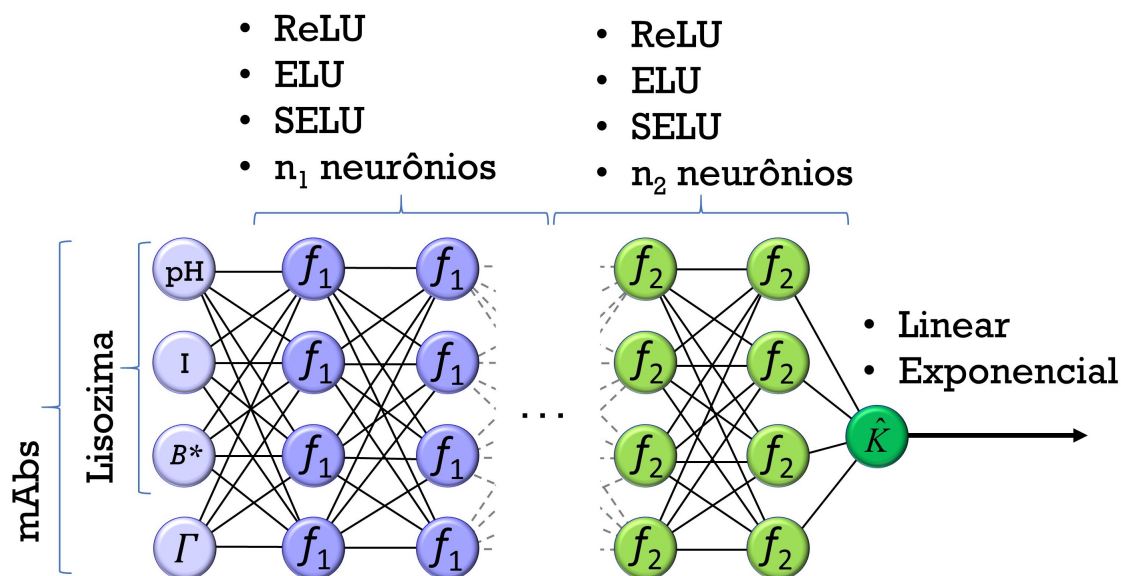


Figura 5.2: Representação detalhada da estrutura da rede neuronal para o treinamento do parâmetro de isoterma nos diferentes casos estudados. Independente do caso, divide-se a estrutura da rede em duas seções. Cada seção possui um número de neurônios e uma função de ativação característica, escolhida de acordo com o método de otimização. O parâmetro de entrada  $I$  representa a força iônica;  $B^*$  é parâmetro de Lifshitz  $\left(\frac{B}{r_{ion}^3 \kappa_B T}\right)$ , associado com o tipo de íon em solução;  $\Gamma$  representa a densidade superficial de grupos aminoácidos de mAbs.

A acurácia final desse algoritmo é função da quantidade de pontos pseudo-experimentais para o treinamento da rede. Geram-se portanto os pontos de treinamento, escolhidos pela técnica estatística LHS. Cada ponto pseudo-experimental foi gerado para dois estudos de caso: (1) na análise do perfil de interação entre lisozima—SBA-15 (Seção 4.1.2); (2) no estudo multicomponente entre diferentes tipos de mAbs em uma coluna YMC BioPro SP ( $10 \mu m$ ) (Seção 4.1.1). Logo, a rede neuronal é treinada utilizando os valores do parâmetro de Henry em cada caso, considerando como variáveis de entrada o pH, as concentrações de eletrólitos e a presença de íons em solução:  $[Na^+][Cl^-]$ ,  $[Na^+][Br^-]$  e  $[Na^+][I^-]$ . Para o estudo multicomponente, em adição as variáveis de entrada citados, considera-se a densidade de grupamentos ionizáveis na superfícies da proteína ( $\Gamma_{NH_3^+}$ ,  $\Gamma_{His^+}$  e  $\Gamma_{COO^-}$ ).

Após a obtenção dos pontos pseudo-experimentais, o conjunto de treino e de teste segue a razão de 70/30 e a rede é construída de acordo com a estrutura observada na Figura 5.2. Utiliza-se de três abordagens para a definição dos hiper-parâmetros da estrutura da rede neuronal:

Método 01: **Tentativa e erro**. Este procedimento é amplamente utilizado na literatura [10–15] para a determinação dos hiper-parâmetros necessários para a

construção da rede. Como o próprio nome se refere, trata-se em uma determinação arbitrária dos valores dos hiper-parâmetros para atingir a acurácia desejada;

Método 02: **Planejamento Composto Central** [147]. Com o objetivo de reduzir a arbitrariedade do método de tentativa e erro, propõem-se por esta análise a determinação da melhor solução do treinamento da rede referente a um planejamento fatorial de 2 níveis. A curvatura foi construída com pontos em triplicata, analisando a superfície de resposta entre duas variáveis: número de camadas ocultas e número de neurônios. Foram analisados a curvatura para três casos. Para todos, a rede foi construída com  $m$  camadas ocultas, entre 2 a 14, sendo  $m$  um valor par; e  $n$  quantidade de neurônios, entre 80 a 340, sendo que as  $\frac{m}{2}$  primeiras camadas possuem  $n$  neurônios e são treinados com a função de ativação ReLU; as demais  $\frac{m}{2}$  camadas possuem  $(n + 20)$  neurônios, treinados com as funções: ReLU (primeiro caso); função de ativação ELU (segundo caso); e, terceiro caso, com a função de ativação SELU.

Método 03: **Otimização pelo software Optuna** [148]. Permite-se por esta abordagem selecionar a melhor estrutura da rede neuronal utilizando os pontos pseudo-experimentais escolhidos pela técnica LHS. Tem-se com isso, uma completa varredura da melhor estrutura na faixa dos pontos selecionados, otimizando com isso o custo computacional para o treinamento do algoritmo. Primeiramente, escolhe-se um valor  $m$  (par) de camadas ocultas na faixa de busca entre 2 a 14. Em seguida a, divide-se a rede em duas seções. Para cada seção, a faixa de busca utilizada obedeceu os seguintes critérios para a determinação dos hiper-parâmetros:

(1) Funções de ativação: ReLU (Equação 3.26), ELU(Equação 3.28), SELU (Equação 3.27);

(2) Quantidade de neurônios: faixa de busca entre 20 a 400.

Logo, de forma análoga ao planejamento fatorial, a rede foi otimizada com funções de ativação mistas. Os demais hiper-parâmetros foram determinados seguindo os critérios:

(3) Quantidade de mini-lotes: faixa de busca entre 128 a 1024;

(4) Taxa de aprendizado adaptativo: faixa de busca entre  $1 \cdot 10^{-8}$  a  $1 \cdot 10^{-4}$ .

Por fim, a acurácia do método foi analisada pela medição do erro percentual absoluto médio.

Após a obtenção das informações para a estruturação da rede neuronal, o processo de otimização é aplicado na linguagem Python em uma estrutura

*Keras/TensorFlow* para minimização da Equação 3.29. O parâmetro de saída do algoritmo da rede neuronal é então definido como  $\hat{K}$ , sendo utilizado em substituição ao conjunto de Equações 3.1 - 3.14. Logo, realiza-se primeiramente o acoplamento do algoritmo da rede neuronal no cálculo da quantidade adsorvida da proteína (Equação 3.16).

A resolução do modelo matemático que representa o sistema cromatográfico (Equação 3.18) consiste na aplicação de aproximações parabólicas em elementos finitos, discretizadas em relação à coordenada espacial. Este método de discretização é análogo ao reportado por Severo [22]. Nesta tese, o conjunto de sistemas algébrico-diferenciais é solucionado utilizando o pacote DASSL (*Differential-Algebraic System Solver in C*) em Python (disponível no sítio: <https://github.com/asanet/dasslc2py>).

A Tabela 5.1 apresenta as condições de operação que foram utilizadas para o estudo de interação lisozima—SBA-15, análogo às condições experimentais reportada para adsorção de proteína em leito fixo por Guélat et al. (2012) [7].

Tabela 5.1: Condições de operação da coluna de troca iônica [7].

Tempo de operação (min)	80.0
Volume de Alimentação (cm <sup>3</sup> )	120·10 <sup>-2</sup>
Vazão (cm <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> )	0.50
$\omega_T$ (-)	0.53
Diâmetro da coluna (cm)	0.50
Comprimento da coluna (cm)	8.50
Temperatura	25 °C
Taxa de variação de força iônica (mol L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	8.0·10 <sup>-3</sup>

Atribui-se o valor de  $k_m$  de 70 min<sup>-1</sup> para os mAbs [7]. Para lisozima, o coeficiente de transferência de massa é calculado pela equação [149]:

$$k_m = \left( \frac{d_p}{6 k_f} + \frac{d_p^2}{60 \omega_p D_p} \right)^{-1} \quad (5.2)$$

em que  $d_p$  é o diâmetro do adsorvente à base de sílica (19.3  $\mu\text{m}$ ), com uma respectiva porosidade ( $\omega_p$ ) de 0.74 [21];  $D_p$  é o coeficiente de difusão no poro e  $k_f$  é o coeficiente de transferência de massa externo ao filme do adsorvente.

É de amplo conhecimento que a lisozima possui pequeno diâmetro e que partículas mesoporosas do tipo SBA-15 são altamente ordenadas (baixa tortuosidade). Com isso, estes critérios permitem que a correlação de Mackie e Meares [101] seja aplicada para o cálculo de  $D_p$ :

$$D_p = D_m \left[ \frac{\omega_p}{2 - \omega_p} \right] \quad (5.3)$$

em que  $D_m$  é o coeficiente de difusão, obtido pela correlação de Young [150]:

$$D_m = 8.34 \cdot 10^{-8} \frac{T}{\eta M_a^{1/3}} \quad (5.4)$$

para  $\eta$  sendo a viscosidade da água (0.90 cP) à 25°C [151], e  $M_a$  é a massa molecular da lisozima (14.4 kDa).

Por fim, o valor do coeficiente de transferência de massa no filme é dado por [101]:

$$k_f = \sqrt{\frac{4 D_m u}{\pi d_p}} \quad (5.5)$$



## 5.2 Resultados e Discussões para a abordagem multiescalar utilizando redes neurais: uso de modelos substitutos acoplados ao balanço de massa em leito fixo

Apresentam-se aqui os resultados obtidos para a determinação de um modelo substituto, treinado com base em redes neurais como ferramenta para o cômputo de  $\hat{K}$  (Equação 3.14). O modelo substituto é então acoplado à Equação 3.16 (ou Equação 3.17, para o estudo de caso multicomponente) e a capacidade de adsorção obtida é utilizada na solução do balanço de massa em leito fixo.

Para exemplificar a problemática relacionada ao esforço computacional, as simulações foram geradas utilizando um computador Intel Core i5-4440, CPU 3.10 GHz, 12.0 GB RAM, NVIDIA GeForce GT 630, sistema operacional Windows 10 Pro 64-bits. Nestas especificações, foram necessários 4800 processos iterativos para resolução das Equações 3.18 - 3.23 na DASSL, para um valor arbitrário do parâmetro de Henry. Em média, o um custo computacional para a obtenção de um único valor do parâmetro de Henry, conforme descrito na Seção 4.1.1, foi de 4 minutos. Logo, se estima um tempo de 13 dias para o cômputo do balanço de massa por essa abordagem. Em comparação, o custo computacional para a obtenção de  $\hat{K}$  foi de 400 ms. Desta forma, o tempo computacional para o cômputo do balanço de massa foi reduzido para 32 min ao utilizar o modelo substituto.

### Seleção de um modelo substituto para o parâmetro $\hat{K}$

Nesta seção é apresentada como proposta a criação de um modelo substituto que utiliza as condições da fase fluida como variáveis de decisão para determinar o parâmetro de Henry da interação lisozima—SBA-15. Primeiramente, foram gerados 1500 pontos pseudo-experimentais para serem utilizados no treinamento do modelo substituto. Para melhor esclarecimento dessa etapa, a Tabela 5.2 apresenta alguns destes pontos selecionados.

Como observado, o tipo de íon é escolhido de acordo com o valor adimensional da constante de dispersão (Tabela 4.1). Nota-se na Figura 5.3 uma análise estatística utilizando o Planejamento Composto Central para a escolha dos hiper-parâmetros. Na Figura 5.3(a), é observado um modelo treinado por uma rede neuronal contendo camadas ocultas ativadas pela função de ativação ReLU e a camada de saída sendo linear. Para as demais figuras, o modelo é treinado utilizando a metade das primeiras camadas ocultas com a função de ativação ReLU, e as camadas seguintes com ELU (Figura 5.3(b)) e SELU (Figura 5.3(c)); possuindo a função exponencial na

Tabela 5.2: Apresentação de alguns dos pontos gerados pela técnica LHS. Cada valor do parâmetro de Henry (última coluna) é obtido utilizando as informações de  $pH$ ,  $I$  e  $B/(r_{ion}^3 \kappa_B T)$  da respectiva linha.  $B/(r_{ion}^3 \kappa_B T) = 1.086$  para  $Cl^-$ ;  $1.348$  para  $Br^-$  e  $1.735$  para  $I^-$ . Nos três casos, tem-se  $Na^+$  como co-íon<sup>a</sup> e  $T = 25$  °C.

Pontos gerados pela técnica LHS			Equação 3.14
pH	I (M)	$B/(r_{ion}^3 \kappa_B T)$	$K$ (m)
10.294	0.497	1.086	$9.160 \cdot 10^{-11}$
8.432	0.465	1.086	$2.850 \cdot 10^{-10}$
7.733	0.498	1.086	$2.860 \cdot 10^{-10}$
⋮	⋮	⋮	⋮
6.177	0.470	1.348	$2.178 \cdot 10^{-10}$
8.233	0.421	1.348	$2.181 \cdot 10^{-10}$
9.183	0.384	1.348	$2.182 \cdot 10^{-10}$
⋮	⋮	⋮	⋮
7.523	0.444	1.735	$6.372 \cdot 10^{-11}$
9.094	0.365	1.735	$6.328 \cdot 10^{-11}$
10.186	0.190	1.735	$6.345 \cdot 10^{-11}$

<sup>a</sup> Define-se aqui como co-íon devido a referência ser a carga da proteína.

camada de saída. As análises foram feitas no STATISTICA (*Data Analysis Software System*), e indicam que a escolha da função de ativação, número de neurônios e número de camadas ocultas impactam no treinamento do modelo.

Observa-se na Figura 5.3 que as escolhas dos hiper-parâmetros pela metodologia de tentativa e erro devem ser evitadas. A depender da arbitrariedade dos critérios escolhidos, a potencial consequência reside em treinar um modelo contendo uma grande quantidade de camadas ocultas e neurônios. Isso implica em uma quantidade excessiva de parâmetros a serem treinados e maior custo computacional na etapa de treino e validação do modelo.

Além dos fatores apresentados, é de amplo conhecimento que a quantidade de pontos pseudo-experimentais afeta no treinamento da rede neuronal. Nota-se na Figura 5.4 a curva de nível obtida ao considerar uma rede mista contendo as funções ReLU/ELU, com a função exponencial na camada de saída. A única diferença entre as Figuras 5.3(b) e 5.4(a), encontra-se na quantidade de pontos pseudo-experimentais utilizados no treinamento. Observa-se na Figura 5.3(b) a aplicação de 1500 pontos<sup>2</sup>, enquanto que na Figura 5.4(b) é observado a aplicação 24000 pontos.

É observado pela 5.4(a) que uma menor quantidade de camadas ocultas pode ser aplicada para o treinamento da rede neuronal. Com isso, podemos observar na Figura 5.4(b) o resultado da predição do modelo para o melhor resultado da Figura 5.4(a). A rede neuronal foi treinada contendo 6 camadas ocultas, sendo que: as

<sup>2</sup>Entende-se aqui como o somatório da quantidade de pontos pseudo-experimentais das etapas de treino e de teste. Logo, tomando como exemplo o conjunto de 1500: 1050 pontos foram utilizados na etapa de treino; e 450 na etapa de teste (razão 70/30).

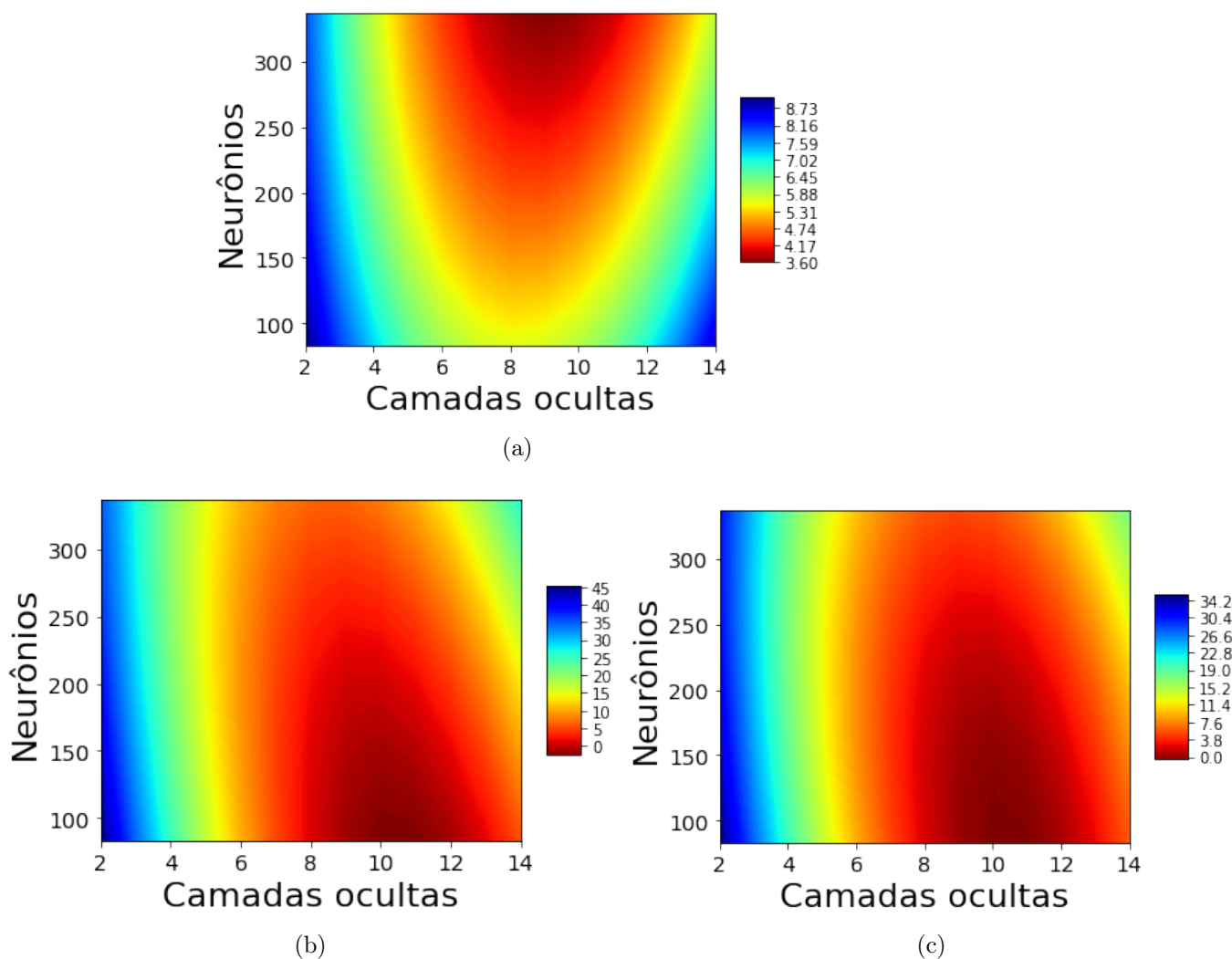


Figura 5.3: Curvas de nível do erro quadrático médio em função do número de neurônios e da quantidade de camadas ocultas. O modelo substituto possui como variável de saída o parâmetro adsorção de lizozima em um adsorvente à base de sílica. Em todos os treinamentos, foram utilizados 1500 pontos pseudo-experimentais e metade das camadas ocultas foram treinadas com a função de ativação ReLU. A segunda metade possui as funções de ativação: (a) ReLU, (b) ELU (c) SELU.

três primeiras camadas possuem 86 neurônios e função de ativação ReLU; as demais camadas apresentam 106 neurônios e função de ativação ELU. Foram utilizados 242 mini-lotes e taxa de aprendizado adaptativo de  $1.0 \cdot 10^{-3}$ , decaindo pela metade a cada 100 iterações (1500 iterações no total). Tem-se com isso um erro quadrático médio para os pontos de teste de  $7.660 \cdot 10^{-4}$  (equivalente a um erro percentual absoluto médio de 7.72%), com  $R^2$  de 0.9422.

Uma boa concordância é observada entre os valores obtidos do modelo treinado com os dados pseudo-experimentais do treino para os três tipos de ânions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$ ). Entretanto, o resultado mostra desvios na região próxima à unidade, caracterizados quando a força iônica tende a 50 mM. Estes desvios são reduzidos com

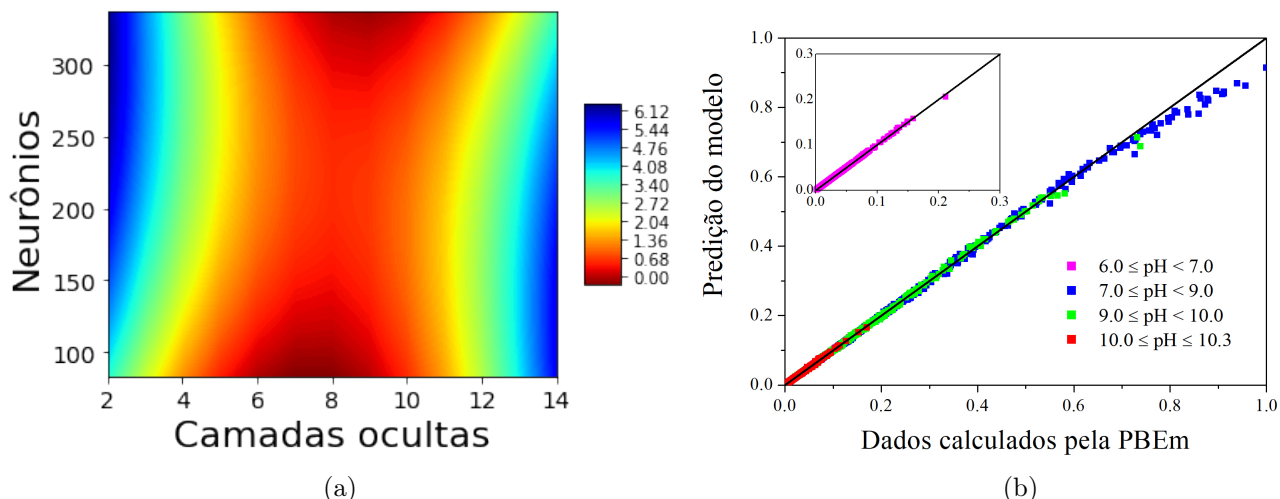


Figura 5.4: É observado na Figura (a) a curvas de nível do erro quadrático médio em função do número de neurônios e da quantidade de camadas ocultas para 24000 pontos pseudo-experimentais, utilizando o parâmetro de Henry entre lisozima—SBA-15. O modelo aplica funções de ativação mista ReLU/ELU. Na Figura (b) nota-se o resultado do treinamento da rede neuronal, utilizando 6 camadas ocultas. Os valores estão normalizados de acordo com o maior ponto reportado.

o aumento da concentração de eletrólitos na faixa de pH entre 7.0 e 9.0, apresentando boa concordância a partir de 0.80, que está associado à força iônica de 0.1 M.

Diante disso, aplica-se aqui uma outra metodologia com o objetivo de criar um modelo que corresponda a toda faixa de dados. Logo, o treinamento do modelo, com base em redes neuronais, foi realizado utilizando os valores otimizados pelo software Optuna (Método 03, Seção 5.1). Desta forma, apresenta-se como objetivo diminuir a influência do método de tentativa e erro na seleção dos hiper-parâmetros. Com isso, nota-se na Figura 5.5(a) o resultado para o treinamento do modelo considerando 1500 pontos pseudo-experimentais. Dos hiper-parâmetros, o modelo foi treinado contendo 12 camadas ocultas, sendo que: as seis primeiras camadas possuem 400 neurônios e função de ativação ReLU; as demais camadas apresentam 120 neurônios e função de ativação ELU e camada de saída exponencial. Foram utilizados 224 mini-lotes e taxa de aprendizado adaptativo de  $9.720 \cdot 10^{-5}$ , decaindo pela metade a cada 150 iterações (1500 iterações no total). Tem-se com isso um erro percentual absoluto médio para os pontos de teste 2.13%, com  $R^2$  de 0.9977.

Apesar do baixo erro percentual e de um  $R^2$  próximo à unidade, a quantidade de pontos característicos para regiões diluídas é pouco representativa (valores próximos de 1.0 na Figura 5.5(a)). Nota-se na Figura 5.5(b) um novo treinamento, realizado para 24000 pontos pseudo-experimentais (sendo 70% separado para a etapa de treino e 30% para a etapa de teste). Similar ao caso anterior, os hiper-parâmetros foram selecionados pelo Optuna, em que a rede neuronal foi treinada contendo 12 camadas

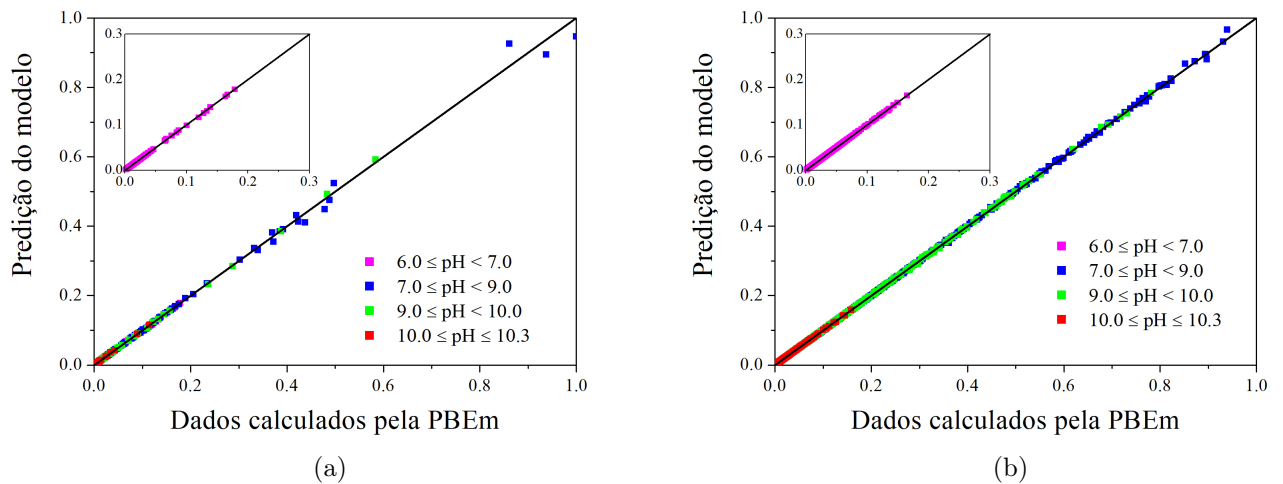


Figura 5.5: Comparação entre os valores preditos pelo modelo substituto e os dados relativos ao parâmetro de adsorção do conjunto de teste dos: (a) 1500 pontos e (b) 24000 pontos pseudo-experimentais. Os valores estão normalizados de acordo com o maior ponto reportado no conjunto aplicado.

ocultas, sendo que: as seis primeiras camadas possuem 80 neurônios e função de ativação ELU; as demais camadas apresentam 360 neurônios e função de ativação ReLU; e camada de saída exponencial. Foram utilizados 256 mini-lotes e taxa de aprendizado adaptativo de  $3.539 \cdot 10^{-6}$ , decaindo pela metade a cada 150 iterações (1500 iterações no total). Tem-se com isso um erro percentual absoluto médio para os pontos de teste 0.61%, com  $R^2$  de 0.9999.

O uso de 1500 pontos pseudo-experimentais apresentou um desempenho mediano em todas as metodologias aplicadas, sendo necessária a aplicação de mais pontos para o treinamento da rede neuronal. Contudo, o uso de 24000 pontos atendeu aos critérios de obtenção de um modelo substituto com uma ótima predição para uma ampla faixa de pH e tipo de íons em solução. Vale ressaltar que a escolha da quantidade de pontos pseudo-experimentais foi arbitrária.

### Evolução da frente de massa de lisozima em leito fixo

Os resultados do perfil de transferência de massa da lisozima são observado na Figura 5.6. Estes resultados foram obtidos ao acoplar o modelo substituto, treinado com 24000 pontos pseudo-experimentais, no modelo de isoterma presente no balanço de massa da coluna de leito fixo. Conforme descrito na metodologia proposta (Tabela 5.1), uma taxa de variação de força iônica de  $8.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$  é aplicada em todos os perfis apresentados nesta seção. Logo, no início do tempo de operação, a força iônica é quase nula e aumenta de forma gradativa conforme o tempo estabelecido pela condição operacional.

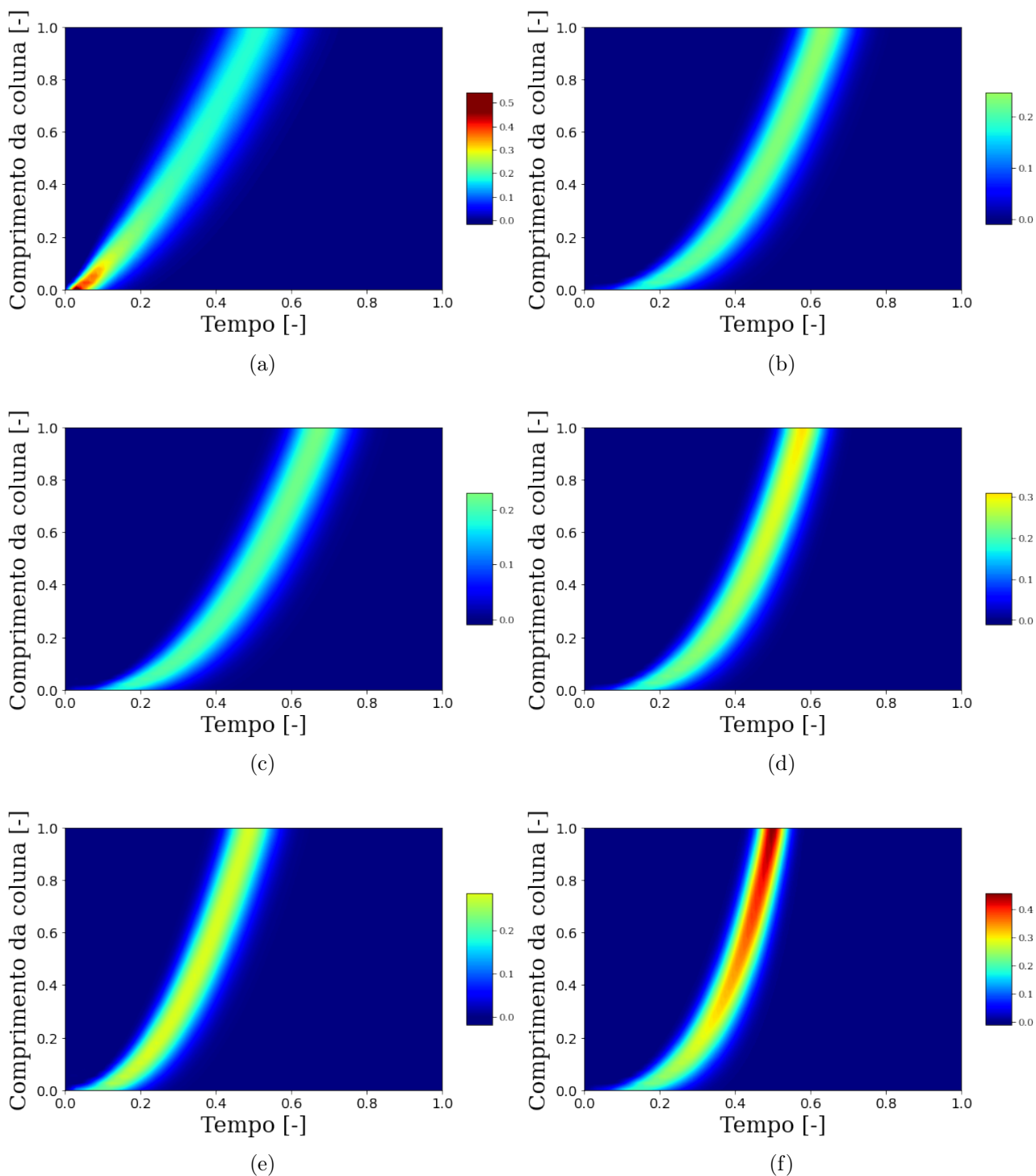


Figura 5.6: Perfis de concentração da lisozima em uma coluna de troca iônica empacotada com um adsorvente à base de sílica nos pHs: (a) 6.0, (c) 8.0 e (e) 10.0 na presença de um gradiente linear da concentração de NaCl. Os demais perfis foram modelados em pH fixo de 9.0, na presença de um gradiente linear da concentração de eletrólitos de: (b) NaCl; (d) NaBr; e (f) NaI.  $T = 25^{\circ}\text{C}$ . Todos os perfis foram modelados na presença de um gradiente linear da concentração de sal de  $8.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$  em  $25^{\circ}\text{C}$ , independente do sal utilizado. As mudanças de cores estão relacionadas à concentração ( $C/C_0$ , para  $C_0 = 1 \text{ mol L}^{-1}$ ) da proteína: **vermelho**, para a região de pontos próximos a 0.6; **azul**, tendendo à diluição infinita.

Pode-se observar um acúmulo da concentração de proteína para o perfil em pH 6.0, no início do leito fixo. Esse acontecimento pode estar associado ao acentuado decaimento do parâmetro de Henry para baixas concentrações de eletrólitos neste pH (Figura 4.13).

As Figuras 5.6 (a)(c)(e) indicam que as frentes de massa da lisozima em leito fixo, para os pHs 6.0 e 10.0, apresentam um tempo de retenção menor que para o pH 8.0. Conforme apontado pelas informações de densidades de grupos iônicos (Figura 4.9), o pH 6.0 mostra que a fase estacionária possui uma densidade de grupos ( $\sigma_2$ ) reduzida. De forma similar, a proteína apresenta a densidade de grupos ( $\sigma_1$ ), para o pH 10, próximo ao ponto de carga zero. Nestas duas condições, a interação entre proteína—adsorvente resume-se pelo potencial de Hamaker. Para o pH 8.0, tanto  $\sigma_1$  como  $\sigma_2$  apresentam valores não nulos. Logo, a proteína é retida por um maior tempo no leito fixo devido à contribuição eletrostática neste sistema.

Com o objetivo de avaliar se o perfil de concentração da proteína é função da especificidade dos íons, aplica-se aqui uma taxa de variação de força iônica para diferentes ânions no pH 9.0 (Figuras 5.6(b)(d)(f)). A escolha desse pH reflete-se no maior valor da capacidade de adsorção, conforme observado pela Figura 4.14(a).

Como a lisozima apresenta carga positiva em pH 9.0, os ânions possuem tendência maior de estarem presentes nas vizinhanças da superfície da proteínas. Pela Tabela 4.1, tem que o valor da constante de dispersão adimensional é crescente na seguinte ordem:  $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$ . A constante de dispersão do íon  $\text{I}^-$  é 1.60 vezes maior que o valor para  $\text{Cl}^-$  e 1.29 vezes maior que para o íon  $\text{Br}^-$ . Portanto, é esperado que o íon iodeto tenha uma maior interação com a superfície da proteína, promovendo um superior efeito de blindagem eletrostática. Por conta disso, a proteína apresenta um acentuado decaimento da densidade de carga superficial com o aumento da concentração deste eletrólito. Logo, o tempo de retenção é reduzido devido à intensidade da interação entre proteína—adsorvente.

Por conta dessa acentuada diminuição da interação entre as superfícies pelo efeito do íon  $\text{I}^-$ , além da diminuição do tempo de retenção, observa-se aumento da concentração de proteínas na saída do leito. Nota-se pela Figura 4.14 que os efeitos termodinâmicos estão devidamente respeitados de acordo com os parâmetros calculados pela teoria Lifshitz, mostrando o sucesso do treinamento da rede neuronal. Até o presente momento, a literatura desconhece resultados que tenham utilizado a metodologia proposta aqui para a descrição do comportamento de adsorção de proteína(s) em leito fixo.

As Figuras 5.7(a) e (b) apresentam o perfil de eluição da proteína na saída do leito fixo para os sistemas analisados previamente. Nestas figuras encontram-se, de forma mais clara, a inclinação da taxa de variação de força iônica utilizada neste estudo. É observado na Figura 5.7(a) a compressão da frente de massa ao longo

da saída da coluna de acordo com o pH, em que é utilizado somente NaCl para o gradiente linear de concentração iônica; na Figura 5.7(b), a compressão da frente de massa ocorre de acordo com o tipo de íon utilizado no gradiente de concentração.

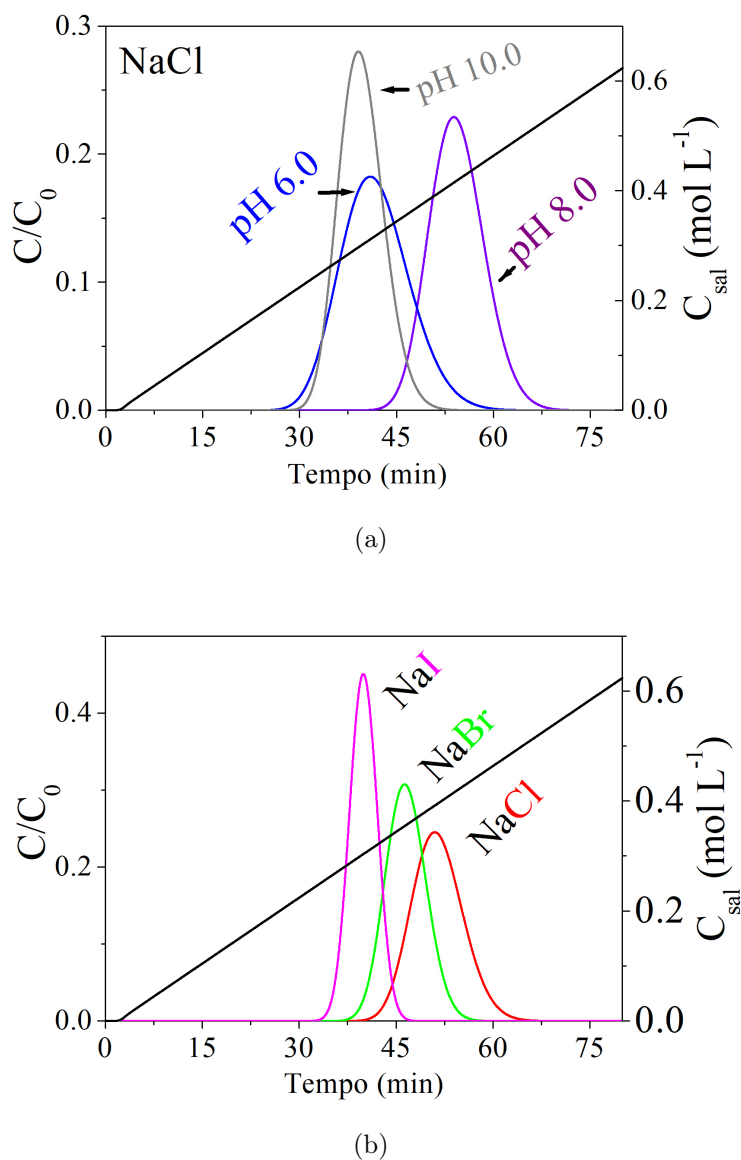


Figura 5.7: Perfis de eluição na saída do leito fixo para as condições reportadas na: (a) Figuras 5.6 (a)(c)(e), para diferentes condições de pH e (b) Figuras 5.6 (b)(d)(f), para diferentes interações com ânions. As especificações do leito fixo são apresentadas na Tabela 5.1.

É importante ressaltar que  $\sigma$  é função do pH, da força iônica e do tipo de íon presente em solução. Variações das condições da fase fluida afetam  $\sigma$  e, conseqüentemente, o valor de  $K$ . Como observado no perfil do parâmetro de Henry na Figura 4.13,  $K$  apresenta, em média, um maior valor entre os pHs 7 e 9. Um baixo valor de  $K$  é mais pronunciado para pH igual a 10.3, próximo ao ponto de carga neutra. Logo, para os sistemas contendo somente NaCl (Figura 5.7(a)), sugere-se



que a compressão da frente de massa e a ordem de eluição, estão relacionados ao valor de  $K$ . Como é observado, para pH 8, a proteína apresenta maior retenção no leito; para o pH 10.0, a retenção é diminuída e o perfil apresenta compressão maior que para os pHs menores. Observa-se na Figura 5.7(b) que o efeito do íon iodeto diminui significativamente o tempo de retenção da proteína na coluna de troca iônica, bem como em uma melhor definição do perfil de eluição.

O perfil de concentração da proteína na saída do leito fixo pode apresentar um perfil similar à distribuição Gaussiana, como reportado por Kumar et al. [102] para mAbs em um adsorvente comercial (Fractogel  $\text{SO}_3^-$ ). O grau de alongamento de uma distribuição é medido com base na curtose, definida como a razão do quarto momento central pelo desvio-padrão. Logo, aplica-se aqui para melhor análise da compressão da frente de massa de acordo com os valores da curtose dos perfis de eluição. Os valores foram calculados utilizando o pacote Scipy em Python<sup>3</sup>.

A Tabela 5.3 apresenta a curtose para os perfis de eluição apresentados nas Figuras 5.7(a) e (b). A razão do maior valor da curtose entre a variação de íon com a variação de pH é de 1.74. Logo, conclui-se que o efeito da blindagem eletrostática apresenta maior compressão da frente de massa em relação a variações do pH.

Tabela 5.3: Medição da curtose para as diferentes frentes de massa na eluição da coluna em leito fixo para lisozima.  $T = 25^\circ\text{C}$ .

	NaCl		
pH	6.0	8.0	10.0
Curtose	6.65	5.96	7.90
	pH 9.0		
Tipo de íon	NaCl	NaBr	NaI
Curtose	6.70	8.80	13.77

### 5.2.1 Perfis de concentração de misturas de proteínas em leito fixo

Aqui, o modelo substituto foi treinado com os dados pseudo-experimentais dos perfis estimados dos mAbs S1, S2, W1, W2 e W3 (Figura 4.8). As variáveis de entrada no treinamento da rede foram: pH, força iônica, o tipo de íon (de acordo com o valor adimensional da constante de dispersão); e considera-se a densidade de grupamentos carboxílicos, amino e histidina para cada proteína.

Conforme reportado pela Tabela 4.5, o mAb W1 apresenta o menor valor de densidade de carga superficial, o que acarreta em uma menor interação com o adsorvente; enquanto que o mAb S2 apresenta o maior valor de densidade de carga

<sup>3</sup><https://docs.scipy.org/doc/scipy/reference/generated/scipy.stats.kurtosis.html>

superficial entre as mAbs estudadas. Pela ordem de afinidade das mAbs com o adsorvente:  $W1 < P < S2$ . Por este motivo, negligenciou-se o perfil do mAb P na etapa de treinamento para avaliar o carácter preditivo do modelo substituto. Foram gerados 24000 pontos para cada mAb pela técnica LHS, totalizando 120 000 pontos pseudo-experimentais (70/30). Observou-se um enorme custo computacional durante a otimização por meio do Optuna devido à vasta quantidade de pontos. Após um período de 72 h, a otimização pelo Optuna foi rejeitada e o modelo foi treinado pelo método de tentativa e erro.

Nota-se pela Figura 5.8 a predição via do modelo substituto ao comparar a variável de saída do modelo com os dados experimentais do mAb P, reportada na literatura para NaCl [7]. As variáveis de entrada no modelo substituto foram: o valor de  $B/(r_{ion}^3 \kappa_B T)$  para  $Cl^-$  (Tabela 4.1), pH, força iônica e os valores de  $\Gamma$  do mAb P (Tabela 4.5).

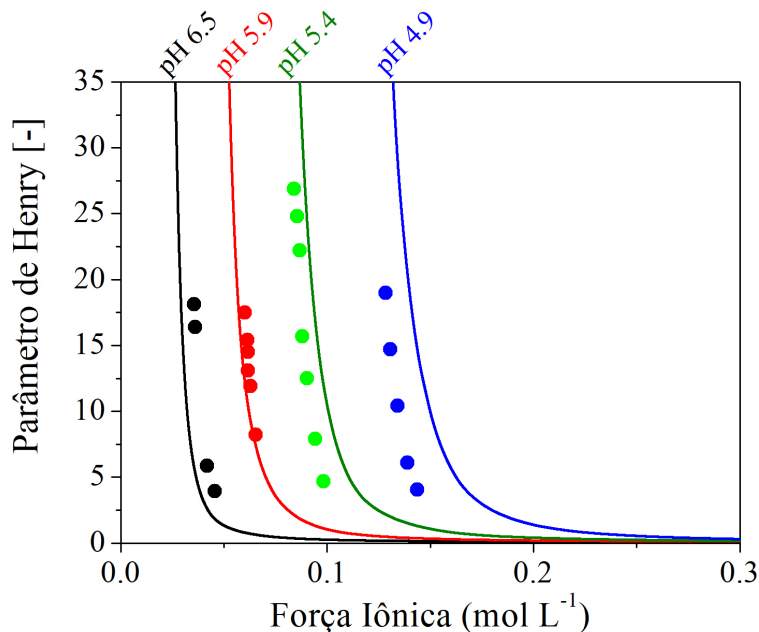


Figura 5.8: Predição do parâmetro de Henry gerado pelo modelo substituto para o mAb P com YMC BioPro SP (10  $\mu$ m) como adsorvente. Os pontos são os dados experimentais provenientes da literatura [7].  $T = 25^{\circ}C$ .

Aplicaram-se os seguintes hiper-parâmetros: 12 camadas ocultas, sendo que as seis primeiras camadas possuem 120 neurônios e função de ativação ReLU; as demais camadas apresentam 140 neurônios e função de ativação ELU; e camada de saída exponencial. Foram utilizados 512 mini-lotes e taxa de aprendizado adaptativo de  $1.882 \cdot 10^{-4}$ , decaindo pela metade a cada 100 iterações (1500 iterações no total). Tem-se com isso um erro percentual absoluto médio para os pontos de teste 0.48%, com  $R^2$  de 0.9999.

Foi gerado pelo método de tentativa e erro uma excelente concordância da

variável treinada com a variável de teste, como pode ser observado pelo valor do erro percentual absoluto médio e do  $R^2$ . Os desvios observados pela predição dos perfis do parâmetro de Henry (Figura 5.8) são variações referentes à Equação 3.15 com os dados experimentais provenientes da literatura [7].

De forma similar à metodologia aplicada para lizozima-SBA-15, observa-se na Figura 5.9 o resultado do uso do modelo substituto ao resolver o balanço de massa em leito fixo para um sistema multicomponente contendo as 6 (seis) mAbs em leito fixo. Como variáveis de entrada, além das condições da fase fluida, os mAbs são diferenciados no modelo de acordo com os valores de  $\Gamma$  da Tabela 4.5. Para esta seção, aplica-se pH igual a 5.4 e gradiente linear da força iônica de  $1.17 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

Para as Figura 5.9 (a), (c) e (e), observa-se um grande acúmulo de massa no início do leito fixo. Esse comportamento já é esperado, visto que todas os mAbs são inseridas simultaneamente para a análise multicomponente do fenômeno de adsorção teórico. Como cada mAb possui uma densidade de carga superficial característica, conseqüentemente tem-se que cada proteína apresentará uma interação distinta com o adsorvente. Por conta destas diferentes interações mAbs—adsorvente, observa-se a separação dos perfis de concentração durante o processo de transferência de massa ao longo do leito fixo. Nota-se na Figura 5.9 (b) o perfil de eluição de cada mAb, bem como o valor da força iônica na saída do leito fixo. Para as Figuras 5.9 (a) e (b), o gradiente da força iônica refere-se aos íons  $[\text{Na}^+]$  e  $[\text{Cl}^-]$ .

Para a Figura 5.9 (c), a única distinção é o uso de um gradiente linear da força iônica para os íons  $[\text{Na}^+][\text{Br}^-]$ . Por conta da polarizabilidade do íon  $\text{Br}^-$  ser maior que o íon  $[\text{Cl}^-]$ , tem-se o efeito de blindagem eletrostática na superfície das proteínas. Logo, as proteínas tornam-se menos carregadas e a interação mAbs—adsorvente é reduzida. Este efeito é melhor observado na Figura 5.9 (d), pois a polarizabilidade do íon  $\text{I}^-$  é  $\approx 30\%$  maior que o íon  $\text{Br}^-$ . Logo, o efeito de blindagem eletrostática é mais pronunciado para o íon iodeto, com uma compressão da frente de massa de todos os perfis ao longo do processo de separação.

Como o adsorvente possui carga negativa, o mAb com maior quantidade de grupos carboxila irá eluir primeiro. Em contraste, o mAb com maior quantidade de grupos amino tenderá a eluir de forma mais demorada devido a uma maior interação com o adsorvente. Portanto, a ordem de eluição está de acordo com a análise de densidade de grupos iônicos ( $\Gamma$ ) para cada proteína:  $W1 < W2 < W3 < P < S1 < S2$ . É ainda observado que mudar o íon  $\text{Cl}^-$  para o íon  $\text{Br}^-$ , ou  $\text{I}^-$ , influencia em uma rápida eluição do mAb P. Este tipo de comportamento pode ser explorado em trabalhos futuros para otimização de processos de separação.

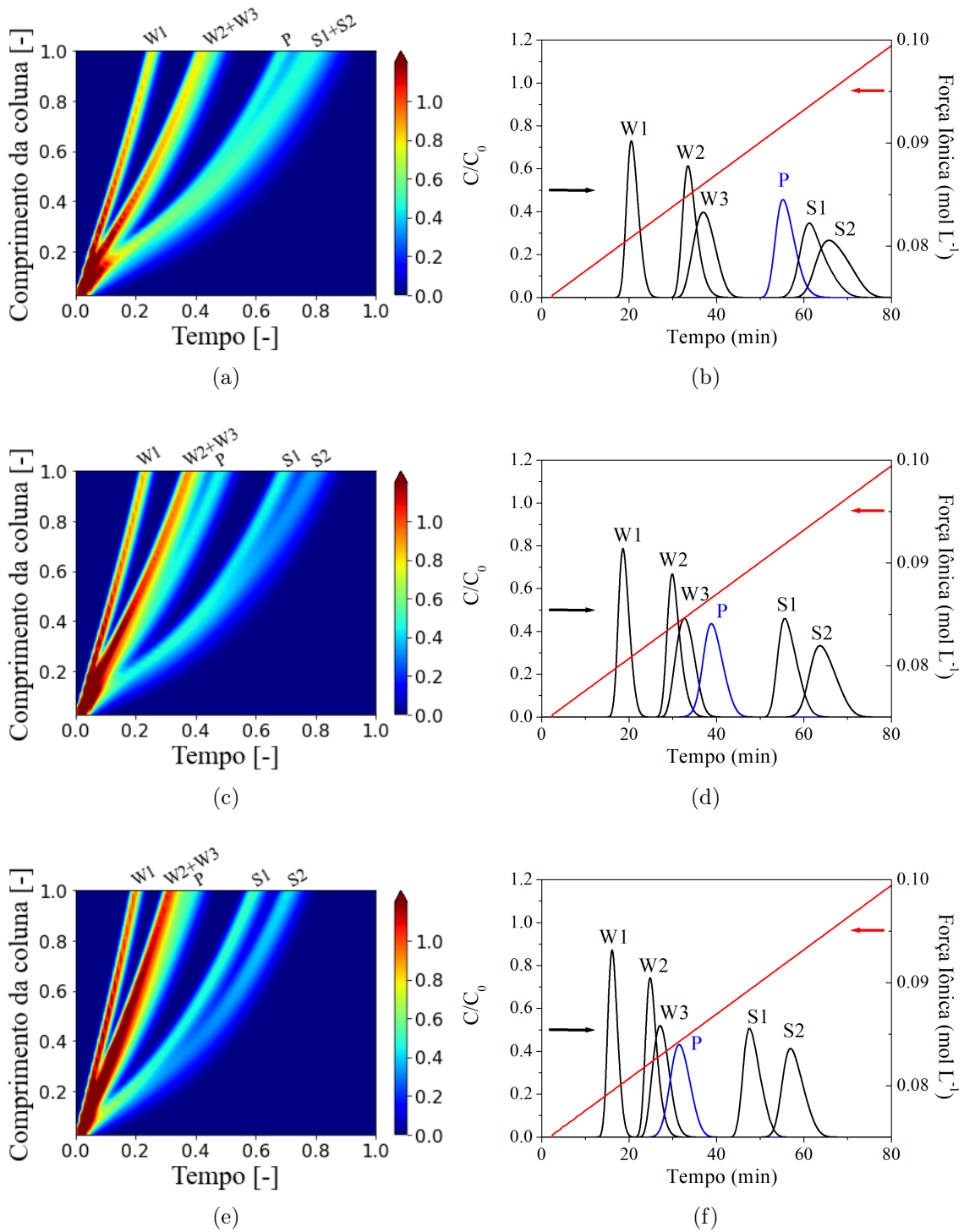


Figura 5.9: Evolução da concentração dos diferentes mAbs em um leito fixo empacotado com YMC BioPro SP (10  $\mu$ m). Os perfis foram gerados considerando um gradiente linear de íons para os sais: (a) e (b) para NaCl, (c) e (d) para NaBr; e (e) e (f) para NaI. As Figuras (b), (d) e (f) são os perfis de eluição das proteínas na saída da coluna, associados, respectivamente, as Figuras (a), (c) e (e). Todos os perfis foram modelados na presença de um gradiente linear da concentração de sal de  $1.17 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , independente do sal utilizado.  $C_0 = 1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5.4 e  $T = 25^\circ\text{C}$ .

# Capítulo 6

## Conclusões e Sugestões

As conclusões dividem-se de acordo com os capítulos apresentados.

Capítulo 4 - Nesta tese, foi calculado o potencial de campo médio para a interação proteína—adsorvente utilizando a equação de Poisson-Boltzmann em coordenadas esféricas, em que são considerados o pH, força iônica, temperatura e o tipo de íon. Foi utilizado o PMF para obtenção do parâmetro de Henry para três proteínas em três diferentes tipos de adsorventes comerciais utilizados em colunas de troca iônica, mostrando uma boa performance ao comparar com dados experimentais providos da literatura. Em adição, observam-se que os efeitos dos íons seguem a série aniônica de Hofmeister para diferentes valores do pH. Comparando o PMF, os ânions mostraram ser os grandes responsáveis pela interação eletrostática para a superfície da proteína. Para a série de cátions, o íon  $\text{Sr}^{2+}$  mostrou um comportamento diferenciado em comparação com os demais cátions monovalentes, provavelmente devido a sua polarizabilidade e por ser um cátion divalente. Aplicou-se, também, a solução da equação não-linear de Poisson-Boltzmann, em coordenadas esféricas, para obtenção do parâmetro de Henry da interação entre lisozima—SBA-15. A densidade de carga superficial da lisozima foi calculada com base nos aminoácidos presentes em sua superfície, sendo aplicado para o cálculo do parâmetro de afinidade. O resultado apresentado mostrou que o conhecimento da natureza de interação proteína—adsorvente pode ser descrita com base termodinâmica, sendo capaz de descrever uma série de isotermas de adsorção. Neste estudo, foi necessária a estimação de um único parâmetro relacionado a geometria do material. Vale ressaltar que nenhum parâmetro foi estimado para o cálculo do PMF. De forma similar ao estudo de anticorpos monoclonais, a polarizabilidade dos íons apresentou um importante papel na análise das isotermas. Com o aumento do valor da polarizabilidade, o valor do parâmetro de Henry é reduzido por conta da blindagem eletrostática.

Diante do exposto, a metodologia proposta foi testada durante a descrição dos fenômenos físico-químicos da interação entre proteína—adsorvente, tendo apresentado resultados excelentes para obtenção de isotermas de adsorção de lisozima em sílica para diferentes pHs e concentrações de íons;

Capítulo 5 - Diferentes modelos empíricos com base em aprendizado de máquina foram treinados para correlacionar o parâmetro de Henry com o pH, força iônica, tipo de íons em solução e a densidade de grupamentos iônicos na superfície da proteína. Para os diferentes sistemas estudados, o modelo substituto foi acoplado à equação de Langmuir e utilizado, posteriormente, no balanço de massa da coluna em leito fixo. Para lisozima—SBA-15, foi possível observar um excelente resultado no treinamento para uma ampla faixa de força iônica, considerando sistemas contendo os três tipos de ânions: ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$ ). Mostrou-se, pelo perfil de concentração da proteína em leito fixo, considerando um gradiente linear de força iônica ( $\text{NaCl}$ ) para três diferentes pHs, que as informações de interação proteína—adsorvente foram devidamente repassadas ao modelo substituto. Desta forma, o perfil de eluição apresenta concordância com os fenômenos físico-químicos descritos no Capítulo 4. Logo, ao modificar o tipo de íon do gradiente de força iônica, foi possível observar o efeito de especificidade pela diminuição do tempo de retenção da proteína. Para os ensaios multicomponentes, foi possível utilizar um único modelo substituto para informar o valor de  $K$  de 6 (seis) mAbs, variantes entre si. A ordem de eluição segue a ordem de afinidade entre mAb—adsorvente:  $W1 < W2 < W3 < P < S1 < S2$ ; além disso, para todos os perfis, o aumento da polarizabilidade do íon no modelo induz em uma compressão da frente de massa da proteína. Os resultados mostram aqui que um modelo substituído, treinado com informações provenientes de um modelo robusto, pode, e deve, ser utilizado em substituição a modelos analíticos não-preditivos, para a descrição de propriedades macroscópicas de proteínas.

Sugestões para trabalhos futuros:

Os cálculos dos efeitos eletrostáticos representam importantes passos na otimização de processos de separação de proteínas em leito fixo. Como sugestão para etapas futuras, podem ser incluídos no cômputo do PMF efeitos de diferentes tamanhos de íons e correlações eletrostáticas íon-íon. Estes efeitos podem ser relevantes em sistemas contendo elevadas concentrações de eletrólitos em solução;

Para melhorar a modelagem termodinâmica do cômputo do potencial de campo médio entre proteína e adsorvente, propõe-se utilizar a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) clássica. A utilização da DFT permite incluir efeitos de tamanhos de íons e correlações eletrostáticas, da não esfericidade das proteínas e pontos de cargas explicitamente definida, além da heterogeneidade energética das superfícies;

Conforme reportado nesta tese, os modelos substitutos que foram treinados com base na técnica de aprendizado de máquina, apresentaram doze camadas interna e uma quantidade acima de 100 neurônios em cada camada. Como sugestão, uma combinação de diferentes metodologias para o treinamento de modelos empíricos pode ser exploradas em trabalhos futuros. Desta forma, o uso de abordagens híbridas pode ser útil na geração de modelos empíricos com menor quantidade parâmetros a serem treinados.

# Referências Bibliográficas

- [1] M. Schulte, M. Jöhnck, R. Skudas, K. K. Unger, C. du Fresne von Hohenesche, W. Wewers, J. Dingenen, and J. Kinkel, *Stationary Phases and Chromatographic Systems*, ch. 3, pp. 47–198. John Wiley & Sons, Ltd, 2012.
- [2] D. Ruthven, *Principles of Adsorption and Adsorption Processes*. Wiley-Interscience publication, US: Wiley, 1984.
- [3] R. Mackenzie, “Origin and development of differential thermal analysis,” *Thermochimica Acta*, vol. 73, no. 3, pp. 307–367, 1984.
- [4] T. Hill, *An Introduction to Statistical Thermodynamics*. Dover Books on Physics, New York, US: Dover Publications, 1960.
- [5] R. A. Latour, “The langmuir isotherm: A commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 103, no. 3, pp. 949–958, 2015.
- [6] S. M. L. d. Santos, K. A. B. Nogueira, M. d. S. Gama, J. D. F. Lima, I. J. d. Silva Júnior, and D. C. S. d. Azevedo, “Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica (sba-15 and sba-16) for adsorption of biomolecules,” *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 180, pp. 284–292, 2013.
- [7] B. Guélat, G. Ströhlein, M. Lattuada, L. Delegrange, P. Valax, and M. Morbidelli, “Simulation model for overloaded monoclonal antibody variants separations in ion-exchange chromatography,” *Journal of chromatography. A*, vol. 1253, pp. 32–43, 07 2012.
- [8] F. E. Galdino, A. S. Picco, M. L. Sforca, M. B. Cardoso, and W. Loh, “Effect of particle functionalization and solution properties on the adsorption of bovine serum albumin and lysozyme onto silica nanoparticles,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 186, p. 110677, 2020.
- [9] Y. Abiko, Y. Yamada, T. Hayasaki, Y. Kimura, A. A. Almarasy, and A. Fujimori, “Adsorption immobilization of biomolecules from subphase on langmuir



- monolayers of organo-modified single-walled carbon nanotube,” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 621, p. 126559, 2021.
- [10] D. S. Franco, F. A. Duarte, N. P. G. Salau, and G. L. Dotto, “Analysis of indium (iii) adsorption from leachates of lcd screens using artificial neural networks (ann) and adaptive neuro-fuzzy inference systems (anifs),” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 384, p. 121137, 2020.
- [11] P. Pauletto, J. Gonçalves, L. Pinto, G. Dotto, and N. Salau, “Single and competitive dye adsorption onto chitosan-based hybrid hydrogels using artificial neural network modeling,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 560, pp. 722–729, 2020.
- [12] R. R. Schio, N. P. G. Salau, E. S. Mallmann, and G. L. Dotto, “Modeling of fixed-bed dye adsorption using response surface methodology and artificial neural network,” *Chemical Engineering Communications*, vol. 208, no. 8, pp. 1081–1092, 2021.
- [13] J. L. Fagundez, M. S. Netto, G. L. Dotto, and N. P. Salau, “A new method of developing ann-isotherm hybrid models for the determination of thermodynamic parameters in the adsorption of ions  $ag^+$ ,  $co_2^+$  and  $cu_2^+$  onto zeolites zsm-5, hy, and 4a,” *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 9, no. 5, p. 106126, 2021.
- [14] M. S. Netto, J. S. Oliveira, N. P. Salau, and G. L. Dotto, “Analysis of adsorption isotherms of  $ag^+$ ,  $co_2^+$ , and  $cu_2^+$  onto zeolites using computational intelligence models,” *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 9, no. 1, p. 104960, 2021.
- [15] P. Pauletto, S. Lütke, G. Dotto, and N. Salau, “Forecasting the multicomponent adsorption of nimesulide and paracetamol through artificial neural network,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 412, p. 127527, 2021.
- [16] L. Moreira, M. Boström, B. Ninham, E. Biscaia, and F. Tavares, “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*, vol. 282-283, pp. 457–463, 2006.
- [17] L. A. Moreira, M. Boström, B. W. Ninham, E. C. Biscaia, and F. W. Tavares, “Effect of the ion-protein dispersion interactions on the protein-surface and protein-protein interactions,” *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 18, pp. 223 – 230, 00 2007.

- [18] P. H. R. Alijó, F. W. Tavares, and E. C. B. Jr., “Double layer interaction between charged parallel plates using a modified poisson–boltzmann equation to include size effects and ion specificity,” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 412, pp. 29 – 35, 2012.
- [19] E. R. A. Lima, F. W. Tavares, and E. C. Biscaia Jr, “Finite volume solution of the modified poisson-boltzmann equation for two colloidal particles,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 9, pp. 3174–3180, 2007.
- [20] E. R. A. Lima, E. C. Biscaia, M. Boström, F. W. Tavares, and J. M. Prausnitz, “Osmotic second virial coefficients and phase diagrams for aqueous proteins from a much improved poisson boltzmann equation,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 43, pp. 16055—16059, 2007.
- [21] K. A. B. Nogueira, “Study of biomolecules adsorption (serum albumin bovine and lysozyme) in mesoporous materials,” Master’s thesis, Department of Chemical Engineering - UFC, <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/23216>, 7 2016.
- [22] J. a. Severo Júnior, *Avaliação de Técnicas de Planejamento de Experimentos no Reconhecimento do Equilíbrio de Assorção em Sistemas Cromatográficos*. PhD thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Engenharia Química (COPPE), Rio de Janeiro, 2011.
- [23] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers, 6<sup>th</sup> ed., 2000.
- [24] L. Nicoud, M. Owczarz, P. Arosio, and M. Morbidelli, “A multiscale view of therapeutic protein aggregation: A colloid science perspective,” *Biotechnology Journal*, vol. 10, no. 3, pp. 367–378, 2015.
- [25] M. Ogundele, “A novel anti-inflammatory activity of lysozyme: Modulation of serum complement activation,” *Mediators of inflammation*, vol. 7, pp. 363–5, 02 1998.
- [26] J. K. Mann and T. Ndung’u, “The potential of lactoferrin, ovotransferrin and lysozyme as antiviral and immune-modulating agents in covid-19,” *Future Virology*, vol. 15, no. 9, pp. 609–624, 2020.
- [27] J. R. Lu, T. J. Su, and B. J. Howlin, “The effect of solution ph on the structural conformation of lysozyme layers adsorbed on the surface of water,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 103, no. 28, pp. 5903–5909, 1999.

- [28] T. J. Vidal, T. A. Figueiredo, and V. L. E. Pepe, “The brazilian market for monoclonal antibodies used in cancer treatment,” *Cad. Saúde Pública (Online)*, vol. 34, no. 12, 2018.
- [29] H. Kaplon, A. Chenoweth, S. Crescioli, and J. M. Reichert, “Antibodies to watch in 2022,” *mAbs*, vol. 14, no. 1, 2022.
- [30] ANVISA, “Anuário estatístico do mercado farmacêutico,” tech. rep., Agência nacional de vigilância sanitária, Brasília, 2018.
- [31] G. B. G. Mosegui, C. M. d. M. V. Vianna, and T. P. Catão, “Profile of federal purchases of monoclonal oncological antibodies in brazil: analysis from 2015 to 2019,” *Brazilian Journal of Health Review*, vol. 4, no. 3, 2021.
- [32] ANVISA, “Anvisa autoriza uso emergencial de novo medicamento contra covid-19,” 2022. Acesso: 2022-03-03.
- [33] C. L. Behr, K. E. Joynt Maddox, E. Meara, A. M. Epstein, E. J. Orav, and M. L. Barnett, “Anti-SARS-CoV-2 Monoclonal Antibody Distribution to High-risk Medicare Beneficiaries, 2020-2021,” *JAMA*, vol. 327, no. 10, pp. 980–983, 2022.
- [34] ANVISA, “Aprovado uso emergencial de anticorpos para tratamento de covid-19,” 2021. Acesso: 2022-03-01.
- [35] ANVISA, “Anvisa aprova o uso emergencial de mais uma associação de anticorpos contra o novo coronavirus,” 2021. Acesso: 2022-03-01.
- [36] ANVISA, “Anvisa autoriza uso emergencial de novo medicamento para covid-19,” 2021. Acesso: 2022-03-01.
- [37] ANVISA, “Anvisa autoriza uso emergencial de mais um medicamento contra covid-19,” 2021. Acesso: 2022-03-01.
- [38] R.-M. Lu, Y.-C. Hwang, I.-J. Liu, C.-C. Lee, H.-Z. Tsai, H.-J. Li, and H.-C. Wu, “Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases,” *Journal of Biomedical Science*, vol. 27, no. 1, 2020.
- [39] H. Yavuz and A. Denizli, *A New Affinity Separation Medium: Supermacroporous Cryogels*. Elsevier Inc., 12 2015.
- [40] P. Lo Nostro and B. W. Ninham, “Hofmeister phenomena: An update on ion specificity in biology,” *Chemical Reviews*, vol. 112, no. 4, pp. 2286–2322, 2012.

- [41] S. Tan and B. C. Yiap, “Dna, rna, and protein extraction: The past and the present,” *Journal of biomedicine & biotechnology*, vol. 2009, p. 574398, 01 2009.
- [42] E. Heinzle, A. P. Biber, and C. L. Cooney, *Development of Sustainable Bioprocesses Modeling and Assessment*. Germany: John Wiley & Sons, 1<sup>st</sup> ed., 2006.
- [43] S. Warreth, *DOWNSTREAM PROCESSING - AN OVERVIEW OF MAB PURIFICATION METHODS*. BioProcess International, 1<sup>st</sup> ed., 2020.
- [44] A. Mehta, M. Tse, J. Fogle, A. Len, R. Shrestha, N. Fontes, B. Lebreton, B. Wolk, and R. van Reis, “Purifying therapeutic monoclonal antibodies,” *Chemical Engineering Progress*, vol. 104, pp. S14–S20, 05 2008.
- [45] Amersham, *Ion Exchange Chromatography - Principles and Methods*. Sweden: AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, ab ed., 1999.
- [46] I. Pinto, M. Aires-Barros, and A. Azevedo, “Multimodal chromatography: Debottlenecking the downstream processing of monoclonal antibodies,” *Pharmaceutical Bioprocessing*, vol. 3, pp. 263–279, 06 2015.
- [47] J. E. Porter, M. R. Ladisch, and K. M. Herrmann, “Ion exchange and affinity chromatography in the scaleup of the purification of alpha-galactosidase from soybean seeds,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 37, no. 4, pp. 356–363, 1991.
- [48] J. Lee, Z. Liu, W.-H. Chen, J. Wei, R. Kundu, R. Adhikari, J. Rivera, P. Gillespie, U. Strych, B. Zhan, P. Hotez, and M. Bottazzi, “Process development and scale-up optimization of the sars-cov-2 receptor binding domain-based vaccine candidate, rbd219-n1c1,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 105, pp. 1–13, 05 2021.
- [49] A. Linares, “A latina scientist co-created a new covid vaccine. she’s nominated for the nobel peace prize,” 2022. Acesso: 06/01/2023.
- [50] E. Salam, “Texas scientists’ new covid-19 vaccine is cheaper, easier to make and patent-free,” 2022. Acesso: 06/01/2023.
- [51] D. Bas, D. Rogers, and J. Jensen, “Very fast prediction and rationalization of pka values for protein-ligand complexes,” *Proteins*, vol. 73, pp. 765–83, 11 2008.

- [52] H. Li, A. Robertson, and J. Jensen, “Very fast empirical prediction and rationalization of protein pka values,” *Proteins*, vol. 61, pp. 704–21, 12 2005.
- [53] A. Yoshito, U. Tadashi, I. Hiroki, H. Yoshio, M. Hiroyuki, T. Yoshitugu, and I. Taiji, “Effect of salt concentration on the pka of acidic residues in lysozyme,” *The Journal of Biochemistry*, vol. 118, no. 5, pp. 946–952, 1995.
- [54] C. Tanford, “Hydrogen ion equilibria of lysozyme,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 76, no. 12, pp. 3331–3336, 1954.
- [55] A. Bonincontro, A. De Francesco, and G. Onori, “Influence of ph on lysozyme conformation revealed by dielectric spectroscopy,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 12, no. 1, pp. 1–5, 1998.
- [56] B. Guélat, G. Ströhlein, M. Lattuada, and M. Morbidelli, “Electrostatic model for protein adsorption in ion-exchange chromatography and application to monoclonal antibodies, lysozyme and chymotrypsinogen a,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, no. 35, pp. 5610–5621, 2010.
- [57] M. Bončina, J. Lah, J. Rescic, and V. Vlachy, “Thermodynamics of the lysozyme-salt interaction from calorimetric titrations,” *The journal of physical chemistry. B*, vol. 114, pp. 4313–9, 03 2010.
- [58] F. Hofmeister, “Archiv für experimentelle pathologie und pharmakologie,” *Pharmakol*, vol. 24, no. 4-5, pp. 247 – 260, 1888.
- [59] K. Werner, “Specific ion effects in colloidal and biological systems,” *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 15, no. 1, pp. 34 – 39, 2010.
- [60] R. L. Baldwin, “How hofmeister ion interactions affect protein stability.,” *Biophysical journal*, vol. 71 4, pp. 2056–63, 1996.
- [61] A. W. Omta, M. F. Kropman, S. Woutersen, and H. J. Bakker, “Negligible effect of ions on the hydrogen-bond structure in liquid water,” *Science*, vol. 301, no. 5631, pp. 347–349, 2003.
- [62] S. Finet, F. Skouri-Panet, M. Casselyn, F. Bonneté, and A. Tardieu, “The hofmeister effect as seen by saxs in protein solutions,” *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 9, no. 1, pp. 112 – 116, 2004.
- [63] N. Schwierz, D. Horinek, U. Sivan, and R. R. Netz, “Reversed hofmeister series—the rule rather than the exception,” *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 23, pp. 10 – 18, 2016.

- [64] J. Loeb, “The Colloidal Behavior of Proteins,” *Journal of General Physiology*, vol. 3, pp. 557–564, 03 1921.
- [65] J. Loeb, “The explanation of the colloidal behavior of proteins,” *Science*, vol. 56, no. 1461, pp. 731–741, 1922.
- [66] J. Li, Y. Cheng, X. Chen, and S. Zheng, “Impact of electroviscous effect on viscosity in developing highly concentrated protein formulations: Lessons from non-protein charged colloids,” *International Journal of Pharmaceutics: X*, vol. 1, p. 100002, 2019.
- [67] S. Yang, Z. Chen, and X. Liu, “Prediction of crystallization of a colloid-protein complex by controlled complex self-assembly at the solution surface,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 14, no. 10, p. 103387, 2021.
- [68] A. Ashfaq, K. Jahan, R. U. Islam, and K. Younis, “Protein-based functional colloids and their potential applications in food: A review,” *LWT*, vol. 154, p. 112667, 2022.
- [69] T. Graham, “X. liquid diffusion applied to analysis,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, vol. 151, pp. 183–224, 1861.
- [70] T. Graham, “On the properties of silicic acid and other analogous colloidal substances,” *Proceedings of the Royal Society of London*, vol. 13, pp. 335–341, 1863.
- [71] S. R. Trotman, “The chemistry and technology of gelatin and glue.,” *Journal of the Society of Chemical Industry*, vol. 41, no. 24, pp. 576R–576R, 1922.
- [72] R. J. Hunter, *Introduction to Modern Colloid Science*. New York: Oxford University Press Inc., 1993.
- [73] S. Grimnes and O. Martinsen, *Bioimpedance & Bioelectricity Basics*. Cambridge, United States: Academic Press, 01 2000.
- [74] Gouy, M., “Sur la constitution de la charge électrique à la surface d’un électrolyte,” *J. Phys. Theor. Appl.*, vol. 9, no. 1, pp. 457–468, 1910.
- [75] D. L. Chapman, “Li. a contribution to the theory of electrocapillarity,” *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 25, no. 148, pp. 475–481, 1913.
- [76] A. Schuster, *On the Number of Electrons conveying the Conduction Currents in Metals*, vol. 7. London, UK: London : Taylor & Francis, 1904.

- [77] P. M. Travis, “Colloids in industry,” *Journal of Chemical Education*, vol. 3, no. 3, p. 324, 1926.
- [78] B. Derjaguin and L. Landau, “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*, vol. 43, no. 1, pp. 30–59, 1993.
- [79] E. J. W. Verwey, J. A. Overbeek, J. T. G. (Jan Theodor Gerard), and J. A. Nes, K van, *Theory of the stability of lyophobic colloids : the interaction of sol particles having an electric double layer*. Holland: New York, Elsevier Pub. Co, 1948.
- [80] E. Hückel and P. Debye, “The theory of electrolytes: I. lowering of freezing point and related phenomena,” *Phys. Z*, vol. 24, pp. 185–206, 1923.
- [81] V. Parsegian, “Van der waals forces: a handbook for biologists, chemists, engineers, and physicists,” *Van Der Waals Forces: A Handbook for Biologists, Chemists, Engineers, and Physicists*, pp. 1–380, 11 2005.
- [82] A. Adamson and A. Gast, *Physical Chemistry of Surfaces*. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 1997.
- [83] H. Hamaker, “The london—van der waals attraction between spherical particles,” *Physica*, vol. 4, no. 10, pp. 1058–1072, 1937.
- [84] S. Vafaei, B. Tomberli, and C. G. Gray, “McMillan-mayer theory of solutions revisited: Simplifications and extensions,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 141, no. 15, p. 154501, 2014.
- [85] N. Rakel, K. C. Bauer, L. Galm, and J. Hubbuch, “From osmotic second virial coefficient (b<sub>22</sub>) to phase behavior of a monoclonal antibody,” *Biotechnology Progress*, vol. 31, no. 2, pp. 438–451, 2015.
- [86] T. Mrozowich, D. Winzor, D. Scott, and T. Patel, “Experimental determination of second virial coefficients by small-angle x-ray scattering: a problem revisited,” *European Biophysics Journal*, vol. 48, 10 2019.
- [87] F. Yin, D. Khago, R. Martin, and C. Butts, “Bayesian analysis of static light scattering data for globular proteins,” *PLOS ONE*, vol. 16, no. 10, 2021.
- [88] L. S. Ettre, “Nomenclature for chromatography (iupac recommendations 1993),” *Pure and Applied Chemistry*, vol. 65, no. 4, pp. 819–872, 1993.
- [89] J. Staahlberg, “Retention models for ions in chromatography,” *Journal of Chromatography A*, vol. 855, no. 1, pp. 3–55, 1999.

- [90] J. Ståhlberg, B. Joensson, and C. Horvath, “Theory for electrostatic interaction chromatography of proteins,” *Analytical Chemistry*, vol. 63, no. 17, pp. 1867–1874, 1991.
- [91] B. W. Ninham and V. Parsegian, “Electrostatic potential between surfaces bearing ionizable groups in ionic equilibrium with physiologic saline solution,” *Journal of Theoretical Biology*, vol. 31, no. 3, pp. 405–428, 1971.
- [92] V. Parsegian and D. Gingell, “On the electrostatic interaction across a salt solution between two bodies bearing unequal charges,” *Biophysical Journal*, vol. 12, no. 9, pp. 1192–1204, 1972.
- [93] M. Boström, D. R. M. Williams, and B. W. Ninham, “Specific ion effects: Why dlvo theory fails for biology and colloid systems,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 87, p. 168103, Oct 2001.
- [94] M. Boström, D. Williams, and B. Ninham, “Specific ion effects: Why the properties of lysozyme in salt solutions follow a hofmeister series,” *Biophysical Journal*, vol. 85, no. 2, pp. 686–694, 2003.
- [95] M. Boström, F. Tavares, S. Finet, F. Skouri-Panet, A. Tardieu, and B. Ninham, “Why forces between proteins follow different hofmeister series for ph above and below pi,” *Biophysical Chemistry*, vol. 117, no. 3, pp. 217–224, 2005.
- [96] F. W. Tavares, D. Bratko, H. W. Blanch, and J. M. Prausnitz, “Ion specific effects in the colloid colloid or protein protein potential of mean force role of salt macroion van der waals interactions,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 26, pp. 9228–9235, 2004.
- [97] A. A. Shahir, K. Khristov, K. T. Nguyen, A. V. Nguyen, and E. Mileva, “Combined sum frequency generation and thin liquid film study of the specific effect of monovalent cations on the interfacial water structure,” *Langmuir*, vol. 34, no. 23, pp. 6844–6855, 2018.
- [98] S. V. Koroleva, P. Korchak, and A. I. Victorov, “Molecular thermodynamic modeling of the specific effect of salt on the aggregation of nonionic surfactants,” *Journal of Chemical & Engineering Data*, vol. 65, no. 3, pp. 987–992, 2020.
- [99] J. N. Israelachvili, “Chapter 13 - van der waals forces between particles and surfaces,” in *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)* (J. N. Israelachvili, ed.), pp. 253–289, Boston: Academic Press, third edition ed., 2011.



- [100] C. A. Haynes and W. Norde, “Globular proteins at solid/liquid interfaces,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 2, no. 6, pp. 517 – 566, 1994.
- [101] G. Guiochon, S. Shirazi, and A. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. Academic Press, 1994.
- [102] V. Kumar, S. Leweke, W. Heymann, E. von Lieres, F. Schlegel, K. Westerberg, and A. M. Lenhoff, “Robust mechanistic modeling of protein ion-exchange chromatography,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1660, p. 462669, 2021.
- [103] S. L. Carnie, D. Y. Chan, and J. Stankovich, “Computation of forces between spherical colloidal particles: Nonlinear poisson-boltzmann theory,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 165, no. 1, pp. 116–128, 1994.
- [104] J. Stankovich and S. L. Carnie, “Electrical double layer interaction between dissimilar spherical colloidal particles and between a sphere and a plate: Nonlinear poisson-boltzmann theory,” *Langmuir*, vol. 12, no. 6, pp. 1453–1461, 1996.
- [105] T. Le, M. Penna, D. Winkler, and I. Yarovsky, “Quantitative design rules for protein-resistant surface coatings using machine learning,” *Scientific Reports*, vol. 9, p. 265, 01 2019.
- [106] R.-Q. Fu, T.-W. Xu, and Z.-X. Pan, “Modelling of the adsorption of bovine serum albumin on porous polyethylene membrane by back-propagation artificial neural network,” *Journal of Membrane Science*, vol. 251, no. 1, pp. 137–144, 2005.
- [107] R. J. Kwaria, E. A. Q. Mondarte, H. Tahara, R. Chang, and T. Hayashi, “Data-driven prediction of protein adsorption on self-assembled monolayers toward material screening and design,” *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 6, no. 9, pp. 4949–4956, 2020.
- [108] A. Moud, “Recent advances in utility of artificial intelligence towards multiscale colloidal based materials design,” *Colloid and Interface Science Communications*, vol. 47, p. 100595, 03 2022.
- [109] N. Ouassil, R. L. Pinals, J. T. D. Bonis-O’Donnell, J. W. Wang, and M. P. Landry, “Supervised learning model predicts protein adsorption to carbon nanotubes,” *Science Advances*, vol. 8, no. 1, p. eabm0898, 2022.

- [110] M. de Souza Gama, M. S. Santos, E. R. de Almeida Lima, F. W. Tavares, and A. G. B. Barreto, “A modified poisson-boltzmann equation applied to protein adsorption,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1531, pp. 74 – 82, 2018.
- [111] P. Moon and D. E. Spencer, *Field Theory Handbook: Including Coordinate Systems Differential Equations and their Solutions*. Berli: Springer-Verlag, 1 st ed., 1961.
- [112] F. Chollet *et al.*, “Keras.” <https://keras.io>, 2015.
- [113] V. Viena, M. Martins, J. Loureiro, A. Ribeiro, A. Rodrigues, and I. Nogueira, “Optimal fragrances formulation using a deep learning neural network architecture: A novel systematic approach,” *Computers & Chemical Engineering*, vol. 150, p. 107344, 05 2021.
- [114] L. Ehrl, Z. Jia, H. Wu, M. Lattuada, M. Soos, and M. Morbidelli, “Role of counterion association in colloidal stability,” *Langmuir*, vol. 25, no. 5, pp. 2696–2702, 2009.
- [115] J.-Y. Lee and I. Han, “A semi-empirical equation for activity coefficients of ions with one parameter,” *Bulletin of the Korean Chemical Society*, vol. 34, 12 2013.
- [116] A. Martell and R. Smith, *Amines*. No. v. 2 in Critical Stability Constants, New York, NY: Springer US, 1975.
- [117] A. Martell and R. Smith, *Other Organic Ligands*. No. v. 3 in Critical Stability Constants, New York, NY: Springer US, 1977.
- [118] A. Martell and R. Smith, *Critical Stability Constants*. No. v. 3 in Critical Stability Constants, New York, NY: Springer US, 1982.
- [119] B. Guélat, L. Delegrange, P. Valax, and M. Morbidelli, “Model-based prediction of monoclonal antibody retention in ion-exchange chromatography,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1298, pp. 17–25, 2013.
- [120] J. M. Scheer, W. Sandoval, J. M. Elliott, L. Shao, E. Luis, S.-C. Lewin-Koh, G. Schaefer, and R. Vandlen, “Reorienting the fab domains of trastuzumab results in potent her2 activators,” *PLOS ONE*, vol. 7, pp. 1–13, 12 2012.
- [121] H. Wen, J. Hao, and S. K. Li, “Characterization of human sclera barrier properties for transscleral delivery of bevacizumab and ranibizumab,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 102, no. 3, pp. 892–903, 2013.

- [122] M. Schwaab, E. C. Biscaia, Jr., J. L. Monteiro, and J. C. Pinto, “Nonlinear parameter estimation through particle swarm optimization,” *Chemical Engineering Science*, vol. 63, no. 6, pp. 1542–1552, 2008.
- [123] S. Balme, R. Guegan, J. Janot, M. Jaber, M. Lepoitevin, P. Déjardin, X. Bourrat, and M. Motelica-Heino, “Structure, orientation and stability of lysozyme confined in layered materials,” *Soft Matter*, vol. 9, pp. 3188–3196, 03 2013.
- [124] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, and G. D. Stucky, “Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 120, no. 24, pp. 6024–6036, 1998.
- [125] E. Vilarrasa-García, J. Cecilia, S. Santos, C. Cavalcante, J. Jiménez-Jiménez, D. Azevedo, and E. Rodríguez-Castellón, “Co<sub>2</sub> adsorption on aptes functionalized mesocellular foams obtained from mesoporous silicas,” *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 187, pp. 125–134, 2014.
- [126] P. I. Ravikovitch and A. V. Neimark, “Characterization of micro- and mesoporosity in sba-15 materials from adsorption data by the nldft method,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 105, no. 29, pp. 6817–6823, 2001.
- [127] L. Travalloni, M. Castier, F. W. Tavares, and S. I. Sandler, “Thermodynamic modeling of confined fluids using an extension of the generalized van der waals theory,” *Chemical Engineering Science*, vol. 65, no. 10, pp. 3088–3099, 2010.
- [128] L. Travalloni, M. Castier, and F. W. Tavares, “Phase equilibrium of fluids confined in porous media from an extended peng–robinson equation of state,” *Fluid Phase Equilibria*, vol. 362, pp. 335–341, 2014. Special Issue on PPEPPD 2013.
- [129] A. Hagemann, J. M. Giussi, and G. S. Longo, “Use of ph gradients in responsive polymer hydrogels for the separation and localization of proteins from binary mixtures,” *Macromolecules*, vol. 51, no. 20, pp. 8205–8216, 2018.
- [130] M. Ide, M. El-Roz, E. De Canck, A. Vicente, T. Planckaert, T. Bogaerts, I. Van Driessche, F. Lynen, V. Van Speybroeck, F. Thybault-Starzyk, and P. Van Der Voort, “Quantification of silanol sites for the most common mesoporous ordered silicas and organosilicas: total versus accessible silanols,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, pp. 642–650, 2013.

- [131] M. Onizhuk, A. Panteleimonov, Y. Kholin, and V. Ivanov, “Dissociation constants of silanol groups of silic acids: Quantum chemical estimations,” *Journal of Structural Chemistry*, vol. 59, pp. 261–271, 03 2018.
- [132] F. L. Leite, C. C. Bueno, A. L. Da Róz, E. C. Ziemath, and O. N. Oliveira, “Theoretical models for surface forces and adhesion and their measurement using atomic force microscopy,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 10, pp. 12773–12856, 2012.
- [133] K. Leung, I. M. B. Nielsen, and L. J. Criscenti, “Elucidating the bimodal acid-base behavior of the water-silica interface from first principles,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, no. 51, pp. 18358–18365, 2009.
- [134] A. Kravchenko, E. Demianenko, O. Tsendra, V. Lobanov, A. Grebenyuk, and M. Terets, “Simulation of the interaction between silica surface and acid or alkaline aqueous media,” *Collection <<Surface>>*, vol. 7, no. 22, p. 36–41, 2015. (In Ukrainian).
- [135] J. Yang, H. Su, C. Lian, Y. Shang, H. Liu, and J. Wu, “Understanding surface charge regulation in silica nanopores,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 22, pp. 15373–15380, 2020.
- [136] A. Salis, M. S. Bhattacharyya, and M. Monduzzi, “Specific ion effects on adsorption of lysozyme on functionalized sba-15 mesoporous silica,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 114, no. 23, pp. 7996–8001, 2010.
- [137] L. F. M. Franco and P. d. A. Pessôa Filho, “On the solubility of proteins as a function of ph: Mathematical development and application,” *Fluid Phase Equilibria*, vol. 306, no. 2, pp. 242–250, 2011.
- [138] M. S. Bhattacharyya, P. Hiwale, M. Piras, L. Medda, D. Steri, M. Piludu, A. Salis, and M. Monduzzi, “Lysozyme adsorption and release from ordered mesoporous materials,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 114, no. 47, pp. 19928–19934, 2010.
- [139] H. Webb, B. M. Tynan-Connolly, G. M. Lee, D. Farrell, F. O’Meara, C. R. Søndergaard, K. Teilum, C. Hewage, L. P. McIntosh, and J. E. Nielsen, “Remeasuring hewl pka values by nmr spectroscopy: Methods, analysis, accuracy, and implications for theoretical pka calculations,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 79, no. 3, pp. 685–702, 2011.
- [140] A. Bonincontro, A. De Francesco, and G. Onori, “Temperature-induced conformational changes of native lysozyme in aqueous solution studied by

- dielectric spectroscopy,” *Chemical Physics Letters*, vol. 301, no. 1, pp. 189–192, 1999.
- [141] K. Kubiak and P. A. Mulheran, “Molecular dynamics simulations of hen egg white lysozyme adsorption at a charged solid surface,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 113, no. 36, pp. 12189–12200, 2009.
- [142] M. Salvalaglio, M. Paloni, B. Guelat, M. Morbidelli, and C. Cavallotti, “A two level hierarchical model of protein retention in ion exchange chromatography,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1411, pp. 50–62, 2015.
- [143] P. F. Gomes, J. Loureiro, and A. Rodrigues, “Adsorption of human serum albumin (hsa) on a mixed-mode adsorbent: equilibrium and kinetics,” *Adsorption*, vol. 23, p. 491–505, 05 2017.
- [144] J. Zhang, Y.-T. Han, X.-L. Bu, and X.-F. Yue, “Study on the Adsorption Property of Lysozyme on Weak Cation Exchanger Based on Monodisperse Poly(glycidymethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) Beads,” *Journal of Chromatographic Science*, vol. 51, pp. 122–127, 07 2012.
- [145] M. Abadi, A. Agarwal, P. Barham, E. Brevdo, Z. Chen, C. Citro, G. S. Corrado, A. Davis, J. Dean, M. Devin, S. Ghemawat, I. Goodfellow, A. Harp, G. Irving, M. Isard, Y. Jia, R. Jozefowicz, L. Kaiser, M. Kudlur, J. Levenberg, D. Mané, R. Monga, S. Moore, D. Murray, C. Olah, M. Schuster, J. Shlens, B. Steiner, I. Sutskever, K. Talwar, P. Tucker, V. Vanhoucke, V. Vasudevan, F. Viégas, O. Vinyals, P. Warden, M. Wattenberg, M. Wicke, Y. Yu, and X. Zheng, “TensorFlow: Large-scale machine learning on heterogeneous systems,” 2015. Software available from tensorflow.org.
- [146] J. Menčík, “Latin hypercube sampling,” in *Concise Reliability for Engineers* (J. Mencik, ed.), ch. 16, Rijeka: IntechOpen, 2016.
- [147] V. Montgomery, *Planejamento de Experimentos usando o Statistica*. Brazil: E-Papers Serviços Editoriais, 2003.
- [148] L. Li, K. Jamieson, G. DeSalvo, A. Rostamizadeh, and A. Talwalkar, “Hyperband: A novel bandit-based approach to hyperparameter optimization,” *Journal of Machine Learning Research*, 2016.
- [149] C. Rindt and S. Gaastra-Nedea, “15 - modeling thermochemical reactions in thermal energy storage systems,” in *Advances in Thermal Energy Storage*

*Systems* (L. F. Cabeza, ed.), Woodhead Publishing Series in Energy, pp. 375–415, Woodhead Publishing, 2015.

- [150] M. E. Young, P. A. Carroad, and R. L. Bell, “Estimation of diffusion coefficients of proteins,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 22, no. 5, pp. 947–955, 1980.
- [151] R. Reid, J. Prausnitz, and B. Poling, *The Properties of Gases and Liquids*. No. v. 10 in McGraw-Hill chemical engineering series, McGraw-Hill, 1987.
- [152] J. T. G. Overbeek and M. J. Voorn, “Phase separation in polyelectrolyte solutions. theory of complex coacervation,” *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, vol. 49, no. S1, pp. 7–26, 1957.
- [153] T. Colla, C. N. Likos, and Y. Levin, “Equilibrium properties of charged microgels: A poisson-boltzmann-flory approach,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 141, no. 23, p. 234902, 2014.
- [154] J. Strazisar, S. Knez, and S. Kobe, “The influence of the magnetic field on the zeta potential of precipitated calcium carbonate,” *Particle & Particle Systems Characterization*, vol. 18, no. 5-6, pp. 278–285, 2001.
- [155] P. Attard, D. Antelmi, and I. Larson, “Comparison of the zeta potential with the diffuse layer potential from charge titration,” *Langmuir*, vol. 16, no. 4, pp. 1542–1552, 2000.

# Apêndice A

## Contribuições

Além dos artigos, os resultados obtidos foram apresentados em diferentes congressos:

- (1) **GAMA, M. S.**; TAVARES, F. W. ; BARRETO JUNIOR, A. G. . ADSORPTION COLLOIDAL MODEL OF MONOCLONAL ANTIBODY ON ION CHROMATOGRAPHY. In: IX Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada, Porto Alegre - RS. Anais do CBTermo, 2017.
- (2) **GAMA, M. S.**; TAVARES, F. W. ; BARRETO JUNIOR, A. G. . MULTISCALE MODELLING FOR ADSORPTION ANALISYS OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY. In: 12<sup>o</sup> Encontro Brasileiro sobre Adsorção - EBA12, Gramado-RS. Anais do EBA12, 2018.
- (3) **GAMA, M. S.**; TAVARES, F. W. ; BARRETO JUNIOR, A. G. . Method for estimation the protein binding affinity using a robust Poisson-Boltzmann model for the adsorption of lysozyme in SBA-15. In: 13<sup>o</sup> Encontro Brasileiro sobre Adsorção, Fortaleza-CE. Anais do EBA13, 2020.  
**(Prêmio de melhor apresentação oral)**
- (4) SANTANA, V.; **GAMA, M. S.**; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, A. M.; TAVARES, F. W. ; NOGUEIRA, I. B. R.; BARRETO JUNIOR, A. G. . A deep neural network as a tool for protein adsorption model integration. In: 14th Fundamentals of Adsorption, Broomfield / CO. Annals of FOA14th, 2022.
- (5) **GAMA, M. S.**; LIMA, F. A. R. D.; BARRETO JUNIOR, A. G.; TAVARES, F. W. A Deep Neural Network as a Tool to Describe Adsorption Columns for Protein Separation Using Multiscale Information. In: 14<sup>o</sup> Encontro Brasileiro sobre Adsorção, Brasília-DF. Anais do EBA14, 2022.  
**(Prêmio de melhor trabalho apresentado)**

## A.0.1 Outras contribuições

Diferentes sistemas foram analisados ao longo do desenvolvimento da tese e apresentados na defesa de qualificação, correlacionando tanto macropartículas orgânicas como inorgânicas como sinônimo de partículas pertencentes ao domínio coloidal.

O detalhamento de tais sistemas foi retirado desta tese, mas apresentam-se aqui os gargalos encontrados para fins didáticos, caso algum pesquisador tenha por interesse em aventurar-se na área. Dentre os contratemplos encontrados durante a pesquisa, e como forma de registro histórico, gostaria de citar também o período de calamidade mundial iniciado em 2019 pela infecção causadas pelo vírus SARS-CoV-2.

Sem mais delongas, um dos projetos consistia em realizar um diagrama de fases para coacervados. Sabe-se que a equação clássica de energia livre descrita por Overbeek e Voorn [152] apresenta bons resultados qualitativos na descrição de diagramas de fase para altos valores de comprimento de cadeia polimérica. Tinha-se como objetivo em aperfeiçoar o modelo quanto a descrição da energia livre, referente ao termo eletrostático, ao torná-lo uma função da força iônica e pH. Com um modelo do tipo Poisson-Boltzmann para o cálculo da densidade de cargas, foi possível inicialmente identificar a região onde a especificação de íons torna-se presente no perfil do diagrama de fases. Para um pequeno valor do comprimento da cadeia, ou grau de polimerização, foi possível verificar a completa mudança no perfil do diagrama.

A modelagem dos dados de coacervação foram apresentados no EQUIFASE - *Iberoamerican Conference on Phase Equilibria and Fluid Properties for Process Design*, em Córdoba (Argentina) em 2018. Apesar dos bons resultados encontrados, o modelo do tipo Poisson-Boltzmann segue um desenvolvimento por mecânica estatística com base na termodinâmica com uma partição grande-canônico, conforme descrito pela teoria de McMillan-Mayer; enquanto que o termo referente a contribuição entrópica apresenta uma abordagem do tipo Flory-Huggins. Mesmo com bons resultados, ao comparar com ensaios experimentais, a diferença entre as abordagens termodinâmicas sugere que os resultados encontrados apresentam uma interpretação não física. Uma possível conexão entre os modelos é apresentado por Colla et al. [153], que reporta propriedades no equilíbrio para a agregação de partículas carregadas. Colla utiliza um modelo que combina a Equação de Poisson-Boltzmann com a teoria de Flory, com base na Teoria do Funcional da Densidade. Por questão de complicações na elaboração desse modelo, foi preferível deixar este estudo para etapas futuras.

Um segundo projeto que apresentou extensas complicações consiste em calcular o potencial zeta de partículas formadas por  $\text{CaCO}_3$ . Tanto na indústria como



na pesquisa científica, há a utilização de informações do potencial zeta medido experimentalmente para entender de forma qualitativa e quantitativa os efeitos da dupla camada [154, 155]. Entretanto, a medição imposta por equipamentos laboratoriais apresenta uma relação analítica e simplória do potencial zeta. A metodologia proposta no projeto de tese, consistia em calcular de forma direta a carga de uma única partícula em movimento pela influência de um campo elétrico. Foi realizado o cálculo considerando as posições específicas de múltiplos íons na proximidade da superfície do carbonato de cálcio, em decorrência dos diferentes raios de hidratação dos íons. Desta forma, a dupla camada calculada é similar a reportada por Alijó et al. [18]. O estudo, entretanto, apresentou problemas não triviais por conta da grande quantidade de íons em solução, formados pelas reações da dissolução da partícula de  $\text{CaCO}_3$ . A escassez de dados experimentais invalidou a continuação do estudo para validação das diferentes etapas metodológicas.

# Apêndice B

## Equação de Poisson-Boltzmann

Pela teoria, o cálculo da concentração média dos íons em uma determinada distância pode ser determinado a partir da igualdade de potencial químico. Considera-se que o potencial químico ( $\mu$ ) para um dado eletrólito  $i$ , em um determinado ponto do sistema, possa ser descrito por:

$$\mu_i = \mu_i^0 + \kappa_B T \ln c_i + z_i e \phi \quad (\text{B.1})$$

em que  $z$  é a valência do íon  $i$ ,  $e$  a carga elementar do elétron,  $\kappa_b$  é a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura do sistema.

O primeiro termo da Equação B.1 refere-se a um potencial químico de referencia; o segundo termo é a contribuição entrópica e o ultimo termo é relativo a contribuição eletrostática. Analogamente, tem-se o potencial químico no seio da fase líquida como:

$$\mu_i^b = \mu_i^0 + \kappa_B T \ln c_i^b + z_i e \phi^\infty \quad (\text{B.2})$$

em que  $c^b$  e  $\phi^\infty$  são, respectivamente, a concentração e o potencial eletrostático no seio da fase líquida. A equação de distribuição de Boltzmann é então obtida a partir da igualdade de potenciais químicos [79]. Resolvendo  $\mu_i = \mu_i^b$ , temos que:

$$c_i = c_i^b \exp\left(-\frac{z_i e \phi}{\kappa_B T}\right), \text{ para } \phi^\infty = 0 \quad (\text{B.3})$$

A equação de Poisson-Boltzmann é expressa ao contabilizarmos na Equação de Poisson (Equação 2.3) a densidade volumétrica de cargas dos eletrólitos presentes nas vizinhanças ( $\rho = \sum z_i e c_i$ ), considerando o termo da distribuição de Boltzmann (Equação B.3). Logo, com as devidas substituições:

$$\nabla^2 \phi = -\frac{e \sum z_i c_i^b \exp\left(-\frac{z_i e \phi}{\kappa_B T}\right)}{\epsilon \epsilon_0} \quad (\text{B.4})$$

# Apêndice C

## Artigo 01

GAMA, M. S., SANTOS, M. S., DE ALMEIDA LIMA, E. R., et al.  
“A modified Poisson-Boltzmann equation applied to protein adsorption”,  
Journal of Chromatography A, v. 1531, pp. 74 – 82, 2018.



Full length article

# A modified Poisson-Boltzmann equation applied to protein adsorption



Marlon de Souza Gama<sup>a,b</sup>, Mirella Simões Santos<sup>b</sup>, Eduardo Rocha de Almeida Lima<sup>c</sup>,  
Frederico Wanderley Tavares<sup>a,b,\*</sup>, Amaro Gomes Barreto Barreto Jr<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CEP: 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Engenharia Química/COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CEP: 21949-972, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 20550-013, Rio de Janeiro, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 31 August 2017

Received in revised form 29 October 2017

Accepted 12 November 2017

Available online 13 November 2017

### Keywords:

Poisson-Boltzmann

Bispherical coordinates

Ion-colloid dispersion

Ion-exchange chromatography

## ABSTRACT

Ion-exchange chromatography has been widely used as a standard process in purification and analysis of protein, based on the electrostatic interaction between the protein and the stationary phase. Through the years, several approaches are used to improve the thermodynamic description of colloidal particle-surface interaction systems, however there are still a lot of gaps specifically when describing the behavior of protein adsorption. Here, we present an improved methodology for predicting the adsorption equilibrium constant by solving the modified Poisson-Boltzmann (PB) equation in bispherical coordinates. By including dispersion interactions between ions and protein, and between ions and surface, the modified PB equation used can describe the Hofmeister effects. We solve the modified Poisson-Boltzmann equation to calculate the protein-surface potential of mean force, treated as spherical colloid-plate system, as a function of process variables. From the potential of mean force, the Henry constants of adsorption, for different proteins and surfaces, are calculated as a function of pH, salt concentration, salt type, and temperature. The obtained Henry constants are compared with experimental data for several isotherms showing excellent agreement. We have also performed a sensitivity analysis to verify the behavior of different kind of salts and the Hofmeister effects.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Protein adsorption is the key phenomenon of countless biological processes as well of many protein separation and purification technologies. It is mainly governed by electrostatic interactions between the protein surface and the adsorbate. Because of that, it is crucial to have a good description of the electrostatic system when modeling this phenomenon. One of the first attempts to model the behavior of colloidal systems came from the Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek theory (DLVO) that considers an electrostatic double layer formed on the surroundings of a charged surface [1] which could be described by a linearized form of the Poisson-Boltzmann (PB) equation [2]. Based on the Hamaker [3] contribution, Verwey [2] improved the PB approach by combining the attractive London-van der Waals potential with electrostatic interactions. For protein adsorption, Ståhlberg et al. [4] applied the DLVO theory to study the chromatography of proteins using an analytical equation combining the effect of coulombic and van

der Waals interactions. Results come from this contribution [4] are improved due to the link between the parameter of protein retention and the forces related to protein-support interaction.

Another approach often used to model protein adsorption is the Sterical Mass-Action method (SMA) [5–7]. SMA applies a stoichiometric binding theory and couples, in a set of correlation parameters, all the electrostatic and equilibrium information of the system. In this case they do not consider important effects like non-electrostatic (NES) and co-ion effects [5], leading to a poor accuracy at higher salt concentrations or pH values close to the protein isoelectric point (pI) [7]. The same happens to all the models based on the classical DLVO theory because it does not take into account the non-electrostatic effects between ions and protein. Even though NES effects can be neglected at low ionic strength (0.01 M), they cannot be ignored when modeling highly concentrated electrolyte solutions or multivalent ions. This directly impacts on the need for improvement of the colloid theory for biological applications [8]. Most of the time, their impact follows directly the Hofmeister series. To be able to predict this kind of behavior it is essential to consider dispersion forces in the model [9].

Another way to improve the theoretical description of protein adsorption was suggested by Roth and Lenhoff [10] which takes into

\* Corresponding author at: Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CEP: 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.  
E-mail address: [tavares@eq.ufrj.br](mailto:tavares@eq.ufrj.br) (F.W. Tavares).

## Nomenclature

### Symbols

$B_{\pm P}$	Ion-protein dispersion constant (-)
$B_{\pm S}$	Ion-support dispersion constant (-)
$B_+$	Cation dispersion constant (-)
$B_-$	Anion dispersion constant (-)
$c$	Concentration of the colloid ( $\text{mol m}^{-3}$ )
$c_{\text{anion}}$	Concentration of the anions ( $\text{mol L}^{-1}$ )
$c_{\text{cation}}$	Concentration of the cations ( $\text{mol L}^{-1}$ )
$c_{H^+}$	Concentration of $H^+$ ions ( $\text{mol L}^{-1}$ )
$c_0$	Bulk concentration of the colloid ( $\text{mol m}^{-3}$ )
$d$	Half distance between the center of the sphere and the support (m)
$e$	Elementary charge of the electron ( $1.602 \cdot 10^{-19}$ C)
$F$	Faraday constant ( $\text{C mol}^{-1}$ )
$f$	Nondimensional force (-)
$I$	Ionic strength ( $\text{mol L}^{-1}$ )
$h$	Distance between the protein surface and the stationary surface (m)
$H$	Hamaker constants (J)
$K$	Dimensional Henry constant (m)
$K_a$	Effective dissociation constant ( $\text{mol L}^{-1}$ )
$K_s$	Effective association constant ( $\text{mol L}^{-1}$ )
$q$	Surface excess concentration ( $\text{mol m}^{-2}$ )
$r_1$	Distance between the ion and the colloid (m)
$r_2$	Distance between the ion and the planar surface (m)
$r_{\text{ion}}$	Ion radius (m)
$r_w$	Protein hydration-layer thickness (m)
$R_{\text{sphere}}$	Protein radius (m)
$T$	Absolute temperature (298.15 K)
$U_{\pm}$	Ion-protein and ion-adsorbent van der Waals interaction (-)
$W$	Potential of the mean force of sphere-plate interaction (J)
$W^{PB}$	Electrostatic contribution to the potential of mean force (J)
$W^{hs}$	Hard-sphere contribution to the potential of mean force (J)
$W^{Ham}$	Potential Hamaker contribution to the potential of mean force (J)
$x, z$	Cartesian coordinates

### Greek symbols

$\gamma$	Activity coefficient of the salt (-)
$\beta$	Parameter related with the protein radius and $\eta_0$ (-)
$\epsilon_0$	Vacuum permittivity ( $8.854 \cdot 10^{-12}$ F m <sup>-1</sup> )
$\epsilon_R$	Dielectric constant of the medium (80 for water)
$\eta, \theta$	Independent variables of the bispherical coordinate system
$\rho$	Density of ionizable surface group ( $\text{mol m}^{-2}$ )
$k_B$	Boltzmann constant ( $1.3806 \cdot 10^{-23}$ J K <sup>-1</sup> )
$k_D$	Inverse Debye length ( $\text{m}^{-1}$ )
$\sigma_{NH_3^+}$	Charge density of amino groups ( $\text{C m}^{-2}$ )
$\sigma_{His^+}$	Charge density of histidine groups ( $\text{C m}^{-2}$ )
$\sigma_{COO^-}$	Charge density of carboxyl groups ( $\text{C m}^{-2}$ )
$\sigma_{SO_3^-}$	Charge density of sulfonated groups ( $\text{C m}^{-2}$ )
$\sigma_1$	Colloid charge density ( $\text{C m}^{-2}$ )
$\sigma_2$	Stationary phase charge density ( $\text{C m}^{-2}$ )
$\sigma_{\pm}$	Charge density of the amino acid groups ( $\text{C m}^{-2}$ )
$\psi$	Dimensionless electrostatic potential ( $e\varphi/k_B T$ )

account the three-dimensional configuration of the protein, using information of the mesh conformation of lysozyme while inter-

acting with a stationary surface. This approach, though, still used the linearized form of the Poisson-Boltzmann equation. Considering Hamaker interactions, the result from Roth and Lenhoff [10] showed a good agreement with experimental data for lysozyme at small ionic strength, as expected, but not for a wide range of ionic strength.

When applying the Poisson-Boltzmann equation to describe spherical colloids it is important to define the better coordinate system in which this equation is applied. This helps to improve the calculation of the interaction between two colloids or colloid-surface particles in contrast with using a planar geometry together with the Derjaguin approximation to resemble spherical-planar geometry [11–13]. The PB equation in Bispherical Coordinates was chosen by Lima et al. [14] as a better approach that provides a good computational time, discretization scheme and accuracy. These bispherical coordinates and numerical procedure were able to calculate the osmotic second virial coefficient as a function of ionic strength considering the interaction between two charged colloids (globular proteins). The article also reports the application of the Hamaker constant and analyses the effect of the kind of salt arising due to non-electrostatic interactions.

An equilibrium model was reported by Ståhlberg et al. [15] showing the relationship between the electrostatic contribution to the retention factor (relative to adsorption equilibrium constant for a diluted system, i.e. Henry constant) for ion-exchange chromatography (IEC) of proteins.

In order to predict the influence of protein adsorption, here we calculate the Henry constant of a protein modeled as a charged colloidal particle to be adsorbed on an ion-exchange adsorbent using the modified PB equation in bispherical coordinates. We consider the dispersion interactions between ions and protein and between ions and adsorbent surface, and the Hamaker potential between protein and adsorbent surface. With this approach, we can predict the Henry constant as a function of pH, ionic strength, ionic specificity, and temperature.

## 2. Electrostatic model for different coordinate systems

To describe the adsorptive behavior of proteins in chromatographic columns, including the electrostatic interactions between charged surfaces, it is necessary to establish a model capable to describe the retention of protein such as reported in [11–13]. The model is developed by combining the Poisson-Boltzmann equation and the Langmuir adsorption model, considering that the surfaces, both protein and support, contain homogeneous distributed charge density that are dependent on pH and ionic strength.

Using the equilibrium condition for the chemical potential of protein at the dilute system, we obtain [16]:

$$c = c_0 \exp \left[ -\frac{W(I, pH, h)}{k_B T} \right] \quad (1)$$

where  $c$  is the concentration of colloid (protein) at  $h$ ,  $c_0$  is the bulk concentration of colloid,  $h$  is the distance between the protein surface and the surface of the stationary phase,  $I$  is the ionic strength of the solution,  $W$  is the free energy of interaction between the colloid and the adsorbate,  $k_B$  is the Boltzmann constant, and  $T$  is the absolute temperature (here 298.15 K).

Knowing the concentration of protein at different distance  $h$ , the surface excess concentration can be obtained by:

$$q(pH, I) = \int_0^{\infty} (c - c_0) dh \quad (2)$$

where  $q$  is the surface excess concentration of the protein for given desired pH and ionic strength,  $I$ .

The Henry constant is written as a function of the potential of mean force (the free energy,  $W$ ) after combining both equations (Eqs. (1)–(2)) as shown elsewhere [11]:

$$K = \frac{q(pH, I)}{c_0} = \int_0^{\infty} \left[ \exp\left(-\frac{W(I, pH, h)}{k_B T}\right) - 1 \right] dh \quad (3)$$

where  $K$  is the dimensional Henry constant (m).

The potential of mean force is calculated using a nonlinear PB Equation in bispherical coordinates that includes the complex geometry of the system and can add relevant ions-protein, ions-support and protein-support dispersion interaction (NES), as discussed in the following sections.

### 2.1. Modified Poisson-Boltzmann equation in bispherical coordinates

We use bispherical coordinates to describe plane-sphere electrostatic contribution via modified PB equation that considers ionic specificity via van der Waals interaction.

The Poisson-Boltzmann equation including the ion-surface dispersions is given by the following equation [14]:

$$\nabla^2 \psi = \frac{1}{2} \left[ \exp(\psi - U_-) - \exp(-\psi - U_+) \right] \quad (4)$$

where  $\nabla^2$  is the Laplacian operator in bispherical coordinates [17], given by:

$$\nabla^2 \psi = \frac{(\cosh \eta - \cos \theta)^3}{\beta^2 \sin \theta} \left[ \frac{\partial}{\partial \theta} \left( \frac{\sin \theta}{\cosh \eta - \cos \theta} \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \right) + \sin \theta \frac{\partial}{\partial \eta} \left( \frac{1}{\cosh \eta - \cos \theta} \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \right) \right] \quad (5)$$

here  $U_{\pm}$  is the dimensionless van der Waals interaction between the ions and the surfaces (protein and support),  $(\eta, \theta)$  are the independent variables of the bispherical coordinate system where the rotation of symmetry is assumed to be a line orthogonal to the plate passing through the center of the sphere,  $\eta_0$  is the value of  $\eta$  at the sphere surface and the planar surface is located at  $\eta = 0$ . The parameter  $\beta$  is given by  $k_D R_{\text{sphere}} \sinh(\eta_0)$ , where  $R_{\text{sphere}}$  is the protein radius and  $k_D$  is the inverse of Debye length.

The boundary conditions in  $\eta$  are written as:

$$\left( \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \right)_{\eta=0} = -\frac{\sigma_2}{\epsilon \epsilon_0} \frac{\beta}{\cosh(\eta_0) - \cos(\theta)} \quad (6)$$

$$\left( \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \right)_{\eta=\eta_0} = -\frac{\sigma_1}{\epsilon \epsilon_0} \frac{\beta}{\cosh(\eta_0) - \cos(\theta)}$$

where  $\sigma_1$  and  $\sigma_2$  represents the specific colloid charge density and the specific stationary phase (support) charge density, respectively.

The boundary conditions in  $\theta$  are:

$$\left( \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \right)_{\theta=0} = \left( \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \right)_{\theta=\pi} = 0 \quad (7)$$

The Cartesian coordinates can be correlated with bispherical coordinates according to:

$$x = \frac{\beta \sin(\theta)}{\cosh(\eta) - \cos(\theta)} \quad (8)$$

$$z = \frac{\beta \sinh(\eta)}{\cosh(\eta) - \cos(\theta)}$$

The equation for the non-electrostatic term relative to ionic specificity is given by [18]:

$$U_{\pm} = \frac{-B_{\pm P} \cdot r_{\text{ion}}^3}{(r_1 - R_{\text{sphere}})^3 \left[ 1 + \frac{(r_1 - R_{\text{sphere}})^3}{2R_{\text{sphere}}^3} \right]} + \frac{-B_{\pm S} \cdot r_{\text{ion}}^3}{r_2^3} \quad (9)$$

Here,  $r_{\text{ion}}$  is the ion radius; the  $B_{\pm P}$  is the ion-protein and  $B_{\pm S}$  is the ion-support dispersion constants in its non-dimensional form. We assumed the same surface dielectric propriety on the support and protein, thus,  $B_{+P} = B_{+S} = B_+$  (cation dispersion constant) and  $B_{-P} = B_{-S} = B_-$  (anion dispersion constant), however  $B_+ \neq B_-$ ;  $r_1$  is the distance between the ion and the center of the protein and  $r_2$  is the distance between the ion and the planar surface, calculated through:

$$r_1 = \sqrt{x^2 + (d - z)^2}; \quad r_2 = \sqrt{x^2 + (d + z)^2} \quad (10)$$

where  $x$  and  $z$  are the Cartesian coordinates calculated using Eq. (8) and  $d$  is the half distance between the center of the sphere and the support. Fig. 1 shows a schematic diagram of the system composed by protein, ion and the stationary phase where is possible to visualize all the coordinates parameters on a Cartesian plane.

The partial differential equation is solved using finite volume method linked with the Thomas algorithm to solve the linearized matrix of each step of the solution. The numerical details are described elsewhere [19].

Here we treat sodium chloride as the main salt in solution accounting for the ionic strength. So the following values are taken in consideration for the non-dimensional dispersion constant [20]:  $B_+ = 0.138$  for sodium ion and  $B_- = 1.086$  for chloride ion. For sensitivity analysis, different kinds of ions are studied: bromide ( $B_- = 1.348$ ), iodide ( $B_- = 1.735$ ), potassium ( $B_+ = 0.574$ ) and strontium ( $B_+ = 0.575$ ). The value of 2 Å was assumed as the effective radius for all ions ( $r_{\text{ion}}$ ) [19].

The expression for the nondimensional force in bispherical coordinates is given by [21], which is obtained by the integration of the stress tensor over a suitable surface, as a function of the electric field and the difference in the osmotic pressure [22]. The integration is performed over the surface at  $\eta = \frac{\eta_0}{2}$  for better numerical accuracy [21].

$$f(\eta) = 2\pi \int_0^{\pi} \left\{ \left[ \frac{\beta^2 (\cosh \psi - 1)}{(\cosh \eta - \cos \theta)^2} + \frac{1}{2} \left( \left( \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \right)^2 - \left( \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \right)^2 \right) \times (1 - \cosh \eta \cdot \cos \theta) \right] + \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \sinh \eta \cdot \sin \theta \right\} \frac{\sin \theta}{\cosh \eta - \cos \theta} \cdot d\theta \quad (11)$$

The electrostatic contribution to the free energy can be calculated in two different ways: (1) through a methodology that uses information of the potential with respect to the volume control and surface integrals and (2) using the integration of the force as a function of the interaction distance between the two particles. For a plane-surface case, the first method may lead to a poor accuracy [21], so the second method was selected as the most efficient way to find the electrostatic contribution to the potential of mean force:

$$\frac{W^{PB}(k_D h)}{\kappa_B T} = -\epsilon_R \epsilon_0 \left( \frac{\kappa_B T}{e^2} \right) \int_{\infty}^{k_D h} f(h) dh \quad (12)$$

where  $W^{PB}$  is the electrostatic contribution from the PB equation to the interaction potential of mean force between the protein and the adsorbent for a given dimensionless distance ( $k_D h$ ). This potential of mean force takes into account temperature, charge densities of protein and adsorbent (related with pH), salt concentration (related

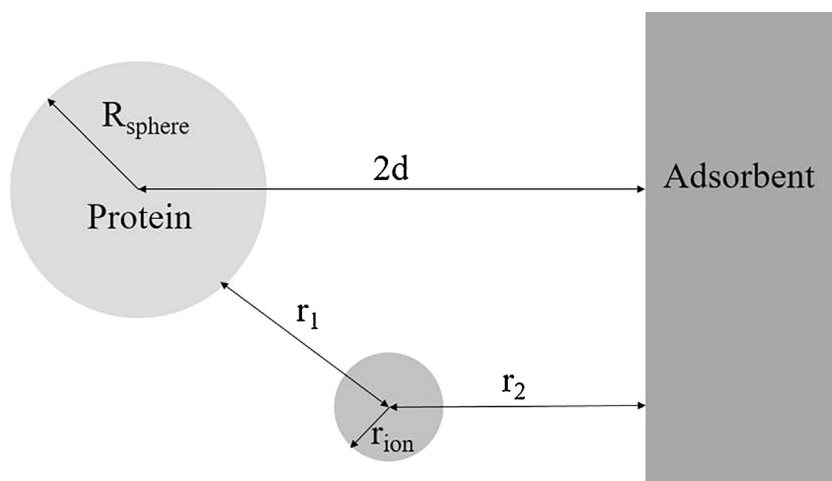


Fig. 1. Schematic diagram of a protein adsorption on charged surface.

with PB equation) and salt type (related with dispersion interaction between ions and protein and ions and adsorbent surface).

The total potential of mean force between protein and adsorbent is given by three contributions:

$$W = W^{PB} + W^{Ham} + W^{hs} \quad (13)$$

where  $W^{hs}$  is the hard-sphere contribution: (1)  $W^{hs} = \infty$  for  $h < 0$  and (2)  $W^{hs} = 0$  for  $h \geq 0$ .  $W^{Ham}$  is related to the direct dispersion potential between the protein and the adsorbent surface, the Hamaker potential. The expression for calculating  $W^{Ham}$  is [14,23]:

$$W^{Ham} = \begin{cases} -\frac{H}{6} \left( \frac{R_{sphere}}{R_{sphere} + r_w} \right) & \text{for } h \leq R_{sphere} + r_w \\ -\frac{2H}{9} \left( \frac{R_{sphere}}{h} \right)^3 & \text{for } h > R_{sphere} + r_w \end{cases} \quad (14)$$

where  $r_w$  corresponds to the water hydration-layer thickness, 1.5 Å [14]. The parameter  $H$  represents the Hamaker constants, which are different for each pair of colloid-adsorbent. For the interaction between mAbs and YMC BioPro SP, the Hamaker constant is established as  $2k_B T$  [24]. Due to lack of data for other stationary phases, it is assumed  $H = 5k_B T$  for the interaction with Fractogel EMD SE HiCap as a frequent value for protein interaction in aqueous solution [20]. In Section 3 the stationary phases (supports) and proteins are described including details of binding groups and sizes.

### 3. Proteins and stationary surfaces

The surface charge density was calculated as suggested by Ehrh et al. [25] and by Guélat et al. [11]. To determine the amino and histidine charge density groups:

$$\sigma_+ = \frac{+F\rho_i}{1 + (Ka_{i+}/c_{H^+}) + c_{anion}\gamma \cdot Ks_{iCl}} \quad (15)$$

where  $F$  is the Faraday constant ( $96,485 \text{ C mol}^{-1}$ );  $i$  denotes the amino or histidine groups;  $\rho_i$  represents the density of ionizable surface groups  $i$  ( $\text{mol m}^{-2}$ );  $Ka_{i+}$  is the effective dissociation constant of acid groups  $i$  ( $\text{mol L}^{-1}$ );  $\gamma$  is the activity coefficient of the chosen salt obtained from [26];  $Ks_{iCl}$  is the effective association constant of groups  $i$  ( $\text{L mol}^{-1}$ );  $c_{anion}$  is the concentration of anions ( $\text{mol L}^{-1}$ ) and  $c_{H^+}$  refers to the concentration of  $H^+$  ions ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

The effective dissociation constants and effective association constants are given in units due to a standard reference concentration of  $1 \text{ mol L}^{-1}$ .

Similar equation describes the charge density of carboxyl and sulfonate groups:

$$\sigma_- = \frac{-F\rho_j}{1 + (c_{H^+}/Ka_{j-}) + c_{cation}\gamma \cdot Ks_{jNa}} \quad (16)$$

where  $j$  denotes the carboxyl or sulfonate groups;  $\rho_j$  represents the density of ionizable surface groups  $j$  ( $\text{mol m}^{-2}$ );  $Ka_{j-}$  is the effective dissociation constant of basic groups  $j$  ( $\text{mol L}^{-1}$ );  $Ks_{jNa}$  is the effective association constant of groups  $j$  ( $\text{L mol}^{-1}$ ), and  $c_{cation}$  is the concentration of cations ( $\text{mol L}^{-1}$ ). The values of the effective dissociation and association constants are found elsewhere [11].

The total protein charge density ( $\sigma_1$ ) is quantified by the sum of each individual contributions of the amino, histidine and carboxyl groups and stationary phase charge density ( $\sigma_2$ ) is determined through the contribution of the sulfonated group:

$$\sigma_1(pH, I) = \sigma_{NH_3^+} + \sigma_{His^+} + \sigma_{COO^-} \quad (17)$$

$$\sigma_2(pH, I) = \sigma_{SO_3^-} \quad (18)$$

where  $\sigma_{NH_3^+}$ ,  $\sigma_{His^+}$ ,  $\sigma_{COO^-}$ ,  $\sigma_{SO_3^-}$  are, respectively, the charge density of the amino, histidine, carboxyl, and sulfonated groups.

The data analyzed in this study were obtained from the literature aiming to describe the behavior of the Henry constant as a function of pH and ionic strength in IEC for different stationary phases – Fractogel EMD SE HiCap (binding group  $-(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3^-$ ) and YMC BioPro SP (10  $\mu\text{m}$ ) (binding group  $-(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$ ) – interacting with monoclonal antibody supplied by Merck Serono S.A. [11]; and YMC BioPro SP (5  $\mu\text{m}$ ) for Bevacizumab and Trastuzumab adsorption [27]. The density of amino, histidine and carboxylic component groups ( $\rho$ ) were calculated by the ratio between the number of ionic groups (obtained from the counting of amino acids sequence available at the same references [27]) and the surface area.

The hydrodynamic radius of monoclonal antibody used is 5 nm [11], the same value that was used for Trastuzumab [28,29]. For Bevacizumab, the radius of 6.3 nm was measured by Wen et al. [30] and is applied here for obtaining the density of groups. The main parameters used are presented in Table 1. Other parameters, such as the effective association constants or acid-base dissociation constants of each component, can be found at references [11,24,27].

### 4. Results and discussion

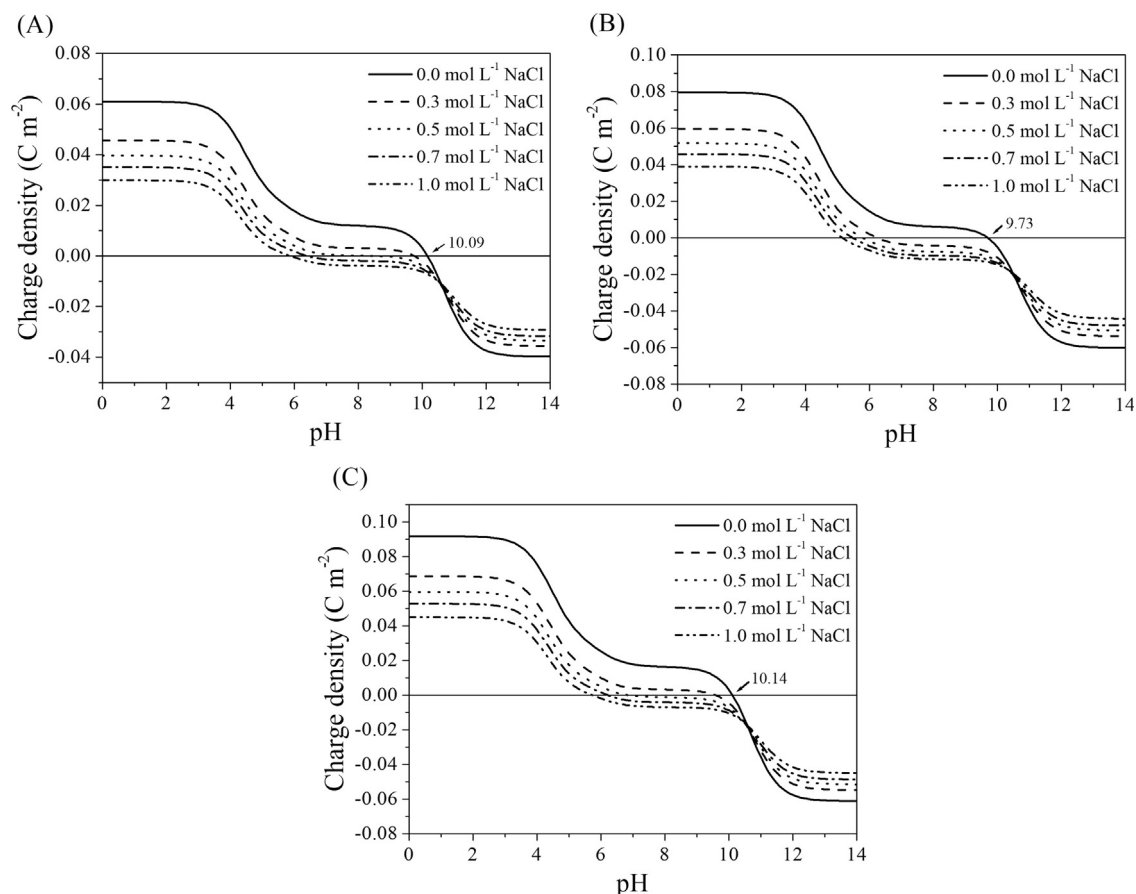
Figs. 2 and 3 show the charge density of each protein and support studied here as a function of solution pH and salt concentration. Those values were obtained using the method described by Ehrh



**Table 1**  
Parameters calculated through the ratio between the number of ionic groups and the protein surface area.

Protein	The density of groups ( $\text{mol m}^{-2}$ )			Reference
	Amino	Histidine	Carboxyl	
Monoclonal antibody	$7 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	This work
Bevacizumab	$5 \cdot 10^{-7}$	$10 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-7}$	
Trastuzumab	$8 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	
Stationary phase	The density of sulfonate groups ( $\text{mol m}^{-2}$ )		Reference	
Fractogel EMD SE HiCap	$5.64 \cdot 10^{-6a}$		[11]	
YMC BioPro SP (10 $\mu\text{m}$ )	$1.90 \cdot 10^{-6a}$		[27]	
YMC BioPro SP (5 $\mu\text{m}$ )	$1.22 \cdot 10^{-6a}$			

<sup>a</sup> Values obtained from the references.



**Fig. 2.** Charge density as a function of pH for NaCl concentration range from 0.0 to  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$  for: (A) bevacizumab, (B) monoclonal antibody and (C) trastuzumab.

et al. [25] and the expression of activity coefficient of the salt from [26]. Here, the effective association constants and acid-base dissociation constants are considered.

For proteins, Fig. 2, the addition of salt in the medium decreases the charge density. Close to pI, the influence of the salt is highly non-linear. The inversion is due to the pKa of dissociation of the amine groups (10.69) which are abundant on these proteins. One can notice in Fig. 1(A) that bevacizumab has a pI 10.09 in the absence of salt. With the addition of salt, the pI is displaced, reaching pH 5.89 for the NaCl concentration of  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$ .

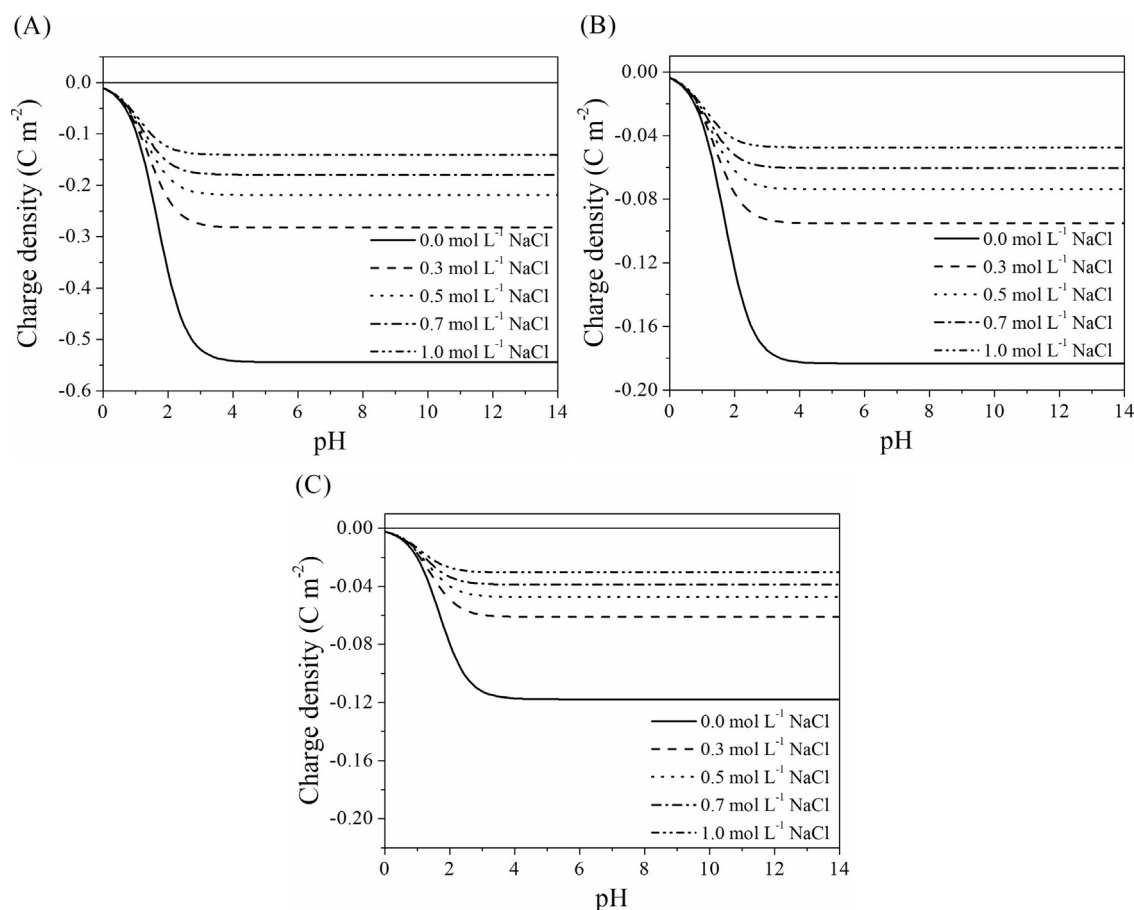
Fig. 2(B) and (C) describe the charge density of trastuzumab and monoclonal antibody, respectively, showing a similar behavior to that observed for bevacizumab as a function of pH and salt concentration. In the absence of salt, trastuzumab exhibits pI 10.14, while the pI for monoclonal antibody is pH 9.73. Similar behavior of how

pI depend on salt concentration is observed for trastuzumab and monoclonal antibody.

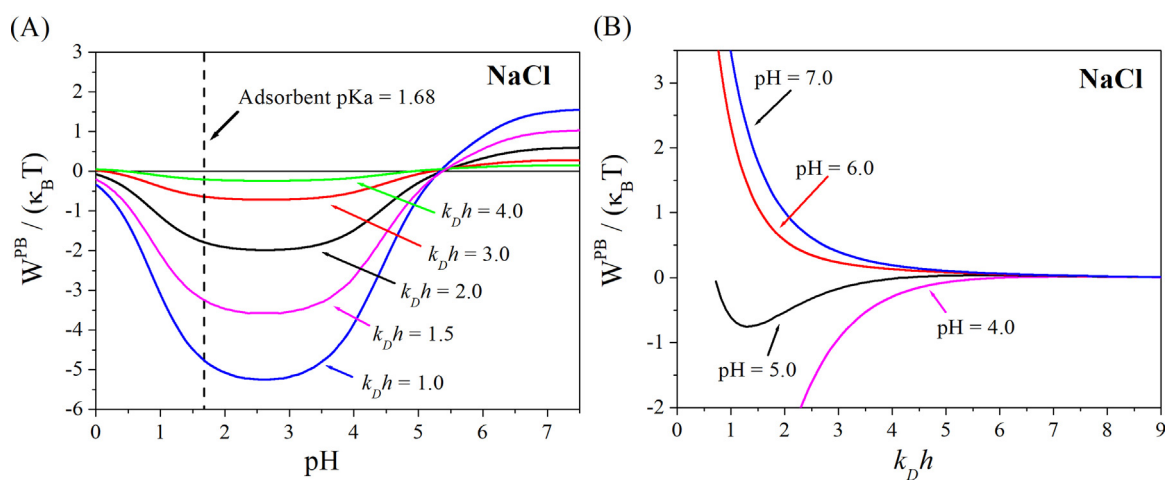
Fig. 3 shows the charge density behavior of each supports used for the adsorption in IEC. As observed, the pH only affect the surface charge at the region around the pKa of the sulfonate groups (1.68). For higher values of pH, the dependence is very small. The dependence of the salt is a more important parameter of support charge density. The increase of salt (ionic strength) favors the association of cations with the deprotonated sulfonate groups reducing its quantity, which are responsible for decreasing (in module) the support charge density. A similar behavior is reported by [25].

The electrostatic contribution of the potential of mean force, presented in Fig. 4(A), were calculated using the PB equation in bispherical coordinates for different distances between monoclonal antibody and stationary phase. For a dimensionless distance of  $1 k_D h$ , a strong attraction (electrostatic contribution) between the





**Fig. 3.** Charge density as a function of pH for a NaCl concentration range of 0.0–1.0 mol L<sup>-1</sup> for: (A) Fractogel EMD SE HiCap, (B) YMC BioPro SP (10 μm) and (C) YMC BioPro SP (5 μm).



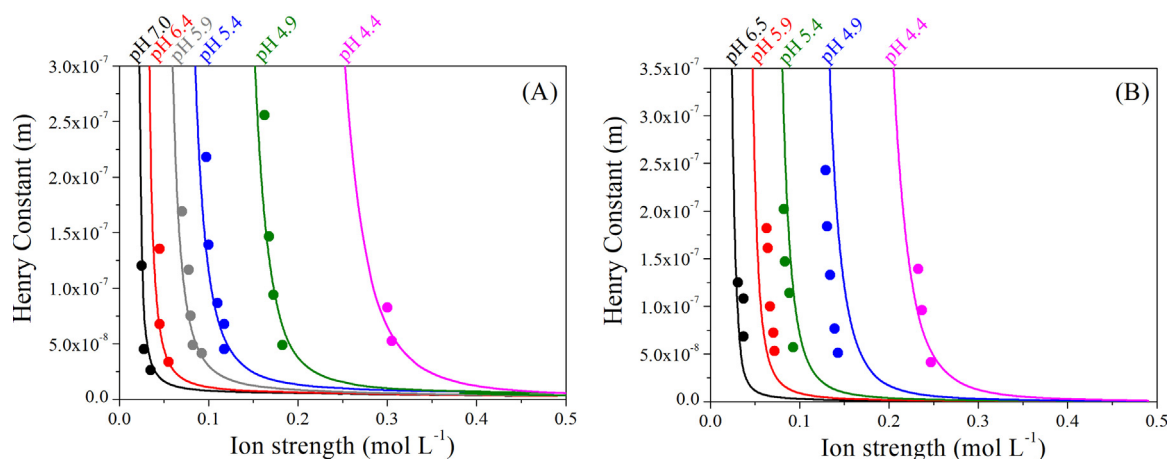
**Fig. 4.** Potential of mean force from the PBE as a function of: (A) the pH using different dimensionless distances between the surfaces of plane-sphere and (B) over the distance between the monoclonal antibody protein surface and the plane. NaCl concentration is equal to 0.3 mol L<sup>-1</sup> (Fractogel EMD SE HiCap).

protein and the adsorbent is observed between the pH 1.68 and 4.0.

For a pH lower than the pKa of the adsorbent (1.68), the negative charge of the stationary phase becomes lower (in module) as shown in Fig. 3, contributing to decrease the attraction between the protein and the adsorbent. For pH greater than 4.0, a decrease of the attractive energy is observed, which is related to the neutralization of the surface charges of the protein, reaching zero at pH approximately 5.3 for NaCl concentration of 0.3 mol L<sup>-1</sup>. For higher

pHs, a repulsive electrostatic contribution is observed between the surfaces due to the net neutrality of the protein and the adsorption of ions on its surface.

For monoclonal antibody, the pI is 6.3 for 0.3 mol L<sup>-1</sup> of NaCl. However, this is not the zero point for the potential of mean force, as can be observed in Fig. 4(A). Such effect can be described as an electrostatic screening of the protein caused by the salt concentration. At the point of neutral charge, we have a net sum of charges equal to zero. With the addition of salt in the system, the chloride



**Fig. 5.** Henry constant behavior for protein adsorption process: monoclonal antibody on (A) Fractogel EMD SE HiCap and (B) YMC BioPro SP (10  $\mu\text{m}$ ) as a function of salt concentration and pH. The filled curves are related to the theoretical calculation without parameter estimation and the circles symbols are experimental data from [11].

ions will preferably bind to the surfaces, since its dispersion constant (1.086) is much higher than that for cation (0.138), making the protein negative due to the preferential adsorption of anions. It is already known that occur a bind of ions around colloidal particles changing its interaction force [19], so it is expected a different pI for monoclonal antibody due to the interaction protein-support and ions-support.

For different distances, the potential of mean force behaves as expected. For short distances, there are higher attractive and repulsive forces due to the proximity of the surfaces. As the protein is moved away from the stationary phase (adsorbent), there is a decrease in attraction (or repulsion). As shown in Fig. 4(A), for distances greater than  $4 k_{Dh}$ , the interaction between protein and adsorbent is practically zero.

In order to identify at what distance there is no electrostatic interaction between the protein and the stationary phase, the electrostatic potential was calculated as a function of the separation distance between the surfaces for different pH values, using the same conditions described in Fig. 4(A). Results are shown in Fig. 4(B). For pH 7.0 and 6.0, the electrostatic contributions are repulsive for all distances between the protein and support surface, so that the electrostatic interactions contribute to decrease the Henry constant. At pH 5.0, close to the pI of the protein in a salt concentration of  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$ , electrostatic attraction is observed but not as intense as observed at pH 4.0. From Fig. 4(B), the distance of  $6 k_{Dh}$  is enough to overlook the electrostatic interaction between protein and adsorbent at any of the pH values tested. Although this analysis was shown only for monoclonal antibody at a single salt concentration, similar results are obtained for other proteins at similar conditions. The value of  $10 k_{Dh}$  was used in the model, to guarantee that up to this distance the protein does not interact electrostatically with the surface, regardless of the kind of salt or concentration considered.

The calculated Henry constants are shown in Figs. 5 and 6. Each Henry constant was obtained by integrating Eq. (3) with the total potential of mean force described by Eq. (13), considering the direct Hamaker interaction between surfaces ( $W^{Ham}$ ), the electrostatic contribution  $W^{PB}$ , obtained from the solution of the modified PB in bispherical coordinates, and the ionic dispersion term.

Fig. 5 shows the prediction of the Henry constant for monoclonal antibody with Fractogel EMD SE HiCap and YMC BioPro SP (10  $\mu\text{m}$  in diameter), while in Fig. 6 the same for Bevacizumab and Trastuzumab and stationary phase composed of YMC BioPro SP resin (5  $\mu\text{m}$  in diameter).

It is interesting to highlight the difference in the shape of the Henry constant with the ionic strength, as exposed in Fig. 5. The

curvature of the dependence on the ionic strength varies with the pH. At pHs near the pI, the behavior of the equilibrium constant shows a sharp decay as a function of ionic strength.

All the curves present  $R^2$  correlation coefficient higher than 0.90, except for the monoclonal antibody with YMC at pH 5.9. We emphasize that these results are obtained with predictive calculation, as we did not include any fitted parameter in the model.

For all the cases, the equilibrium constant decreases with increasing ionic strength of both double layers. With the increase of salt concentration, there is a decrease in the electrostatic attraction between protein and stationary phase, mainly due to the electrostatic screening. Because the surfaces have opposite charges, cations are more important for electrostatic screening of stationary phase and anions for the proteins (Figs. 5 and 6).

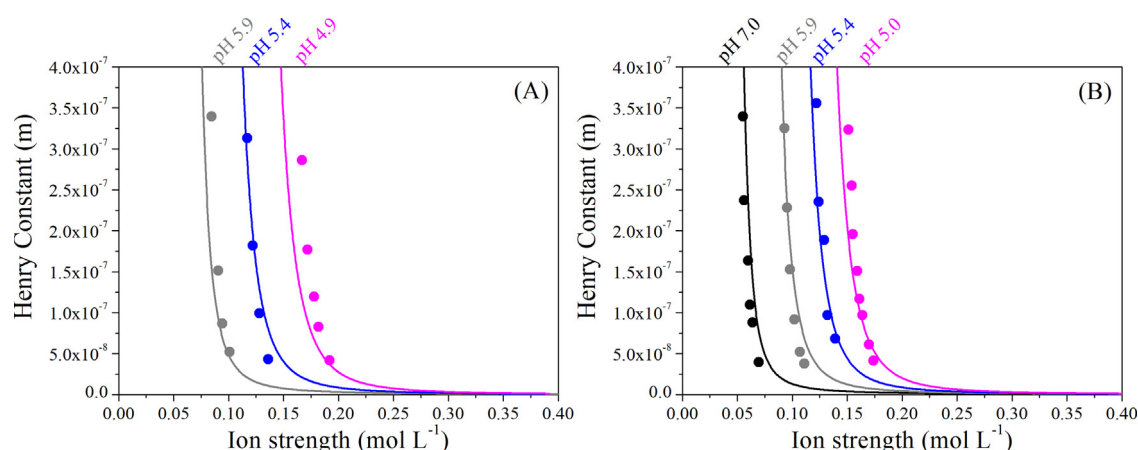
As presented in Fig. 5(A), even at pHs near the pI, there are weak electrostatic interactions due to the binding of anions on the surface of the protein.

As shown in the figures, the model describes the Henry constant with good agreement for all proteins and chromatographic adsorbents studied here (Fig. 5 and 6).

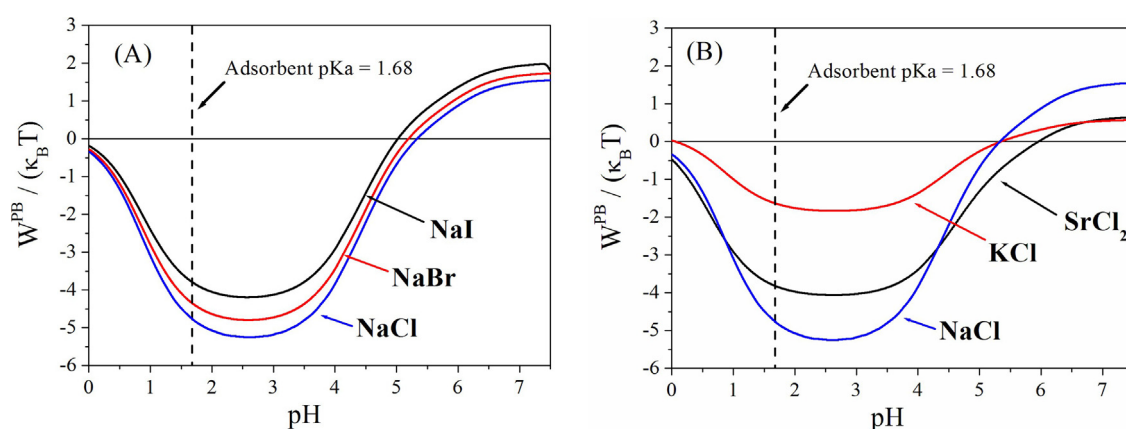
To acknowledge the Hofmeister effects, we calculated the PB contribution to the potential of mean force for five different kinds of salts: NaCl, NaBr and NaI to analyze the influence of the anion; and NaCl, KCl and  $\text{SrCl}_2$  for the cations.

Fig. 7 shows the results of the electrostatic contribution of the potential of mean force as a function of pH for salts with different series of cations and anions, setting the ionic strength of  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  and distance of  $1 k_{Dh}$ . As observed in Fig. 7(A), the interaction between protein and adsorbent is diversely affected by different types of anions, showing a shift of the neutral charge point depending on the anion identity. This behavior can be described by the ion-protein interaction in which the series is followed:  $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ . As iodide has a higher polarizability, it accumulates more at the surface of the protein – due to dispersion effects – than the other ions. This makes the protein surface charge less positive or more negative, depending on the pH. So, it is understandable that the electrostatic contribution given by iodide is more repulsive (or less attractive) than for other anions, since the adsorbent surface charge is negative ( $\text{pH} > \text{pKa}$ ).

The results for different cations are presented in Fig. 7(B). The sodium ion has a lower dispersion constant value than potassium (0.574). However, both salts present the same displacement for the point of neutral charge of the protein, with different intensities of the attraction potential (negative values in the figure) and repulsion (positive values).



**Fig. 6.** Henry constant behavior for protein adsorption process: Bevacizumab (A) and Trastuzumab (B) on YMC BioPro SP (5  $\mu\text{m}$ ) as a function of salt concentration and pH. The filled curves are related to the theoretical results without parameter estimation and the circles are experimental data from [11,27].



**Fig. 7.** Comparison between the dimensionless potential of mean of three different type of (A) anions and (B) cations. The sphere-plate distance is fixed at  $Kh=1$ , for the analysis purpose with ionic strength equal to  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  using monoclonal antibody (Fractogel EMD SE HiCap).

Comparing strontium and potassium cations, both have a similar value for the Hamaker constant between ion-protein and ion-support. The discrepancy found between the two results comes from the difference between their valences and their nature, counted indirectly by the average activity of the salts in solution and in the charge density of the protein.

The type of salt changes the adsorptive behavior of proteins (Fig. 8) as previously observed by the variation of the free energy contribution of PB (Fig. 7). The anions tested had a great influence on the Henry constant, while the type of cation showed great influence only for bivalent ion ( $\text{Sr}^{2+}$ ). We chose two pH to analyses the cation influence (Fig. 8(B)) pH 6.3 and pH 4.4, due the first being related with the monoclonal antibody pI and the second is the lower pH studied. As the effect of salt  $\text{SrCl}_2$  is higher than the other salts, including a pH between the range of pH 4.4–6.3 compromises a clear visualization of the effects.

Iodide is more polarizable than other anions, contributing more to the electrostatic screening of the protein. Therefore, for a same value of the equilibrium constant, higher concentration of NaCl is required to perform the same screening effect of NaI.

As the pH value increases, the equilibrium constant profiles for the different salt types tend to overlap (Fig. 8 (A)). Next to the neutral charge point of the protein (at pH close to pI), the electrostatic contribution is reduced, minimizing the influence of dispersion interaction between the ions and the surfaces, and therefore the ionic nature. For anions, the Hofmeister series was followed throughout the pH range studied. However, it was observed

an inversion for the  $\text{Sr}^{2+}$  ion. As this ion is more polarizable than other cations, there is a stronger van der Waals attraction between  $\text{Sr}^{2+}$  and the protein. Next to the pI of the protein, binding of  $\text{Sr}^{2+}$  occurs on its surface, making it more positive. Thus, there is an increase in the Henry constant, relative to NaCl, at the same ionic strength. However, at pH 4.4, far from the pI the protein is positively charged and the phenomenon is dominated by the electrostatic screening of the stationary phase, which is larger for  $\text{Sr}^{2+}$ .

## 5. Conclusions and perspective

We have calculated the potential of mean force for the interaction of protein-support using a modified Poisson-Boltzmann equation in bispherical coordinates, wherein pH, ionic strength, temperature, and type of salt are considered. We used the potential of mean force to obtain the Henry constant for three proteins adsorbed on three different supports, showing very good performance when compared with experimental data. In addition, we observed that the effects of ions follow the Hofmeister anionic series for different values of pH. Comparing the potential of mean force, the anions showed to be of greater importance to protein binding. For a series of cations,  $\text{Sr}^{2+}$  ion shows different behavior compared with the others monovalent cations due to its strong polarizability. The prediction of the electrostatic effects may represent important step to improve the separation process of protein and/or the multimodal chromatography. This work can be extended to include ion size effects and electrostatic correlations, which can

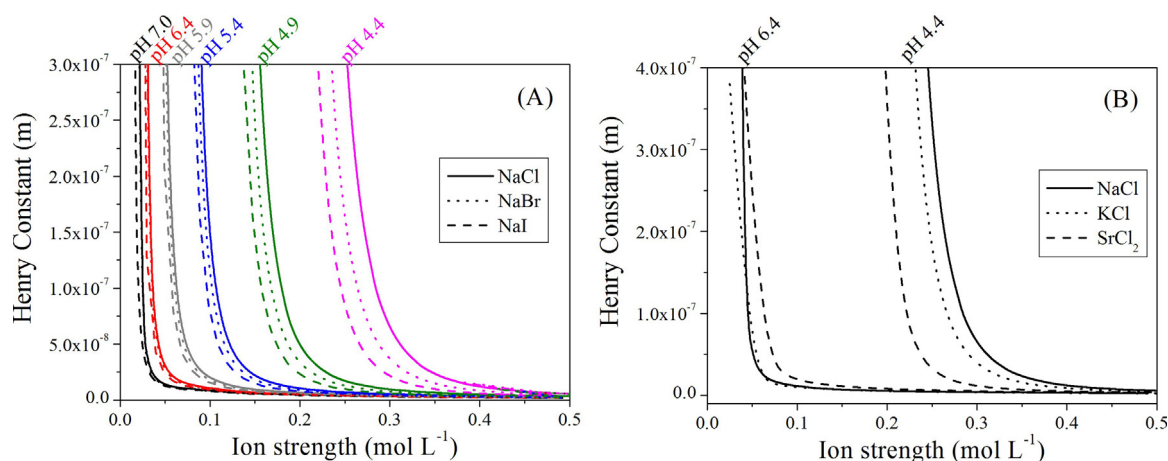


Fig. 8. The Hofmeister effect, the influence of three different salts on Henry constant for monoclonal antibody adsorption series of anions (A) and cations (B).

be relevant for systems containing concentrated electrolyte solutions.

### Acknowledgments

For financial support, we are grateful to the Brazilian Agencies, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### References

- [1] J.T.G. Verwey, E.J.W. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, 1948.
- [2] E.J.W. Verwey, Theory of the stability of lyophobic colloids, *J. Phys. Colloid Chem.* 51 (1947) 631–636, <http://dx.doi.org/10.1021/j150453a001>.
- [3] H.C. Hamaker, The London–van der Waals attraction between spherical particles, *Physica* 4 (1937) 1058–1072, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-8914\(37\)80203-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-8914(37)80203-7).
- [4] J. Ståhlberg, B. Jönsson, C. Horváth, Combined effect of coulombic and van der Waals interactions in the chromatography of proteins, *Anal. Chem.* 64 (1992) 3118–3124, <http://dx.doi.org/10.1021/ac00048a009>.
- [5] C. a Brooks, S.M. Cramer, Steric mass-action ion exchange: displacement profiles and induced salt gradients, *AIChE J.* 38 (1992) 1969–1978, <http://dx.doi.org/10.1002/aic.690381212>.
- [6] H. Iyer, S. Tapper, P. Lester, B. Wolk, R. Van Reis, Use of the steric mass action model in ion-exchange chromatographic process development, *J. Chromatogr. A* 832 (1999) 1–9, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)01002-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(98)01002-4).
- [7] W.D. Chen, H.H. Hu, Y.D. Wang, Analysis of steric mass-action model for protein adsorption equilibrium onto porous anion-exchange adsorbent, *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006) 7068–7076, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2006.07.036>.
- [8] M. Boström, D.R.M. Williams, B.W. Ninham, Specific ion effects: why DLVO theory fails for biology and colloid systems, *Phys. Rev. Lett.* 87 (2001) 168103, <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.87.168103>.
- [9] Y. Zhang, P. Cremer, Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (2006) 658–663, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.020>.
- [10] C.M. Roth, A.M. Lenhoff, Electrostatic and van der Waals contributions to protein adsorption: computation of equilibrium constants, *Langmuir* 9 (1993) 962–972, <http://dx.doi.org/10.1021/la00028a015>.
- [11] B. Guélat, G. Ströhlein, M. Lattuada, M. Morbidelli, Electrostatic model for protein adsorption in ion-exchange chromatography and application to monoclonal antibodies, lysozyme and chymotrypsinogen A, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5610–5621, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.064>.
- [12] Z. Adamczyk, P. Weroński, Application of the DLVO theory for particle deposition problems, *Adv. Colloid Interface Sci.* 83 (1999) 137–226, [http://dx.doi.org/10.1016/S0001-8686\(99\)00009-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-8686(99)00009-3).
- [13] B. Jönsson, J. Ståhlberg, The electrostatic interaction between a charged sphere and an oppositely charged planar surface and its application to protein adsorption, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 14 (1999) 67–75, [http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00025-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00025-9).
- [14] E.R.A. Lima, E.C. Biscaia, M. Boström, F.W. Tavares, J.M. Prausnitz, Osmotic second virial coefficients and phase diagrams for aqueous proteins from a much-improved Poisson-Boltzmann equation †, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 16055–16059, <http://dx.doi.org/10.1021/jp074807q>.
- [15] J. Ståhlberg, B. Jönsson, C. Horváth, Theory for electrostatic interaction chromatography of proteins, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1867–1874, <http://dx.doi.org/10.1021/ac00017a036>.
- [16] L.A. Moreira, M. Boström, B.W. Ninham, E.C. Biscaia, F.W. Tavares, Hofmeister effects: why protein charge, pH titration and protein precipitation depend on the choice of background salt solution, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 282–283 (2006) 457–463, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.11.021>.
- [17] P. Moon, D.E. Spencer, *Field Theory Handbook*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1961, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-53060-9>.
- [18] E.R.A. Lima, E.C. Biscaia, M. Boström, F.W. Tavares, Ion-Specific forces between a colloidal nanoprobe and a charged surface, *Langmuir* 23 (2007) 7456–7458, <http://dx.doi.org/10.1021/la700690g>.
- [19] E.R.A. Lima, F.W. Tavares, E.C.J. Biscaia, Finite volume solution of the modified Poisson-Boltzmann equation for two colloidal particles, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 3174–3180, <http://dx.doi.org/10.1039/b701170a>.
- [20] F.W. Tavares, D. Bratko, H.W. Blanch, J.M. Prausnitz, Ion-specific effects in the colloid-colloid or protein-protein potential of mean force: role of Salt-Macroion van der Waals interactions, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 9228–9235, <http://dx.doi.org/10.1021/jp037809t>.
- [21] J. Stankovich, S.L. Carnie, Electrical double layer interaction between dissimilar spherical colloidal particles and between a sphere and a plate: nonlinear Poisson-Boltzmann theory, *Langmuir* 12 (1996) 1453–1461, <http://dx.doi.org/10.1021/la950384k>.
- [22] S.L. Carnie, D.Y.C. Chan, J. Stankovich, Computation of forces between spherical colloidal particles: nonlinear Poisson-Boltzmann theory, *J. Colloid Interface Sci.* 165 (1994) 116–128, <http://dx.doi.org/10.1006/jcis.1994.1212>.
- [23] V.A. Parsegian, *Van der Waals Forces*, Cambridge University Press, Cambridge, 2005, <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511614606>.
- [24] B. Guélat, G. Ströhlein, M. Lattuada, L. Delegrange, P. Valax, M. Morbidelli, Simulation model for overloaded monoclonal antibody variants separations in ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1253 (2012) 32–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.081>.
- [25] L. Ehrl, Z. Jia, H. Wu, M. Lattuada, M. Soos, M. Morbidelli, Role of counterion association in colloidal stability, *Langmuir* 25 (2009) 2696–2702, <http://dx.doi.org/10.1021/la803445y>.
- [26] J.-Y. Lee, I. Han, A semi-empirical equation for activity coefficients of ions with one parameter, *Bull. Korean Chem. Soc.* 34 (2013) 3709–3714, <http://dx.doi.org/10.5012/bkcs.2013.34.12.3709>.
- [27] B. Guélat, L. Delegrange, P. Valax, M. Morbidelli, Model-based prediction of monoclonal antibody retention in ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 1298 (2013) 17–25, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.048>.
- [28] M. Salvalaglio, M. Paloni, B. Guélat, M. Morbidelli, C. Cavallotti, A two level hierarchical model of protein retention in ion exchange chromatography, *J. Chromatogr. A* 2015 (1411) 50–62, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.101>.
- [29] J.M. Scheer, W. Sandoval, J.M. Elliott, L. Shao, E. Luis, S.-C. Lewin-Koh, G. Schaefer, R. Vandlen, Reorienting the fab domains of trastuzumab results in potent HER2 activators, *PLoS One* 7 (2012) e51817, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051817>.
- [30] H. Wen, J. Hao, S.K. Li, Characterization of human sclera barrier properties for transscleral delivery of bevacizumab and ranibizumab, *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 892–903, <http://dx.doi.org/10.1002/jps.23387>.

# Apêndice D

## Artigo 02

GAMA, M. S., BARRETO, A. G., TAVARES, F. W. “The binding interaction of protein on a charged surface using Poisson–Boltzmann equation: lysozyme adsorption onto SBA-15”, *Adsorption*, v. 27, n. 7, pp. 1137–1148, sep 2021. doi: 10.1007/s10450-021-00344-6. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10450-021-00344-6>>.





# The binding interaction of protein on a charged surface using Poisson–Boltzmann equation: lysozyme adsorption onto SBA-15

Marlon de Souza Gama<sup>1</sup> · Amaro Gomes Barreto Jr.<sup>2</sup> · Frederico Wanderley Tavares<sup>1,2</sup>

Received: 30 April 2021 / Revised: 6 August 2021 / Accepted: 25 August 2021 / Published online: 17 September 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

## Abstract

A modified Poisson–Boltzmann model (PBEM) can be successfully used to determine the binding strength parameter, i.e., (Henry constant,  $K$ ), for the protein adsorbent interaction in ion-exchanger columns. Lysozyme has been employed as a standard protein for the adsorption in a mesoporous silica adsorbent. The density of aminoacid groups and silanol groups were used as inputs to calculate the protein charge density as a function of pH, salt concentration, and type of salt. Using the electrostatic potential provided as solving the PBEM with the protein charge surface and silanol wall as boundaries conditions, we calculated the  $K$  through the potential of mean force to describe the whole set of experimental data. The unique estimated parameter in this work was the volumetric accessible surface area from isotherm data for different electrolyte conditions. The results show that the protocol applied includes a pH and ionic strength dependence in the Langmuir isotherm. A sensibility test with different anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ , and  $\text{I}^-$ ) showed an agreement with the Hofmeister series for the protein/adsorbent interaction. A modification in the electrolyte concentration and pH can change the behavior of the isotherm profile for a fixed value of saturation capacity, independently calculated for spheres packed in cylinders. The calculations provide here can be helpful for the optimization of the best condition for protein adsorption.

**Keywords** Poisson–Boltzmann equation · Protein adsorption · Lysozyme · SBA-15

## 1 Introduction

The purification/separation of proteins using the adsorption process is a standard unit operation applied in the biopharmaceutics industries. There are different properties to be considered to choose an adsorbent as surface area, pore-volume, maximum adsorption capacity, and Henry constant [1]. The Henry constant is a key parameter related to the efficiency and selectivity of the column that depends on the energy interaction between each solute and the adsorbent.

Infinite dilution is a region at low concentrations that allows a linear relationship between the adsorption capacity

and equilibrium adsorbate concentration. Thus, interaction effects between proteins, such as aggregation or multilayer adsorption, can be neglected. In the 1980s, a model was proposed to describe the retention factor in infinite dilution, considering that a solute displacement occurs in a stoichiometric way when a macromolecule binds with the adsorbent [2, 3]. An improvement of this stoichiometric model was performed by Brooks and Cramer [4], in which a term related to the protein steric factor was used. This model is known as steric mass-action (SMA) and presented good performance to correlate data of protein adsorption in ion-exchange systems [5–7].

The SMA model requires prior knowledge of three parameters: the characteristic charge, the equilibrium constant, and the steric factor, for each macromolecule in solution. It is necessary chromatographic experiments of gradient elution and breakthrough columns to obtain the parameters information [4]. However, this makes the model time-consuming and material-consuming in order to obtain such data.

Parameter estimation emerges as a good approach to identify the properties needed for SMA. However, the information is not transferable to other columns, even in

✉ Frederico Wanderley Tavares  
tavares@eq.ufrj.br

Amaro Gomes Barreto Jr.  
amaro@eq.ufrj.br

<sup>1</sup> Chemical Engineering Program - PEQ/COPPE, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup> Chemical and Biochemical Engineering Processes (EPQB), School of Chemistry - EQ/UFRJ, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

chromatographic systems with the same functional groups [7]. There is a relationship between textural and column properties that are indirectly transferred to these parameters and that are not well defined by the initial hypotheses of SMA.

It is well known that the Langmuir model does not take into account explicitly the effect of salt on the intermolecular interaction between proteins and adsorbents. Similar to the SMA model [8], the use of the Langmuir equation generates the determination of semi-empirical parameters for each set of isotherms under different conditions.

Gomes et al. [9] shows a complex system involving the adsorption of human serum albumin in a mixed-mode adsorbent, where a variation in the bulk solution condition changed the isotherm behavior. The Langmuir parameters, i.e., binding affinity and the maximum saturation capacity, are both estimated simultaneously. A similar methodology is observed by [10] for the adsorption of bovine serum albumin (BSA) and lysozyme in the presence of salt for the interaction of protein on silica for a batch system.

Thermodynamic information is necessary to characterize the adsorption system where are occurring a change of bulk solution conditions. Otherwise, different parameters are needed for each as temperature, pH, electrolyte type, and electrolyte concentration [9–12].

We can use the PB equation to describe the double layer of ions dispersed around charged surfaces, improving the robustness of such models. However, just describing electrostatic forces is not enough to understand the function of ions in biological mechanisms [13]. Even the addition of van der Waals forces between the macromolecule and the surface of the adsorbate does not provide a prediction necessary to add ionic specificity information to the model.

Conventional models based on the electrostatic theory of Debye-Hückel or DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek) theory cannot describe the precipitation-inducing effects generated by the addition of different salts, as observed by the Hofmeister series. Conventional models neglect essential factors such as ion size and polarizability [13, 14].

The implementation of the dispersion force is necessary for the calculation of van der Waals type interactions between ion-macromolecule. As reported by Tavares et al. [15], the protein can be represented within a colloidal domain, and the interactions are obtained by a quantum mechanical dispersion potential, described by the Lifshitz theory. This approach proves to be quite powerful since the ion directly impacts the potential of mean force (PMF).

Ståhlberg et al. [16] presented an interesting work that reported a dependency for the retention factor of proteins with the PMF for infinity diluted ion-exchange chromatography systems. The potential interaction term was obtained by using a linearized PB equation reported by Parsegian

and Gingell [17] to calculate the interaction between two flat plates. An improvement in the geometry of this model was performed by Guélat [18], considering the interaction between a spherical colloidal surface (protein) and a flat plate (stationary phase). Despite the model complexity, it was necessary to estimate the protein charge density parameters because the ionic dispersion term was neglected.

### 1.1 The binding interaction parameter based on electrostatic interactions

Guélat et al. [19] show a multicomponent Langmuir equation based on the maximum saturation capacity and the Henry constant, reporting that the saturation capacity for the ion-exchange chromatography column can be set constant. A series of estimation steps were required for the protein charge density and the use of a DLVO-based model. However, it became possible in his work to fit the modeling with experimental data for the separation behavior of monoclonal antibodies (mAbs) in a multicomponent system.

Improvements of the Poisson–Boltzmann equation are presented that describing the influence of the ionic dispersion potential for calculating the second virial coefficient [20, 21] and the profile of ions in the vicinity of a flat charged plate, taking into account the ions size effects [22].

Lima et al. [23] showed how to obtain the electrostatic interaction by solving the Poisson–Boltzmann equation using bispherical coordinates. This set of coordinates is very convenient to represent the colloidal domain due to the high accuracy for different particle sizes, boundary conditions, and surfaces distance [24].

For a study of protein adsorption in infinite dilution, Gama et al. [25] solved a modified Poisson–Boltzmann Equation (PBEm), same as [23], reporting predictions of the Henry constant for monoclonal antibodies on different ion-exchange columns. We intent to encourage the use of the PBEm to obtain the electrostatic potential, and consequently the PMF, of the interaction of colloids on the adsorbent surface for the potential binding affinity calculation.

### 1.2 Case study: lysozyme adsorption on silica wall

A mesoporous silica material as SBA-15 is known to have a good thermal, hydrothermal capacity and high values of textural properties. The choice of modeling around silica comes from the fact that this material has highly ordered arrangements [1, 26], suggesting that the density of active sites can be considered homogeneous on the porous surface.

The albumin of bovine serum (BSA) is a soft protein, and it shows a pH-dependence in the range of 2.51 to 10.21, which can affect its structure conformations [27] because of that, considering a protein sphere-geometry for BSA at

different values of pH and ionic strength can result in a not good electrostatic contribution to the PMF.

Lysozyme has a stable globular structure for an extensive range of pH [28], and it can be assumed that confined lysozymes restrain globular shape structure [29].

This paper is structured as follows: First, we will consider a homogeneous charge density distribution on lysozyme and apply it as an input for the adsorption interaction on a silica-based adsorbent. In this step, we estimate for a batch system the accessible adsorbent area, while the binding affinity values are calculated by solving the PBEM using the aminoacid group density information. Next, we present how the model behaves according to the Hofmeister series. Sensitivity analysis for adsorption modeling in a batch system will be carried out for different pH and types of salts.

This work aims to show the use of an implementation of ionic information by including a dispersion potential in a non-linear Poisson–Boltzmann equation to calculate the Langmuir isotherm of lysozyme on SBA-15 for different ionic strengths, ion type, and pH.

## 2 Modeling approach

### 2.1 Isotherm dependency on bulk solution condition

The Langmuir equation for a single component can be written as a function of the dimensionless Henry constant and a saturation capacity [19]:

$$q_{eq} = \frac{K_{ad}(pH, I)C_{eq}}{1 + \frac{K_{ad}(pH, I)C_{eq}}{q_{max}}} \tag{1}$$

where  $C_{eq}$  is the equilibrium protein concentration in bulk ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) and  $q_{max}$  is the maximum adsorption capacity per volume of the adsorbent phase ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

A silica-based mesoporous material as SBA-15 has a high ordered pore hexagonal structure [30], and shows a type IV isotherm (N2@77K) that typically indicates parallel cylindrical pores in mesoporous materials [1, 10, 31]. Thus, we assume that the limit of the adsorption saturation capacity corresponds to a maximum packing of hard spheres in cylindrical pores. We used the following equation to calculate  $q_{max}$  [32, 33]:

$$q_{max} = \frac{Mv_p\rho}{N_{Av}(2r_p)^3} \left\{ c_1 - c_2 \exp \left[ c_3 \left( 0.5 - \frac{r_s}{2r_p} \right) \right] + c_4 \exp \left[ c_5 \left( 0.5 - \frac{r_s}{2r_p} \right) \right] \right\} \tag{2}$$

where  $r_p$  is the equivalent protein radius and  $r_s$  is the adsorbent pore radius;  $M$  is the lysozyme molecular mass (14.4 kDa),  $N_{Av}$  is the Avogadro number,  $\rho$  is the adsorbent density and  $v_p$  is the pore volume;  $c_1 = 1.158$ ,  $c_2 = 0.479$ ,  $c_3 = 0.621$ ,  $c_4 = 0.595$ , and  $c_5 = 4.014$  [33, 34].

Equation 1 shows the effective Henry constant parameter ( $K_{ad}$ ) used in the Langmuir equation related, as showed by Guélat et al. [18], with the Henry constant is calculated per unit of adsorbent area:

$$K_{ad} = \frac{A_s}{1 - \epsilon_v} K \tag{3}$$

where  $K$  is the dimensional Henry constant ( $\text{m}^3 \text{m}^{-2}$ —ration of volume and accessible area),  $A_s$  is the accessible adsorbent surface area per total volume of the system, and  $\epsilon_v$  is the liquid volume ratio (volume of fluid per total volume of the system). We find it challenging to predict  $A_s$  for a batch adsorption system; thus, this parameter is estimated here.

It is a noteworthy point that  $K$  depends on the surface changes, pH, ionic strength, type of salt, and temperature. The Henry constant is associated with the free energy change and is calculated as is suggested by [18, 19, 25]:

$$K = \int_0^\infty \left[ \exp \left( -\frac{W(I, pH, h)}{\kappa_B T} \right) - 1 \right] dh \tag{4}$$

where  $K$  is the dimensional Henry constant (m),  $h$  is the distance between the surfaces, and  $W$  is the potential of mean force contribution (PMF) for a given pH and ionic strength.

The PMF directly controls the adsorption behavior and are considering a sum of the following contributions:

$$W = W^{Ham} + W^{hs} + W^{PB} \tag{5}$$

where  $W^{hs}$  is a hard-sphere potential:

$$W^{hs} = \begin{cases} \infty & \text{for } h \leq 0 \\ 0 & \text{for } h > 0 \end{cases} \tag{6}$$

Besides the hard-sphere term and electrostatic, a Hamaker dispersion is used. We used the following equation considering the protein as a sphere and the adsorbent as a flat surface [35]:

$$W^{Ham} = \begin{cases} -\frac{H}{6} \frac{r_p}{r_p + r_h} & \text{for } h \leq r_p + r_h \\ -\frac{2H}{9} \left( \frac{r_p}{h} \right)^3 & \text{for } h > r_p + r_h \end{cases} \tag{7}$$

where  $W^{Ham}$  is the Hamaker potential,  $r_h$  is the hydration-layer thickness (1.5 Å for proteins due to the water layer), and  $H$  is the Hamaker constant for the interaction between the protein and the adsorbent. The  $W^{PB}$  represents the free energy due to the electrostatic interaction.



## 2.2 Potential of mean force based on electrostatic interaction

In our previous work [25], we showed promising results for the binding affinity between charged particles with different charged walls using a modified Poisson–Boltzmann equation (PBEm), including van der Waals interactions for ions/colloid particles and ions/wall surfaces.

We applied the following hypotheses here:

- (1) proteins are spherical particles;
- (2) aminoacid groups are homogeneously distributed on the surface and are responsible for the net protein charge.

We applied the Poisson–Boltzmann equation, assuming that the electrostatic contribution is the determinant cause for the binding affinity between a charged protein and a charged adsorbent wall, as described previously [25]:

$$\nabla^2 \psi = \frac{1}{2} [\exp(\psi - U_-) - \exp(-\psi - U_+)] \quad (8)$$

The modification includes the non-electrostatic contributions ( $U_{\pm}$ ), calculated assuming spherical ions, globular protein, and flat support surface [13, 20, 21]:

$$U_{\pm} = \frac{-B_{\pm P} r_{ion}^3}{(r_1 - r_p)^3 \left[ 1 + \frac{(r_1 - r_p)^3}{2 r_p^3} \right]} + \frac{-B_{\pm S} r_{ion}^3}{r_2^3} \quad (9)$$

where  $r_{ion} = 2 \text{ \AA}$  for all ions,  $r_1$  is the distance between the center of the spherical protein and the ions and  $r_2$  is the distance between the adsorbent wall and the ions; and  $B_{\pm P}$  are the ions-protein and  $B_{\pm S}$  are ions-adsorbent dispersion interactions. Here, we assume, as [23, 25],  $B_{+P} = B_{+S} = B_+$  for the cations and  $B_{-P} = B_{-S} = B_-$  for the anions.

We highlight that the interaction of protein and ions are taken by the van der Waals term using the dispersion potential ( $B_{\pm}$ ) that accounts for the ionic polarization by quantum mechanical fluctuation described by the Lifshitz theory [13]. We used the following dispersion potentials values for the ions, as reported by Tavares et al. [14] that applied the Lifshitz theory to obtain this parameter for different ions in contact with a colloidal surface (protein):  $\text{Na}^+$  ( $B_+ = 0.138$ ),  $\text{Cl}^-$  ( $B_- = 1.086$ ),  $\text{Br}^-$  ( $B_- = 1.348$ ),  $\text{I}^-$  ( $B_- = 1.735$ ).

The use of bispherical coordinates is an alternative for discretizing a nonlinear Poisson–Boltzmann model [21]. This approach permits to transfer of the problem from a sphere/plane to a rectangular domain. Thus, Eq. 9 is solved taking into consideration a discretization in bispherical coordinates  $(\eta, \theta)$  [36]:

$$\nabla^2 \psi = \frac{\cosh \eta - \cos \theta}{\beta^2 \sin \theta} \left[ \frac{\partial}{\partial \theta} \left( \frac{\sin \theta}{\cosh \eta - \cos \theta} \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \right) + \sin \theta \frac{\partial}{\partial \eta} \left( \frac{1}{\cosh \eta - \cos \theta} \right) \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \right] \quad (10)$$

where  $\psi$  is the dimensionless electrostatical potential  $\left( \frac{e \phi}{\kappa_B T} \right)$ ,  $e$  is the elemental electron charge,  $\kappa_B$  is the Boltzmann constant, and  $T$  is the temperature;  $\beta = k_D r_p \sinh(\eta_0)$ , with  $k_D$  being the inverse of the Debye length, and  $\eta_0$  is related with the sphere surface.

The boundary conditions in  $(\eta)$  coordinate are:

$$\begin{aligned} \left( \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \right)_{\eta=0} &= -\frac{\sigma_2}{\epsilon \epsilon_0} \frac{\beta}{\cosh(\eta_0) - \cos(\theta)} \\ \left( \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \right)_{\eta=\eta_0} &= -\frac{\sigma_1}{\epsilon \epsilon_0} \frac{\beta}{\cosh(\eta_0) - \cos(\theta)} \end{aligned} \quad (11)$$

where  $\sigma_1$  represents the protein charge density and  $\sigma_2$  the charge adsorbent wall.

The correlation of the bispherical with the Cartesian coordinates are:

$$\begin{aligned} x &= \frac{\beta \sin(\theta)}{\cosh(\eta) - \cos(\theta)} \\ z &= \frac{\beta \sinh(\eta)}{\cosh(\eta) - \cos(\theta)} \end{aligned} \quad (12)$$

We used a finite volume method and the Thomas algorithm to solve the electrostatic potential through PBEm. A more detailed description of this procedure can be found at [23]. We calculated the interaction force between the surfaces as follows:

$$\begin{aligned} f(\eta) = 2\pi \int_0^\pi \left\{ \left[ \frac{\beta^2 (\cosh \psi - 1)}{(\cosh \eta - \cos \theta)^2} + \frac{1}{2} \left[ \left( \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \right)^2 - \left( \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \right)^2 \right] (1 - \cosh \eta \cdot \cos \theta) \right] \right. \\ \left. + \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \sinh \eta \sin \theta \right\} \frac{\sin \theta}{(\cosh \eta - \cos \theta)} d\theta \end{aligned} \quad (13)$$

The integral is set over the surface at  $\eta = \frac{\eta_0}{2}$  for a sphere-plane case [37]. The correlation between  $\eta_0$  and  $k_D h$  is given by:

$$\frac{\beta}{\tanh(\eta_0)} = k_D (r_p + h) \quad (14)$$

Finally, once we obtain the force necessary to set the surfaces separated at several distances ( $h$ ), the electrostatic energy is calculated according to:

$$\frac{W^{PB}(k_D h)}{\kappa_B T} = -\epsilon \epsilon_0 \left( \frac{\kappa_B T}{e^2} \right) \int_{\infty}^{k_D h} f(h) dh \quad (15)$$

The potential  $W^{PB}$  is used in Eq. 5 to give the electrostatic contribution to calculate the Henry constant for a given bulk solution condition.

### 2.3 Surface charge density

The protein charge density,  $\sigma_1$  (Eq. 11), can be expressed as the sum of the acidic and basic aminoacids groups. We used those contributions as follows:

$$\sigma_1(pH, I) = \sum_i \sigma_{(+), i} + \sum_j \sigma_{(-), j} \quad (16)$$

We assume that all aminoacid groups are in contact with the solvent. The bulk solution condition induces a variation on the total charge due to an association/dissociation equilibrium regulation for the ions on the aminoacid groups. The cationic groups are determined as [38]:

$$\sigma_{(+), i} = \frac{+F \rho_i}{1 + (Ka_{i+}/c_{H+}) + c_{anion} \gamma \cdot Ks_{iCl}} \quad (17)$$

where  $F$  is the Faraday constant ( $96,485 \text{ C mol}^{-1}$ );  $\rho_i$  is the density of the surface groups  $i$  ( $\text{mol m}^{-2}$ ), arginine (Arg), histidine (His), lysine (Lys), and the N-terminal groups;  $\gamma$  is the activity coefficient calculated from a semi-empirical extended Debye–Hückel relationship [39], and  $c_{H+}$  is the hydrogen ion concentration ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $Ka_{i+}$  is the effective dissociation constant ( $\text{mol L}^{-1}$ ), and  $Ks_{iCl}$  the effective association constant for each group  $i$  at the protein surface. Hydrogen ion concentration is calculated through the bulk pH value, expressed as  $c_{H+} = 10^{-pH}$ .

For the anionic groups and the groups present on the adsorbent charged wall:

$$\sigma_{(-), j} = \frac{-F \rho_j}{1 + (c_{H+}/Ka_{j-}) + c_{cation} \gamma \cdot Ks_{jNa}} \quad (18)$$

for  $\rho_j$  as the density of the surface groups  $j$  ( $\text{mol m}^{-2}$ ), aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), tyrosine (Tyr), and C-terminal groups (Ct), and  $Ks_{jNa}$  the effective association constant for each group  $j$  at the protein surface.

The effective dissociation constants in Eqs. 18 and 17 can be compute as a function of temperature and salt concentration. We applied a general equation to correct the decimal cologarithm of the effective dissociation constants. A more detailed description is reported by [18, 40].

The density of each component group ( $\rho$ ) was calculated by the ratio between the total number of aminoacids residues (see the methodology section, Table 1) and the protein surface area. For the adsorbent, the total charge density ( $\sigma_2$ ) is

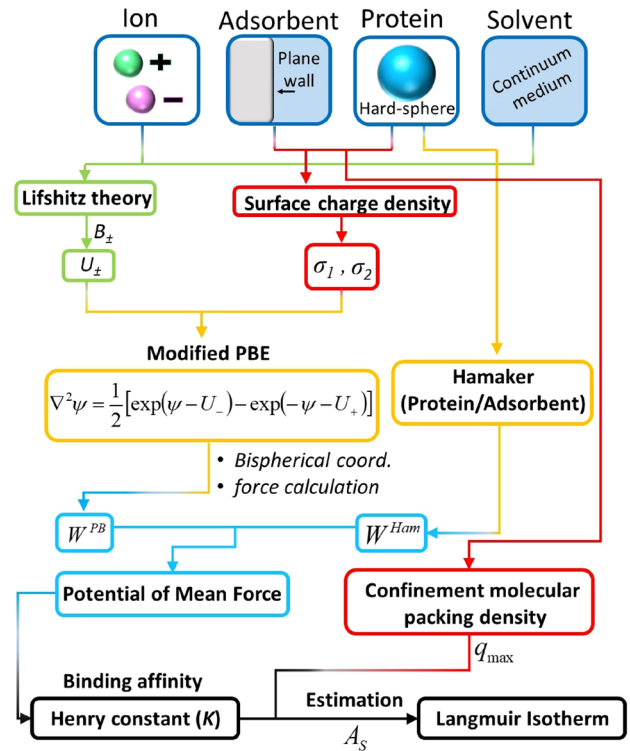


Fig. 1 Schematic representation of the calculations used to obtain the Langmuir isotherm as a function of the solution conditions

Table 1 Number of aminoacids residues ( $N_{res}$ ) and correspondent pKa value [42]

	pKa	$N_{res}$
Asp	3.5	7
Glu	4.2	2
Tyr	10.3	3
Arg	12.0	11
His	6.6	1
Lys	10.5	6
Nt	7.7	1
Ct	3.3	1

determinate through the contribution of the silanol groups, calculated using Eq. 18. We neglect a modification in the effective dissociation constant of the silanols groups as a function of the ionic concentration.

### 3 Methodology

The PBE presented above can be used to calculate the PMF and then the protein-adsorbent affinity. The block diagram in Fig. 1 represents the following steps to calculate a Langmuir isotherm as a function of the solution conditions.

First, we use the density of aminoacid contributions to calculate the lysozyme charge density and apply it as an

input for the adsorption interaction simulation of protein on a silica-based adsorbent. We calculated the maximum saturation adsorption (Eq. 2) for cylindrical pores. The binding affinity values ( $K$ ) are calculated by solving the PBEM using the group density information.

The parameters  $q_{max}$  and  $K$  are used in Eqs. 1 and 3, respectively. It is necessary to estimate the accessible adsorbent surface area to fit the Langmuir isotherms. Here, a single value of  $A_s$  (Eq. 3) is used to describe all experimental data.

Finally, we present how the model behaves according to the Hofmeister series. Sensitivity analysis for adsorption is carried out for different pH and salt types.

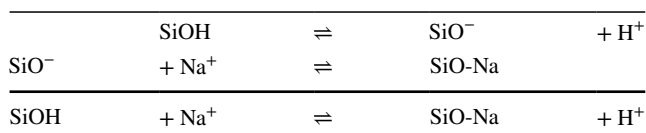
### 3.1 Protein properties

The protein hydrodynamic radius ( $r_p$ ) was set as mean values of 2.3 nm [41]. We used the following aminoacid residues and their pKa, reported by [42] and shown in Table 1.

The literature is scarce about the association constant of ions in the aminoacid groups. Here, we used the values of  $K_{s_{jNa}} = 10^{-0.26}$  for the association of the cation in any anionic aminoacid group (Eq. 18); and  $K_{s_{iCl}} = 10^{0.20}$  for the anion/cationic groups (Eq. 17) [18].

### 3.2 Silanol surface properties

We use the data from [10] that reports the behavior of lysozyme adsorption on a mesoporous adsorbent based on silica (SBA-15). In order to model this interaction, the following association and dissociation reactions for the silanol groups on the SBA-15 surface are considered [43]:



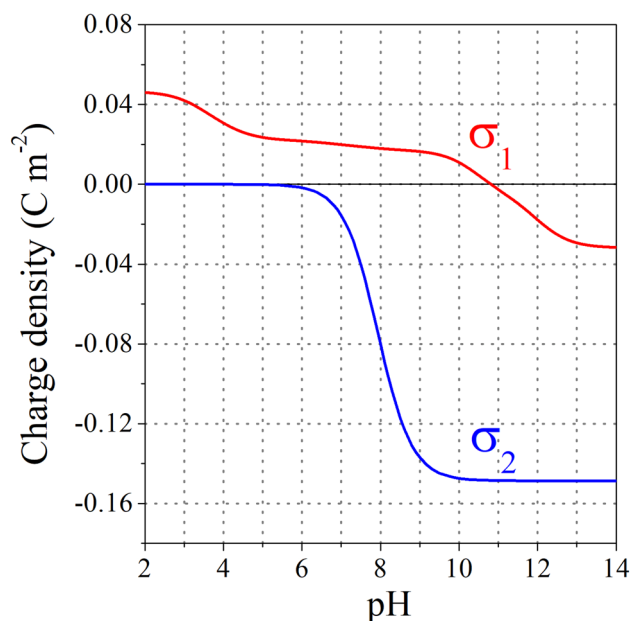
The density values for the silanol groups are estimated as the sum of the accessible germinal and vicinal groups on the surface of silica [44]. Table 2 shows the values for the parameters applied using SBA-15 as an adsorbent. The  $pK_{a_{SiOH}}$  is the acid-base dissociation constant for the silanol groups, obtained by a mean value between the germinal and vicinal groups.

The effective association constant of the SiO-Na group has calculated using the following equation:  $pK = \Delta G/2.303RT$ , where the  $\Delta G$  is the changes in the total Gibbs free energy for the SiO-Na bond reported by [47] in a quantum chemistry study at pH 10; and  $R$  is the gas constant.

For a particle interaction with a surface in solution, the Hamaker constant is usually found in the range of  $\sim 1 - 4$

**Table 2** Mesoporous silica-based adsorbent parameters

Binding group	$\equiv SiOH$	
$\rho_{ads}$ (mol m <sup>-2</sup> )	$1.54 \times 10^{-6}$	[43]
Hamaker ( $H$ )	$1.5 \kappa_B T$	[18, 45]
$pK_{a_{SiOH}}$	7.93	[46]
$pK_{s_{SiO-Na}}$	2.37	[47]
$(1-\epsilon_v)$	$2.56 \times 10^{-3}$	[10]
$v_p$ (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	2.52	
$r_s$ (nm)	13.5	
$\rho$ (g cm <sup>-3</sup> )	1.95	



**Fig. 2** Charge density values as a function of pH using the estimated parameters. The  $\sigma_1$  represents the sum of all aminoacid densities, and  $\sigma_2$  is the adsorbent charge density for an electrolyte-free solution

$\kappa_B T$  [45]. We are assuming a mean value of  $1.5 \kappa_B T$ , considering the value reported by [18].

## 4 Results and discussion

For the first step, we calculated the charge density profile as a function of pH (Fig. 2) using the reported information of the aminoacid density groups (Table 1). As observed by  $\sigma_1$ , we found a positive charge at low pH, and the density charge is zero at pH 10.8, consistent with the lysozyme isoelectric point. The protein charge profile is in concordance with the lysozyme net charge reported by [42], and  $\sigma_2$  profile is in agreement as reported by [48, 49].

For the charge densities, calculated through Eqs. 18 and 17, if the effective dissociation constant is neglected

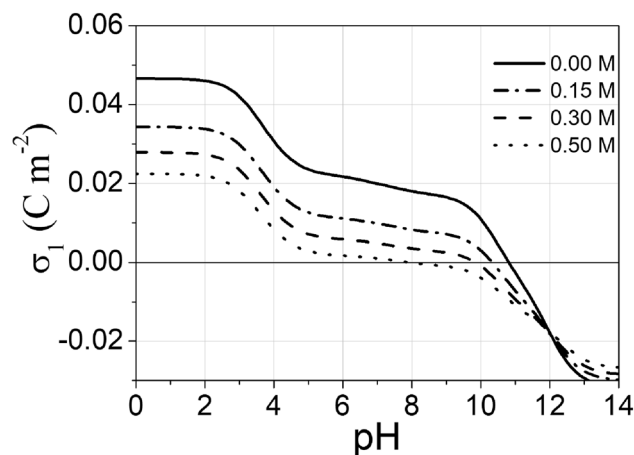
the equation becomes related to a Henderson-Hasselbalch approach. Herein, we include a direct salt dependency in  $\sigma_{\pm}$ , and at the description of  $pK_a$  value. This consideration showed to be a good improvement for previous works while describing the charge densities of monoclonal antibodies and ion-exchange resins [18, 25]. It is observed the application of the HH equation for lysozyme in the study of Hofmeister effects for protein interaction [20], and the determination of the osmotic second virial coefficients [21]. The application of the HH equation is also reported by Franco et al. [50] for the development of an extensive mathematical formulation able to describe the solubility of bovine  $\beta$ -lactoglobulin for different ionic strength in the vicinity for its pI. A good agreement between model and experimental data was reported in his work [50], even without an ionic strength dependency of the  $pK_a$  value.

Bhattacharyya et al. [51] also investigate lysozyme adsorption in ordered mesoporous materials, reporting experimental evidence of the presence of electrostatic and nonelectrostatic forces for the adsorption interaction. They used useful tools for  $pK_a$  calculation (PROPKA 2.0 software [52, 53]) able to point which ionizable groups are on the surface or buried inside the crystalline structures. We used here the theoretical titration curve of lysozyme obtained by [42] that takes into consideration the protein translational motion and rotation effects in solution.

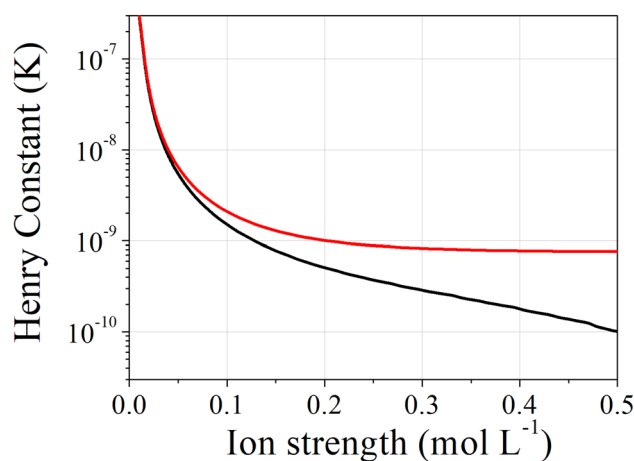
It is a challenging task to find a high accuracy for the ionization profile. Bottlenecks for  $pK_a$  prediction can appear for different sources, as the estimation of some titratable groups disregarding the presence of non-HH shape or a wrong methodology in the analysis of the NMR experimental data. For a more reliable calculation,  $pK_a$  values should be corrected to correspond possible experimental shifts in the ionization profile due to ligand binding, or the presence of water/ions molecules in the structure [52, 54].

For the sake of generality, besides the different methodology, we were able to find a consistent value for the pI. The lysozyme is a well-known small protein; thus, a hypothesis that is being conserved is that all ionizable groups are located on its surface. Changes in the solution conditions will affect these ionizable groups, resulting in a consistent electrostatic effect from salt solution on the displacement of protein pI (Fig. 3).

The charge group densities  $\sigma_1$  and  $\sigma_2$  were used as inputs to the modified Poisson–Boltzmann model to obtain the electrostatic contribution to the PMF between lysozyme and silica surface, as shown in [25]. Figure 4 shows the Henry constant behavior as a function of ionic strength for the pH equal to 10, the same pH as the experimental isotherm adsorption reported by [10]. The Henry constant has an exponential decay with an increase in the electrolyte concentration. This behavior is related to the electrostatic screening of ions on the vicinity of both surfaces. Also,



**Fig. 3** The protein charge density ( $\sigma_1$ ) as a function of pH and ionic strength of NaCl salt solution



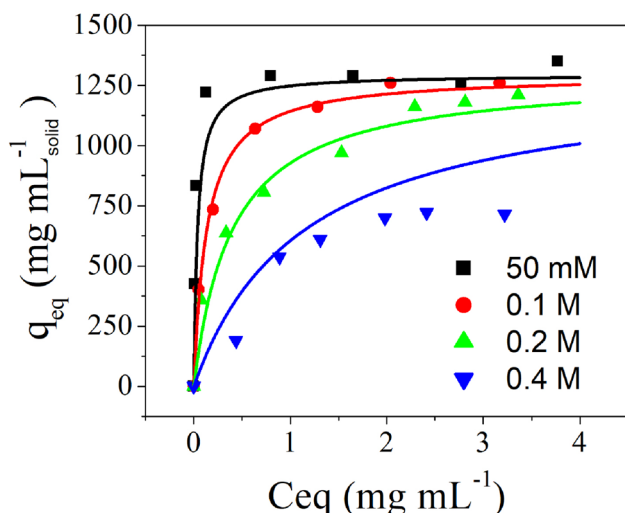
**Fig. 4** Henry constant profile (Eq. 4) for the lysozyme adsorption on the silica surface. The (—) is the model neglecting the dispersion potential ( $U_{\pm} = 0$ ), and (—) is considering  $U_{\pm} \neq 0$ . The conditions are NaCl concentration in pH 10.0 at 25 °C

the ionic strength affects the charged surface (Eqs. 18 and 17) directly, and those combinations lead to this behavior.

Neglecting the dispersion potential, Fig. 4 shows an overestimation of the Henry constant. The dispersion potential contribution shows to be significant for the range of salt concentration of 0.1 to 0.5 M.

The maximum saturation capacity of  $q_{max} = 1295.09 \text{ mg mL}^{-1}$ , or  $665.23 \text{ mg g}^{-1}$ , was obtained by Eq. 2. The high capacity is characteristic for mesoporous silica-based material, according to the literature [1].

The isotherms for lysozyme, shown in Fig. 5, are calculated following the procedure described in Fig. 1. For the assay in which a non-salt the Henry constant considering only buffer ionic strength (50 mM). The calculated values

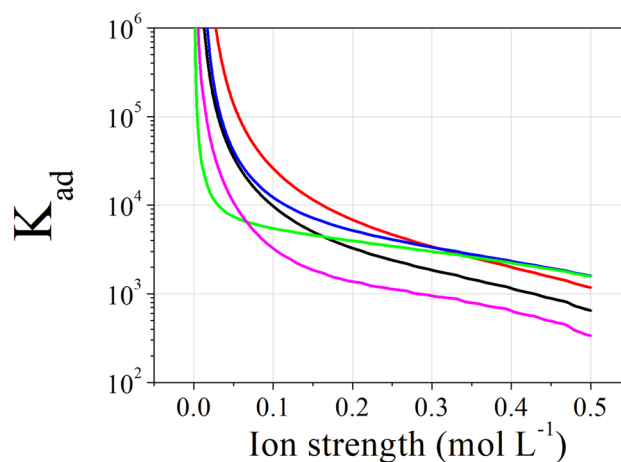


**Fig. 5** Isotherm adsorption of lysozyme on a silica surface. The  $q_{max}$  and  $K_{ad}$  (effective Henry constant) are calculated. The lines represent the Langmuir model, and the points are experimental data [10] for pH 10.0 at 25 °C. The experimental methodology reported by Nogueira (2016) [10] follows the same protocol by [1]

are ( $K_{ad}$ , Eq. 1):  $3.47 \times 10^4$  (50 mM),  $9.72 \times 10^3$  (0.1 M),  $3.27 \times 10^3$  (0.2 M), and  $1.14 \times 10^3$  (0.4 M).

We estimated an  $A_s$  of  $1.65 \times 10^{10}$  ( $m^2 m^{-3}$ ) with  $R^2$  of 0.93. It is reported by [18] a value of  $1.03 \times 10^8$  ( $m^2 m^{-3}$ ) for lysozyme on an ion-exchange resin. Besides the distinction in the textural properties between the adsorbents, the difference of two orders of magnitude between the  $A_s$  values may be attributed to underestimating the Henry constant. The inclusion of more effects in the PMF, e.g., hydrophobic effects, should be analyzed for future works. Despite this, the Henry curve still preserves the dependence on pH and ionic strength, having  $A_s$  as a constant parameter and independent of the solution conditions.

An often hypothesis used when solving a Poisson–Boltzmann equation is that the density of charges needs to be distributed evenly on the surface. The lysozyme presents an oriented polarization leading to the formation of a dipole moment [41, 55]. The inhomogeneity of charges can also be visualized for a molecular dynamics (MD) simulation [56], where the lysozyme was studied in a cage charged system in a low ionic strength at pH 7.0. Salvalaglio and coworkers [57] used MD simulations to obtain the PMF for the interaction between lysozyme in an ion-exchange chromatographic column, showing minor deviations from experimental data on retention factor values. Despite the promising results obtained by MD simulations, they present a time-consuming disadvantage. As shown here, the proposed mesoscopic modeling showed to make predictions when we analyze adsorption of protein in an extensive range of pH and ionic strength.



**Fig. 6** Effective Henry constant (3) profile for range of NaCl concentration for: (—) pH 10.3, (—) pH 10, (—) pH 9.0, (—) pH 7.0, and (—) pH 6.0. Adsorption interaction of lysozyme on a silica surface at 25 °C

We obtained an excellent agreement with only one parameter for all isotherms. These results show a promising application for adsorption optimization. Once  $q_{max}$  is known, the dependency with the solution conditions can be adequately predicted by the proposed procedure (Fig. 1). The Henry constant needs to be calculated for each temperature variation, type of salt and solvent, pH, and electrolyte concentration.

As we showed in Fig. 2,  $\sigma_1$  and  $\sigma_2$  are strongly influenced by the solution pH, the electrostatic attraction is less significant for pH lower than pH 6 and close to the protein pI. The direct nonelectrostatic interaction between the protein and the adsorbent surface is the dominant attraction contribution. To study the influence of pH, Fig. 6 shows the Henry constant from pH 6.0 to pH 10.3. The Henry constant indicates that at pH 9.0, we can find a maximum difference in charge densities between the two surfaces.

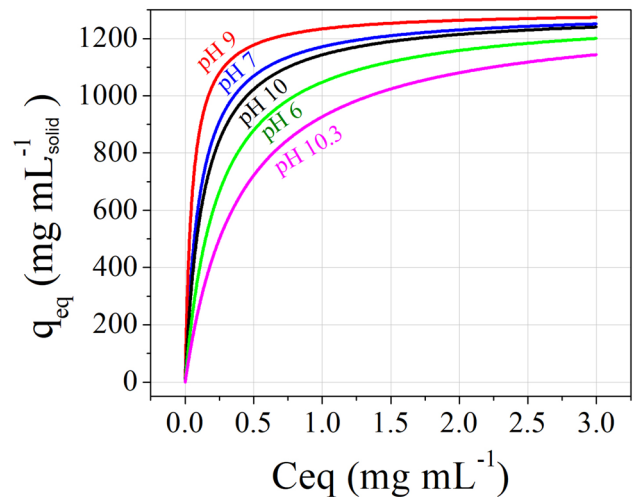
As shown in Figs. 6 and 7, the influence of the pH on protein adsorption is not straightforward and depends on the salt concentration. Figure 7a shows non-trivial behavior for low salt concentration. The equilibrium adsorption capacity can follow a direct influence on the pH for high NaCl salt solution, as shown in Fig. 7b; however,  $q_{eq}$  decreases.

As pH 9 showed a strong interaction between adsorbent-adsorbate in the range of pH 6.0 to 10.3, we chose this pH to calculate the adsorption isotherms at different salts conditions. Figure 8 shows the sensibility analysis of the  $K_{ad}$  parameter for NaCl, NaBr, and NaI. As was already shown in Fig. 2, the Henry constant differences are mainly due to the nonelectrostatic term given by the dispersion potential (Eq. 9).

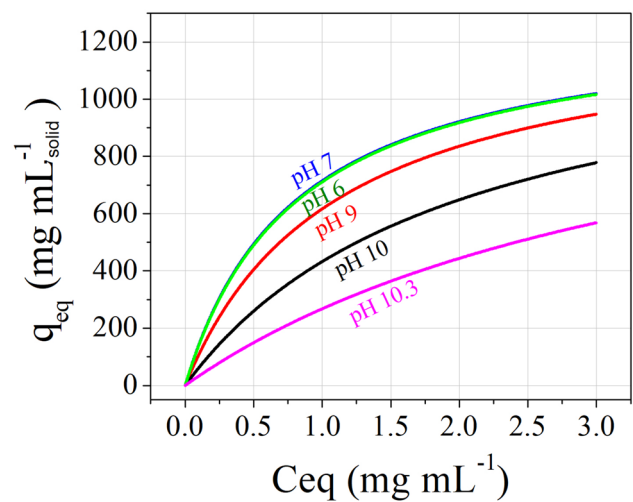
Figure 8 reports a behavior similar to the Hofmeister series for anions in terms of the screening of the lysozyme



**Fig. 7** Isotherm adsorption of lysozyme on SBA-15 for several pHs and two ionic strengths of **a** 0.10 mol L<sup>-1</sup>, and **b** 0.50 mol L<sup>-1</sup> NaCl



(a)



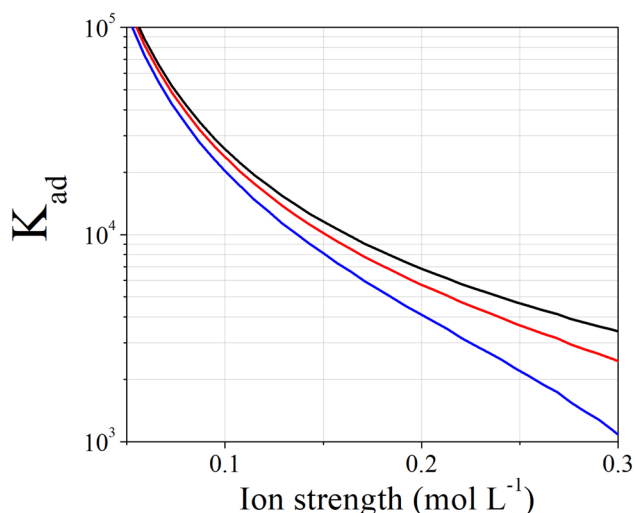
(b)

charge. It is worthy to point out that as we increase anion concentration, it increases the screening effect on the protein and decreases the Henry constant. This effect is related to the anion polarizability that follows the same sequence:  $I^- > Br^- > Cl^-$ . Following the Hofmeister series is not a rule. An inverse in the series is reported by Salis et al. [49] for functionalized SBA-15 (SBA-15-NH<sub>2</sub>) material due to different dielectric properties for the amino-functionalized SBA-15 and the changing of the ion polarizability in the vicinity of the surface. The results acknowledge a significant dependency of ion effects for protein adsorption.

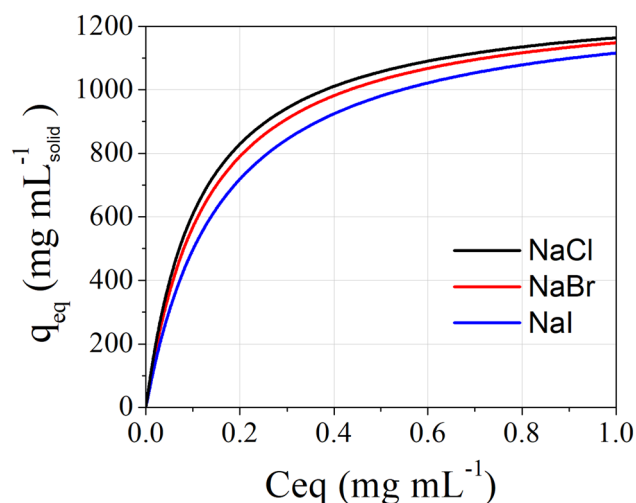
As demonstrated in Fig. 9, the adsorption system followed the behavior in previously properties from the Henry constant in Fig. 8 without changing the saturation capacity. It is noteworthy that  $q_{max}$  is a fixed parameter and is consistent for all Langmuir isotherms in this work;

therefore, a behavior modification is exclusively by  $K_{ad}$  due to its dependency on the solution conditions. If we ignored the thermodynamic model and applied a two-parameter estimation for the Langmuir isotherms, it can give a misleading value about the maximum saturation capacity.

Gomes et al. [9] provide good observations about the electrostatic influence for the binding of human serum albumin adsorption on a mixed-mode adsorbent. However,  $q_{max}$  and the Langmuir adsorption constant are determined by each experimental adsorption isotherms, finding a decreasing of  $q_{max}$  as pH or salt concentration is increased. Zhang et al. [58] report a similar dependency for the adsorption of lysozyme on anion-exchange chromatography packed with polymer beads. They noticed a slight deviation of the estimated  $q_{max}$  at different pH, although it was reported a



**Fig. 8** Effective Henry constant (Eq. 3) profile for the lysozyme binding on a silica surface for different salt type: (—) NaCl, (—) NaBr, (—) NaI for pH 9.0 at 25 °C



**Fig. 9** Calculated isotherm adsorption of lysozyme on SBA-15 for different salt solutions of NaCl, NaBr and NaI, with an ionic strength of 0.15 mol L<sup>-1</sup> at pH 9.0

decreased as it increased the salt concentration from 0.0 to 0.3 M NaCl.

The estimation of two or more parameters using a single equation should be better analyzed to see how closely these parameters are correlated. Herein, we neglected a hypothesis of competitive ion adsorption on the adsorbent sites, showing that  $q_{max}$  can be considered only as a function of textural properties of the adsorbent and the size of the protein.

The Henry constant as a function of the solution conditions showed an excellent tool for protein adsorption isotherms. As the pH and salt dependency are irregular (Fig. 7), the calculation of the binding affinity through a modified

Poisson–Boltzmann showed to be a robust improvement for the adsorption optimization process.

## 5 Conclusion

We applied a non-linear Poisson–Boltzmann equation in bispherical coordinates to obtain the Henry constant for the adsorption of lysozyme on based material silica (SBA-15). The methodology allowed an explicit dependence of the ionic strength, salt type, and pH. The charge density for the lysozyme was used as an input to calculate the binding affinity on the silica surface. The result showed that the knowledge of the nature of protein-adsorbent interaction, the whole adsorption data are described with only one parameter related to the geometry of the material. As we study the isotherms for different salts, ion polarizability showed to play an important role. As the ion polarizability increases, the Henry constant decreases due to the ion screening. Variation in the pH showed to be more complex due to a salt dependency. This work demonstrated that the electrostatic and the van der Waals contribution must be understood to predict protein adsorption isotherms. Despite the non-analyticity of the model provided by this approach, the binding interaction parameter calculated here was suitable to describe the Henry constant for different ionic strengths without any adjustable parameter of the PMF model. It indicates that our approach preserves some physics of the real phenomena. Also, the type of salt and pH effects were demonstrated. In this way, our approach could be used to generate reliable pseudo-experimental data faster than a more detailed model, like molecular dynamics, to generate an empirical model based on machine learning, for instance.

**Acknowledgements** The authors thank the financial support from the Brazilian National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP, Brazil) and PETROBRAS through the Clause of Investments in Research, Development, and Innovation. This study was financed by the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq, Brazil) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil). The authors thank all the comments and suggestions from the reviewers that much improved the manuscript.

## References

1. Santos, S.M.L.D., Nogueira, K.A.B., Gama, M.D.S., Lima, J.D.F., Silva Júnior, L.J.D., Azevedo, D.C.S.D.: Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica (sba-15 and sba-16) for adsorption of biomolecules. *Microporous Mesoporous Mater.* **180**, 284–292 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.06.043>
2. Regnier, F.: High-performance liquid chromatography of biopolymers. *Science* **222**(4621), 245–252 (1983). <https://doi.org/10.1126/science.6353575>

3. Regnier, F.E., Mazsaroff, I.: A theoretical examination of adsorption processes in preparative liquid chromatography of proteins. *Biotechnol. Prog.* **3**(1), 22–26 (1987). <https://doi.org/10.1002/btpr.5420030105>
4. Brooks, C.A., Cramer, S.M.: Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients. *AIChE J.* **38**(12), 1969–1978 (1992). <https://doi.org/10.1002/aic.690381212>
5. Iyer, H., Tapper, S., Lester, P., Wolk, B., van Reis, R.: Use of the steric mass action model in ion-exchange chromatographic process development. *J. Chromatogr. A* **832**(1), 1–9 (1999). [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)01002-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)01002-4)
6. Geng, X., Zebolsky, D.M.: The stoichiometric displacement model and Langmuir and Freundlich adsorption. *J. Chem. Educ.* **79**(3), 385 (2002). <https://doi.org/10.1021/ed079p385>
7. Osberghaus, A., Hepbildikler, S., Nath, S., Haindl, M., von Lieres, E., Hubbuch, J.: Determination of parameters for the steric mass action model—a comparison between two approaches. *J. Chromatogr. A* **1233**, 54–65 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.004>
8. Chen, W.D., Hu, H.H., Wang, Y.D.: Analysis of steric mass-action model for protein adsorption equilibrium onto porous anion-exchange adsorbent. *Chem. Eng. Sci.* **61**(21), 7068–7076 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.07.036>
9. Gomes, P.F., Loureiro, J., Rodrigues, A.: Adsorption of human serum albumin (hsa) on a mixed-mode adsorbent: equilibrium and kinetics. *Adsorption* **23**, 491–505 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10450-017-9861-x>
10. Nogueira, K.A.B.: Study of biomolecules adsorption (serum albumin bovine and lysozyme) in mesoporous materials. Master's thesis, Department of Chemical Engineering - UFC, <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/23216> (2016)
11. Torres, M.A., Beppu, M.M., Santana, C.C.: Characterization of chemically modified chitosan microspheres as adsorbents using standard Proteins (bovine serum albumin and lysozyme). *Braz. J. Chem. Eng.* **24**, 325–336 (2007)
12. Tong, X.D., Dong, X.Y., Sun, Y.: Lysozyme adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent. *Biochem. Eng. J.* **12**(2), 117–124 (2002). [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00063-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00063-3)
13. Salis, A., Ninham, B.: Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 7358–7377 (2014). <https://doi.org/10.1039/c4cs00144c>
14. 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. *J. Phys. Chem. B* **108**(26), 9228–9235 (2004). <https://doi.org/10.1021/jp037809t>
15. Tavares, F.W., Bratko, D., Prausnitz, J.M.: The role of salt–macroion van der Waals interactions in the colloid–colloid potential of mean force. *Current Opin. Colloid Interface Sci.* **9**(1), 81–86 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.05.008>
16. Ståhlberg, J., Joansson, B., Horvath, C.: Theory for electrostatic interaction chromatography of proteins. *Anal. Chem.* **63**(17), 1867–1874 (1991). <https://doi.org/10.1021/ac00017a036>
17. Parsegian, V., Gingell, D.: On the electrostatic interaction across a salt solution between two bodies bearing unequal charges. *Biophys. J.* **12**(9), 1192–1204 (1972). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(72\)86155-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(72)86155-1)
18. 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. *J. Chromatogr. A* **1217**(35), 5610–5621 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.064>
19. Guélat, B., Ströhlein, G., Lattuada, M., Delegrange, L., Valax, P., Morbidelli, M.: Simulation model for overloaded monoclonal antibody variants separations in ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* **1253**, 32–43 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.081>
20. 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. *J. Braz. Chem. Soc.* **18**(1), 223–230 (2007). <https://doi.org/10.1590/s0103-50532007000100026>
21. 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. *J. Phys. Chem. C* **111**(43), 16055–16059 (2007). <https://doi.org/10.1021/jp074807q>
22. Alijó, P., Tavares, F., Biscaia, E., Jr.: Double layer interaction between charged parallel plates using a modified Poisson–Boltzmann equation to include size effects and ion specificity. *Colloids Surf. A* **412**, 29–35 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.07.008>
23. Lima, E.R.A., Tavares, F.W., Biscaia, E.C., Jr.: Finite volume solution of the modified Poisson–Boltzmann equation for two colloidal particles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 3174–3180 (2007). <https://doi.org/10.1039/B701170A>
24. Carnie, S.L., Chan, D.Y., Stankovich, J.: Computation of forces between spherical colloidal particles: Nonlinear Poisson–Boltzmann theory. *J. Colloid Interface Sci.* **165**(1), 116–128 (1994). <https://doi.org/10.1006/jcis.1994.1212>
25. Gama, M., Simões Santos, M., Lima, E., Tavares, F., Barreto, A., Jr.: A modified Poisson–Boltzmann equation applied to protein adsorption. *J. Chromatogr. A* **1531**, 74–82 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.022>
26. Vilarrasa-García, E., Cecilia, J., Santos, S., Cavalcante, C., Jiménez-Jiménez, J., Azevedo, D., Rodríguez-Castellón, E.: Co2 adsorption on aptes functionalized mesoporous foams obtained from mesoporous silicas. *Microporous Mesoporous Mater.* **187**, 125–134 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.12.023>
27. Sadler, P.J., Tucker, A.: pH-induced structural transitions of bovine serum albumin. *Eur. J. Biochem.* **212**(3), 811–817 (1993). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17722.x>
28. Lu, J.R., Su, T.J., Howlin, B.J.: The effect of solution pH on the structural conformation of lysozyme layers adsorbed on the surface of water. *J. Phys. Chem. B* **103**(28), 5903–5909 (1999). <https://doi.org/10.1021/jp990129z>
29. Balme, S., Guegan, R., Janot, J., Jaber, M., Lepoitevin, M., Djaridin, P., Bourrat, X., Motelica-Heino, M.: Structure, orientation and stability of lysozyme confined in layered materials. *Soft Matter* **9**, 3188–3196 (2013). <https://doi.org/10.1039/C3SM27880H>
30. Zhao, D., Huo, Q., Feng, J., Chmelka, B.F., Stucky, G.D.: Non-ionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *J. Am. Chem. Soc.* **120**(24), 6024–6036 (1998). <https://doi.org/10.1021/ja974025i>
31. Ravikovitch, P.I., Neimark, A.V.: Characterization of micro- and mesoporosity in sba-15 materials from adsorption data by the nldft method. *J. Phys. Chem. B* **105**(29), 6817–6823 (2001). <https://doi.org/10.1021/jp010621u>
32. Travalloni, L., Castier, M., Tavares, F.W., Sandler, S.I.: Thermodynamic modeling of confined fluids using an extension of the generalized van der Waals theory. *Chem. Eng. Sci.* **65**(10), 3088–3099 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.01.032>
33. Travalloni, L., Castier, M., Tavares, F.W.: Phase equilibrium of fluids confined in porous media from an extended Peng–Robinson equation of state. *Fluid Phase Equilib.* **362**, 335–341 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2013.10.049>
34. Barbosa, G.D., DLima, M.L., Daghash, S.M., Castier, M., Tavares, F.W., Travalloni, L.: Cubic equations of state extended to confined



- fluids: New mixing rules and extension to spherical pores. *Chem. Eng. Sci.* **184**, 52–61 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.03.047>
35. Parsegian, V.: Van der waals forces: a handbook for biologists, chemists, engineers, and physicists. *Van Der Waals Forces: A Handbook for Biologists, Chemists, Engineers, and Physicists* pp. 1–380 (2005). <https://doi.org/10.1017/CBO9780511614606>
  36. Moon, P.H., Spencer, D.E.: *Field Theory Handbook: Including Coordinate Systems, Differential Equations, and Their Solutions*. Springer, Berlin (1961)
  37. 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* **12**(6), 1453–1461 (1996). <https://doi.org/10.1021/la950384k>
  38. Ehrl, L., Jia, Z., Wu, H., Lattuada, M., Soos, M., Morbidelli, M.: Role of counterion association in colloidal stability. *Langmuir* **25**(5), 2696–2702 (2009). <https://doi.org/10.1021/la803445y>
  39. Lee, J.Y., Han, I.: A semi-empirical equation for activity coefficients of ions with one parameter. *Bull. Korean Chem. Soc.* **34**(12), 3709–3714 (2013). <https://doi.org/10.5012/bkcs.2013.34.12.3709>
  40. Pabst, T.M., Antos, D., Carta, G., Ramasubramanian, N., Hunter, A.K.: Protein separations with induced pH gradients using cation-exchange chromatographic columns containing weak acid groups. *J. Chromatogr. A* **1181**(1), 83–94 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.054>
  41. Bonincontro, A., De Francesco, A., Onori, G.: Influence of pH on lysozyme conformation revealed by dielectric spectroscopy. *Colloids Surf. B* **12**(1), 1–5 (1998). [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(98\)00048-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(98)00048-4)
  42. Hagemann, A., Giussi, J.M., Longo, G.S.: Use of pH gradients in responsive polymer hydrogels for the separation and localization of proteins from binary mixtures. *Macromolecules* **51**(20), 8205–8216 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b01876>
  43. Ide, M., El-Roz, M., De Canck, E., Vicente, A., Planckaert, T., Bogaerts, T., Van Driessche, I., Lynen, F., Van Speybroeck, V., Thybaut-Starzyk, F., Van Der Voort, P.: Quantification of silanol sites for the most common mesoporous ordered silicas and organosilicas: total versus accessible silanols. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 642–650 (2013). <https://doi.org/10.1039/C2CP42811C>
  44. Onizhuk, M., Panteleimonov, A., Kholin, Y., Ivanov, V.: Dissociation constants of silanol groups of silic acids: Quantum chemical estimations. *J. Struct. Chem.* **59**, 261–271 (2018). <https://doi.org/10.1134/S0022476618020026>
  45. Leite, F.L., Bueno, C.C., Da Róz, A.L., Ziemath, E.C., Oliveira, O.N.: Theoretical models for surface forces and adhesion and their measurement using atomic force microscopy. *Int. J. Mol. Sci.* **13**(10), 12773–12856 (2012). <https://doi.org/10.3390/ijms131012773>
  46. Leung, K., Nielsen, I.M.B., Criscenti, L.J.: Elucidating the bimodal acid–base behavior of the water–silica interface from first principles. *J. Am. Chem. Soc.* **131**(51), 18358–18365 (2009). <https://doi.org/10.1021/ja906190t>
  47. Kravchenko, A., Demianenko, E., Tsendra, O., Lobanov, V., Grebenyuk, A., Terets, M.: Simulation of the interaction between silica surface and acid or alkaline aqueous media. *Collection* **7**(22), 36–41 (2015). ((In Ukrainian))
  48. Yang, J., Su, H., Lian, C., Shang, Y., Liu, H., Wu, J.: Understanding surface charge regulation in silica nanopores. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 15373–15380 (2020). <https://doi.org/10.1039/D0CP02152K>
  49. Salis, A., Bhattacharyya, M.S., Monduzzi, M.: Specific ion effects on adsorption of lysozyme on functionalized sba-15 mesoporous silica. *J. Phys. Chem. B* **114**(23), 7996–8001 (2010). <https://doi.org/10.1021/jp102427h>
  50. Franco, L.F.M., Pessôa Filho, P.D.A.: On the solubility of proteins as a function of pH: Mathematical development and application. *Fluid Phase Equilibria* **306**(2), 242–250 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2011.04.015>
  51. Bhattacharyya, M.S., Hiwale, P., Piras, M., Medda, L., Steri, D., Piludu, M., Salis, A., Monduzzi, M.: Lysozyme adsorption and release from ordered mesoporous materials. *J. Phys. Chem. C* **114**(47), 19928–19934 (2010). <https://doi.org/10.1021/jp1078218>
  52. Li, H., Robertson, A.D., Jensen, J.H.: Very fast empirical prediction and rationalization of protein pka values. *Proteins* **61**(4), 704–721 (2005). <https://doi.org/10.1002/prot.20660>
  53. Bas, D.C., Rogers, D.M., Jensen, J.H.: Very fast prediction and rationalization of pka values for protein-ligand complexes. *Proteins* **73**(3), 765–783 (2008). <https://doi.org/10.1002/prot.22102>
  54. Webb, H., Tynan-Connolly, B.M., Lee, G.M., Farrell, D., O’Meara, F., Søndergaard, C.R., Teilum, K., Hewage, C., McIntosh, L.P., Nielsen, J.E.: Remeasuring Hewl pka values by NMR spectroscopy: Methods, analysis, accuracy, and implications for theoretical pka calculations. *Proteins* **79**(3), 685–702 (2011). <https://doi.org/10.1002/prot.22886>
  55. Bonincontro, A., De Francesco, A., Onori, G.: Temperature-induced conformational changes of native lysozyme in aqueous solution studied by dielectric spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **301**(1), 189–192 (1999). [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(98\)01460-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(98)01460-2)
  56. Kubiak, K., Mulheran, P.A.: Molecular dynamics simulations of hen egg white lysozyme adsorption at a charged solid surface. *J. Phys. Chem. B* **113**(36), 12189–12200 (2009). <https://doi.org/10.1021/jp901521x>
  57. Salvalaglio, M., Paloni, M., Guelat, B., Morbidelli, M., Cavallotti, C.: A two level hierarchical model of protein retention in ion exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* **1411**, 50–62 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.101>
  58. Zhang, J., Han, Y.T., Bu, X.L., Yue, X.F.: Study on the adsorption property of lysozyme on weak cation exchanger based on monodisperse poly(glycidymethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) beads. *J. Chromatogr. Sci.* **51**(2), 122–127 (2012). <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms115>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

# Apêndice E

## Artigo 03

SANTANA, V. V., GAMA, M. S., LOUREIRO, J. M., et al. “A First Approach towards Adsorption-Oriented Physics-Informed Neural Networks: Monoclonal Antibody Adsorption Performance on an Ion-Exchange Column as a Case Study”, *ChemEngineering*, v. 6, n. 2, 2022. ISSN: 2305-7084. doi: 10.3390/chemengineering6020021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2305-7084/6/2/21>>.

Article

# A First Approach towards Adsorption-Oriented Physics-Informed Neural Networks: Monoclonal Antibody Adsorption Performance on an Ion-Exchange Column as a Case Study

Vinicius V. Santana<sup>1,2</sup>, Marlon S. Gama<sup>3</sup>, Jose M. Loureiro<sup>1,2</sup> , Alírio E. Rodrigues<sup>1,2</sup> , Ana M. Ribeiro<sup>1,2</sup> , Frederico W. Tavares<sup>3,4</sup> , Amaro G. Barreto, Jr.<sup>4</sup>  and Idelfonso B. R. Nogueira<sup>1,2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Laboratory of Separation and Reaction Engineering, Associate Laboratory LSRE/LCM Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Porto Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal; up201700649@edu.fe.up.pt (V.V.S.); loureiro@fe.up.pt (J.M.L.); arodrig@fe.up.pt (A.E.R.); apeixoto@fe.up.pt (A.M.R.)

<sup>2</sup> ALiCE—Associate Laboratory in Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal

<sup>3</sup> Chemical Engineering Program—PEQ/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21949-900, Brazil; marlongama@ufrj.br (M.S.G.); tavares@eq.ufrj.br (F.W.T.)

<sup>4</sup> Chemical and Biochemical Engineering Processes (EPQB), School of Chemistry—EQ/UFRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21949-900, Brazil; amaro@eq.ufrj.br

\* Correspondence: idelfonso@fe.up.pt



**Citation:** Santana, V.V.; Gama, M.S.; Loureiro, J.M.; Rodrigues, A.E.;

Ribeiro, A.M.; Tavares, F.W.; Barreto, A.G., Jr.; Nogueira, I.B.R. A First Approach towards Adsorption-Oriented Physics-Informed Neural Networks: Monoclonal Antibody Adsorption Performance on an Ion-Exchange Column as a Case Study.

*ChemEngineering* **2022**, *6*, 21.  
<https://doi.org/10.3390/chemengineering6020021>

Academic Editor: Andrew S. Paluch

Received: 24 December 2021

Accepted: 23 February 2022

Published: 1 March 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Adsorption systems are characterized by challenging behavior to simulate any numerical method. A novel field of study emerged within the numerical method in the last two years: the physics-informed neural network (PINNs), the application of artificial intelligence to solve partial differential equations. This is a complete new standpoint for solving engineering first-principle models, which up to that date was not explored in the field of adsorption systems. Therefore, this work proposed the evaluation of PINN to address the numerical solutions of a fixed-bed column where a monoclonal antibody is purified. The PINNs solution is compared with a traditional numerical method. The results show the accuracy of the proposed PINNs when compared with the numerical method. This points towards the potential of this technique to address complex numerical problems found in chemical engineering.

**Keywords:** physics-informed neural networks; deep learning; phenomenological modeling; pressure swing adsorption

## 1. Introduction

Solving partial differential equation (PDE) systems is crucial in several fields. The PDEs are essential within engineering, ranging from civil engineering to chemical engineering. They are responsible for the mathematical representation of the observed reality through time and space. The more complex the relationship of the observed phenomena throughout these two dimensions, the more complicated the PDE systems are, and consequently, the more difficult it is to obtain their solution.

There are several numerical methods to address these problems. Following the nature of the PDEs, one can choose a myriad of options to obtain a numerical solution, ranging from the orthogonal collocation into finite elements to finite elements coped with Runge-Kutta. The numerical method is a consolidated field providing essential tools for engineers for several years. Recently, in 2019, this field started to be revolutionized by the advent of physics-informed neural networks (PINN) [1,2].

Using Artificial Neural Networks (ANN) to solve PDE systems is not new. It was first presented by [3]. The main idea is to leverage the universal approximation capacity of ANNs to solve PDEs. However, the method remained underused for many years due to the technology limitation. This strategy could be employed in practice only after the advent of deep learning and advanced computing techniques. [1] presented the first practical application of this concept.

The PINN can address complex numerical problems, usually a limitation of the classic numerical methods. For example, stochastic and high-order PDEs [1,4]. However, PINNs are based on the usage of the system conservation equations as constraints of a custom-designed loss function. Therefore, the design of the loss function plays a pivotal role in this technique. Following the peculiarities of the PDE system, supervised learning needs to be adequately designed. Thus, the PINNs methods should be carefully evaluated considering the application domain. As an emerging field of study, it still has limitations. PINN prediction is limited to the initial conditions assessed in the PDE/ODE solution.

Moreover, the PINN is initially obtained through a learning problem, which is computationally heavy. On the other hand, it is a very recent field of study with several potentials. For instance, once the system of PDEs is solved by PINNs, the resulting DNN can be used as a model. The trained PINN model can predict the system states in a fraction of milliseconds, which is an enormous advance in the field of rigorous simulation. Hence, it requires to be explored in the domain of application to evaluate its full potential. Therefore, this is one of the main motivations of this work, adapt this technique to the domain of chemical process, assessing its potentialities and limitations.

Chemical engineering problems are modeled with conservation and constitutive laws that yield complex PDE systems. The peculiarities of the phenomenological models that describe chemical processes usually take the classical numerical methods to their limits. Different length and time scales are present for several examples, challenging the PDE systems' solution. For instance, a system not limited by diffusion might present abrupt changes in its behavior, leading to problems solving the phenomenological model that describes this system. This is usual in processes that leverage adsorption to promote separation and/or reaction.

This work provides the first efforts in adsorption systems to apply PINN techniques to solve the numerical problem resulting from these systems' constitutive and conservative laws. We study the peculiarities of these systems from the point of view of physics-informed neural networks. Thus, we provide initial guidelines to address adsorption-based models using PINNs.

As a case study, an adsorption analysis of a therapeutic monoclonal antibody (mAb) is presented. It is known that chemical components and thermal stress lead to the formation of protein aggregates during mAbs production. A high-purity concentration has to be achieved if the aim is the use for a medicinal treatment [5]. Ion-chromatography columns are applied for the purification step to separate the mAbs from their impurities, and protein variants, due to the difference of electrostatic affinity between them and the ion-exchange stationary phase [6]. For simulating these systems, the electrostatic information must accurately describe the adsorption/desorption. Furthermore, simulating the adsorption behavior of mAbs in a column is a PDE problem, in which it is needed to solve a set of equations that contains the phenomenological representation of a fixed bed system. As an adsorption problem, it presents the abovementioned challenges to its numerical solution.

Thus, this work evaluates the application of PINNs to address the solution of a phenomenological model of a chromatographic column to purify a mAb protein using binding and elution strategy, as applied by [7]. It is important to note that adsorption and desorption usually yield different behaviors, which is a source of problems for the numerical solution of these systems. Therefore, it is a good case study to evaluate the proposed PINNs structure. This work paves the way to handle more complex problems in chemical engineering, namely, reactor modeling, gas-phase separation processes (pressure/temperature swing adsorption), and continuous chromatography (simulated moving bed).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Mathematical Model for Protein Adsorption in Column Chromatography

Column chromatographic process is usually modeled as a fixed bed by writing differential mass conservation laws in mobile and stationary phases. By solving these equations, one can predict the adsorbate concentration at any time and position. Considering that transport occurs predominantly in the axial direction ( $x$ ), constant axial dispersion coefficient ( $D_{ax}$ ), and the dimensionless mass balance in the mobile phase (bulk and boundaries) can be written as:

$$\frac{\partial C^*}{\partial t^*} + \frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \frac{C_0}{q_0} \frac{\partial y}{\partial t^*} + \frac{\partial C^*}{\partial x^*} = \frac{1}{Pe} \frac{\partial^2 C^*}{\partial x^{*2}}; x^* \in (0, 1), t^* > 0 \quad (1)$$

$$\frac{\partial C^*}{\partial x^*} = Pe(C^* - C_{in}^*); x^* = 0, t^* \geq 0 \quad (2)$$

$$\frac{\partial C^*}{\partial x^*} = 0; x^* = 1, t^* \geq 0 \quad (3)$$

$$C^* = 0 \text{ (adsorption)}; x^* \in (0, 1), t^* = 0 \quad (4)$$

$$y = \frac{K' C^*}{(1 + (K' - 1) C^*)}; K' - 1 = K C_0; \quad (5)$$

$$q_0 = \frac{q_{max} K C_0}{1 + K C_0}$$

$$C^* = \frac{C}{C_0}, x^* = \frac{x}{L}; t^* = t \frac{u}{L}; Pe = \frac{uL}{D_{ax}} \quad (6)$$

where  $x^*$  is the dimensionless axial position,  $t^*$  is the dimensionless time,  $C^*$  is the dimensionless concentration,  $y$  is the stationary phase dimensionless concentration in equilibrium with  $C^*$  (mobile phase specie concentration),  $Pe$  is the axial Peclet number,  $\varepsilon_b$  is the bed porosity,  $u$  is the interstitial velocity,  $L$  is the column length,  $C_0$  is a reference mobile phase concentration (inlet or feed),  $q_0$  is a reference stationary phase concentration,  $C_{in}^*$  is the dimensionless concentration at the column inlet,  $C_0^*$  is the dimensionless concentration at initial condition,  $q_{max}$  the maximum adsorption capacity of the stationary phase,  $K'$  is the constant separation factor and  $K$  is the dimensionless adsorbate-adsorbent interaction parameter given by:

$$K = \frac{A_s}{1 - \varepsilon_b} \int_0^\infty \left[ \exp\left(-\frac{W(L, pH, h)}{k_b T}\right) - 1 \right] dh, \quad (7)$$

where  $W$  is the binding free energy,  $A_s$  is the accessible surface area per unit of packed bed volume ( $4.2 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$ ) [8],  $I$  is the ionic strength,  $h$  is the distance between the mAb and the stationary phase surfaces,  $k_b$  is the Boltzmann constant and  $T$  is the temperature.

The adsorption equilibrium constant is a thermodynamic property, a function of  $W$  (potential of mean force, i.e., PMF), related to the adsorption binding affinity. It is noteworthy that electrostatic interaction is the leading property designating biomolecule surface interactions.

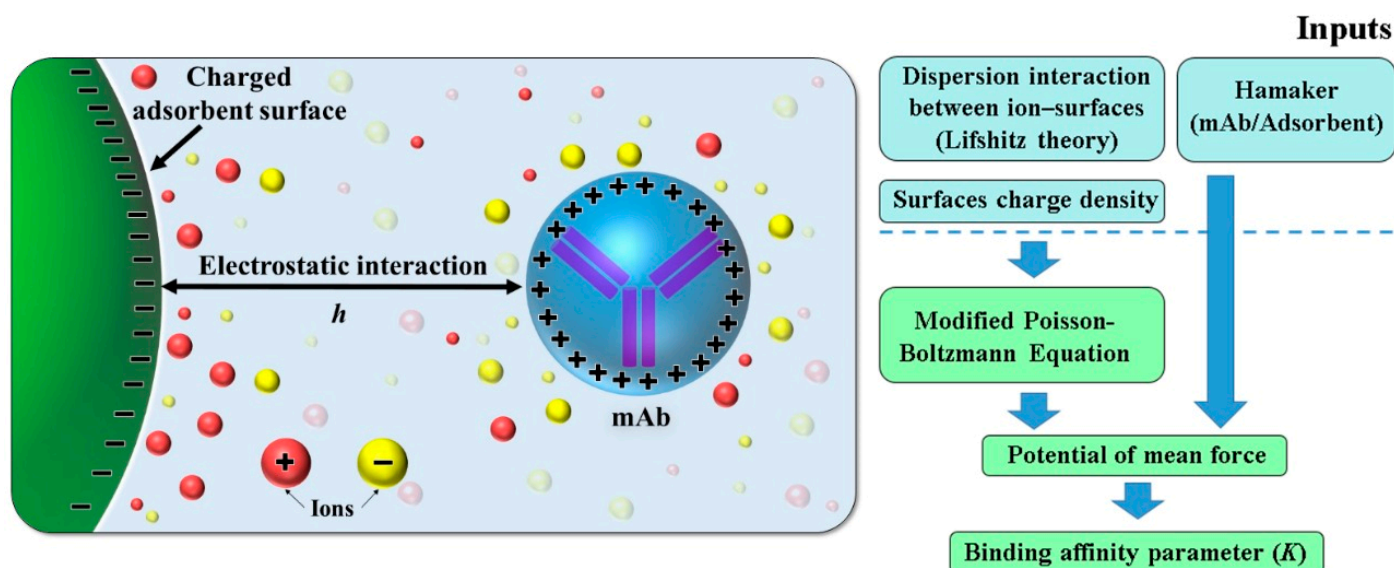
The literature [9,10] reports how to calculate the PMF from the electrostatic potential obtained by solving a modified Poisson-Boltzmann (PB) equation in a different set of coordinates. The modification in the PB equation allows the PMF to be a function of the solution conditions, i.e., temperature, ionic strength, salt type, and pH.

It is beyond the purpose of this work to show how to solve the modified PB equation. Thus, we applied the exact calculation details reported in the literature [9,10]. In this way, the Langmuir isotherm (Equation (5)) is linked with a thermodynamic parameter (Equation (7)), becoming a function of the mAb and stationary phase's surface properties and the solution conditions.



## 2.2. Simulation Scenario

A simulation of an adsorption-based separation is considered here to assess the PINN performance. Hence, the adsorption of a mAb with known charge density taken from [11] over YMC BioPro SP (10  $\mu\text{m}$ ) where the solid phase is initially protein-free is evaluated. The liquid phase is at a constant pH of 5.9, ionic strength 100 mM, and a feed stream at a concentration of 15 g/L is fed at the column inlet. Figure 1 describes the antibody protein ion-exchange adsorption schematically. The figure presents the ions and the protein/adsorbent surfaces charged, depicting the system mechanisms.



**Figure 1.** Schematical representation of the antibody adsorption by ion-exchange.

Under these conditions, the adsorption equilibrium constant ( $K$ , from Equation (5)) was estimated as 4.004 by solving the modified PB equation, as previously mentioned [9].

The chosen value for  $K$  aims to represent an intermediary condition in protein adsorption—in a typical protein separation scenario (where high efficiency is required)  $K$  should be much higher during adsorption and much lower during desorption. However, the scope of this work is comparing traditional numerical methods with a new approach (PINNs), and the chosen value for  $K$  fits this purpose well. Moreover, the maximum adsorption capacity ( $q_{max}$ ) is set as 125 g/L for the referred protein-adsorbent pair.

We used the following hydrodynamic parameters reported in the literature [8] as a reference for mAb performance in ion-exchange columns, namely: the bed porosity ( $\epsilon_b$ ), column length, column diameter, injection volume, and axial Peclet number ( $Pe$ ) were set to be 0.53, 8.5 cm, 0.5 cm, 1.2  $\text{cm}^3$ , and 500, respectively.

The solution of the fixed bed model via the Method of Lines (MoL) was implemented in a gPROMs Model Builder advanced process simulator with 60 finite elements and 3 collocation points per element. The resulting differential-algebraic system of equations was solved with the default DASOLV solver and automatic index reduction algorithm available in gPROMs. The physics-informed neural network was built and trained in the DeepXDE [12] version 0.14.0.

## 2.3. Physics Informed Neural Networks

Given a generic space, a time-dependent nonlinear partial differential equation in the form:

$$u_t + \mathcal{N}(u) = 0; x \in \Omega; t \in [0, T], \quad (8)$$

and boundary conditions with nonlinear differential operator  $B[\cdot]$ :

$$B(u, x, t) = 0 \text{ on } \partial\Omega \quad (9)$$

where  $u(t, x)$  denotes the latent solution of the PDE,  $u_t$  is the time derivative of  $u$  and  $\mathcal{N}[\cdot]$  is the nonlinear differential operator, one can approximate the unknown PDE solution  $u(x, t)$  by a deep neural network  $\hat{u}(x, t, \theta)$  with trainable parameters  $\theta$  and derive the called physics-informed neural networks [1,13]  $f(\hat{u}, x, t)$  and  $g(\hat{u}, x, t)$  as:

$$f(\hat{u}, x, t) = \hat{u}(x, t, \theta)_t + \mathcal{N}(\hat{u}(x, t, \theta)) \quad (10)$$

$$g(\hat{u}, x, t) = \mathcal{B}(\hat{u}, x, t) \quad (11)$$

Then, one can train the neural network  $\hat{u}(x, t)$  to satisfy the  $f(\hat{u}, x, t)$ ,  $\mathcal{B}(\hat{u}, x, t)$  and initial condition constraints.

In practice, a set of points inside the space-time domain ( $\mathcal{T}_f$ ), another set in the boundaries ( $\mathcal{T}_b$ ) and at initial condition ( $\mathcal{T}_i$ ), are sampled and used to calculate the overall loss function  $\mathcal{L}(\theta, \mathcal{T})$  as:

$$\mathcal{L}(\theta, \mathcal{T}) = w_f \mathcal{L}_f(\theta; \mathcal{T}_f) + w_b \mathcal{L}_b(\theta, \mathcal{T}_b) + w_i \mathcal{L}_i(\theta, \mathcal{T}_i), \quad (12)$$

where,

$$\mathcal{L}_f(\theta; \mathcal{T}_f) = \frac{1}{|\mathcal{T}_f|} \sum_{x,t \in \mathcal{T}_f} |f(\hat{u}, x, t)|^2 \quad (13)$$

$$\mathcal{L}_b(\theta, \mathcal{T}_b) = \frac{1}{|\mathcal{T}_b|} \sum_{x,t \in \mathcal{T}_b} |g(\hat{u}, x, t)|^2 \quad (14)$$

$$\mathcal{L}_i(\theta, \mathcal{T}_i) = \frac{1}{|\mathcal{T}_i|} \sum_{x,t \in \mathcal{T}_i} |\hat{u} - u(x, 0)|^2 \quad (15)$$

Figure 2 depicts the physics-informed neural network (PINN) building process to find the solution of differential equations.

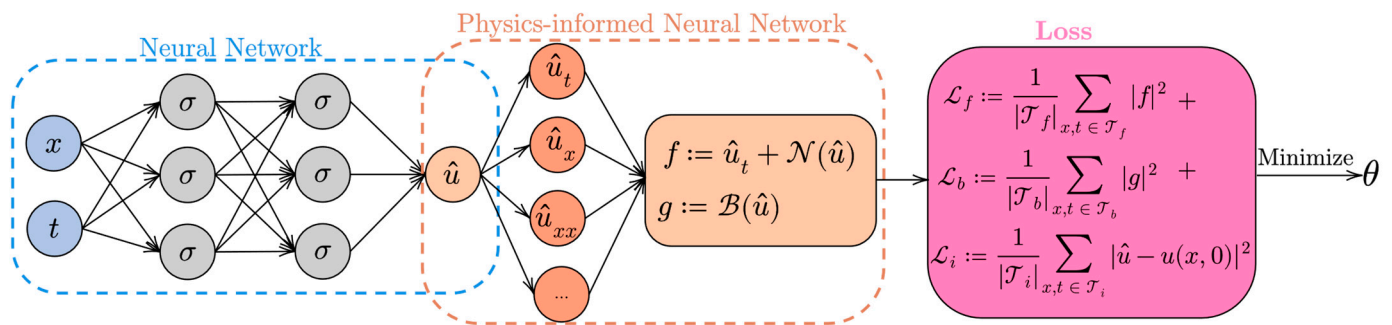


Figure 2. Physics-informed neural network building process.

Hence, considering the problem of protein adsorption in a fixed bed column, we propose the loss functions:

$$\mathcal{L}_f = \frac{1}{|\mathcal{T}_f|} \sum_{x,t \in \mathcal{T}_f} \left| \frac{\partial \hat{u}}{\partial t^*} + \frac{1-\varepsilon}{C_0 \varepsilon} \frac{\partial}{\partial t^*} \left( \frac{K \hat{u} C_0}{1 + \frac{K \hat{u} C_0}{q_{max}}} \right) + \frac{\partial \hat{u}}{\partial x^*} - \frac{1}{Pe} \frac{\partial^2 \hat{u}}{\partial x^{*2}} \right|^2 \quad (16)$$

$$\mathcal{L}_{bcl} = \frac{1}{|\mathcal{T}_b|} \sum_{x,t \in \mathcal{T}_b} \left| \frac{\partial \hat{u}(0,t)}{\partial x^*} - Pe(\hat{u}(0,t) - C_{in}^*) \right|^2 \quad (17)$$

$$\mathcal{L}_{bcr} = \frac{1}{|\mathcal{T}_b|} \sum_{x,t \in \mathcal{T}_b} \left| \frac{\partial \hat{u}(1,t)}{\partial x^*} \right|^2 \quad (18)$$

$$\mathcal{L}_i = \frac{1}{|\mathcal{T}_i|} \sum_{x,t \in \mathcal{T}_i} |\hat{u}(x,0) - C_0^*|^2 \quad (19)$$

By minimizing the sum of Equations (17)–(19) with an appropriate optimizer or a combination of optimizers, one can find the neural network  $\hat{u}(x, t, \theta)$  parameters  $\theta$  that minimize the loss, leading to the solution of the PDE.

### 3. Results

This section provides the numerical experiment to assess the PINNs performance. The proposed solution is compared with the current state-of-the-art numerical method (MoL). Usually, these models are solved using MoL with axial position discretized with orthogonal collocation on finite elements.

For the numerical adsorption experiment, the feedforward architecture was employed. The hyperparameters, i.e., layers and neurons, were searched via random grid search. The best architecture, i.e., with minimum training error, had six layers with 80 neurons per layer. Layer-wise, locally adaptive hyperbolic tangent activations proposed in [14] were used in each layer to improve convergence speed. The weights of the loss function were set equal to 1.0 for all terms except for the boundary condition term at axial position  $z = 0$ . For this term, the corresponding weight ( $W_{bcl}$ ) was adaptively changed during training, starting at  $1 \times 10^{-4}$  and then finishing at 1.0 due to the associated high loss at the beginning of the training compared to other terms. An additional term was included in the loss function, namely, the derivative of the PDE residuals with respect to both dimensionless time and position ( $t^*$ ,  $x^*$ ) weighted by  $1 \times 10^{-4}$  as it was previously shown to improve training loss [14].

A total of 2500 collocation points were used for the PDE residual ( $\mathcal{T}_f$ ), 800 for both boundary conditions ( $\mathcal{T}_b$ ), and 500 for initial condition ( $\mathcal{T}_i$ ). The points were sampled using the Latin hypercube sampling strategy [15]. Then, the loss function was minimized by running 25,000 iterations of Adam [16] algorithm at a  $3.0 \times 10^{-4}$  learning rate with early stopping (5000 iterations patience) followed by L-BFGS-B [17] until convergence.

Table 1 summarizes the neural network hyperparameters for the numerical adsorption experiment.

**Table 1.** Parameters to define the neural network for the adsorption experiment.

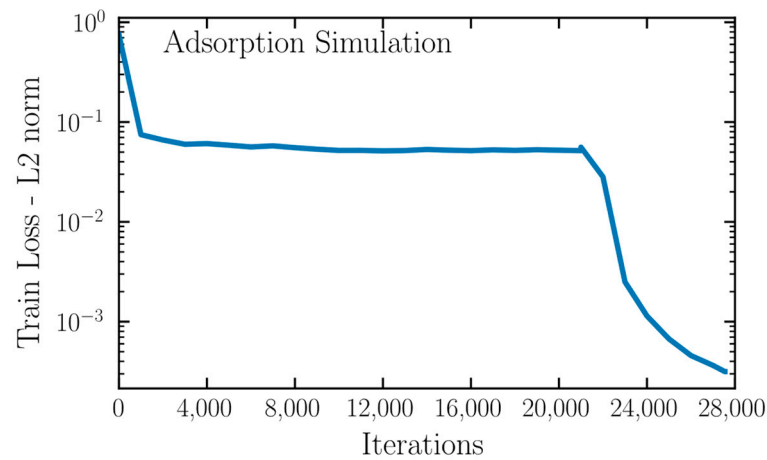
Parameter	Description	Value
$N_l$	Number of layers	6
$N_n$	Number of neurons per layer	80
$w_f, w_{bcl}, w_{bcr}, w_i$	Weights of terms in the loss function	(1.0, 1.0, adaptive, 1.0)
$\mathcal{T}_f, \mathcal{T}_b, \mathcal{T}_i$	Collocation points of PDE, boundary, and initial condition	(2500, 800, 500)
$\alpha$	Learning rate of Adam algorithm	$3.0 \times 10^{-4}$

Figure 3 displays the training history on a semi-log scale. It shows that the loss starts decreasing fast and monotonically and then stagnates at around 0.1. When L-BFGS-B algorithm is used, a pronounced drop in the loss is reached until it reaches the final loss (order of  $10^{-4}$ ).

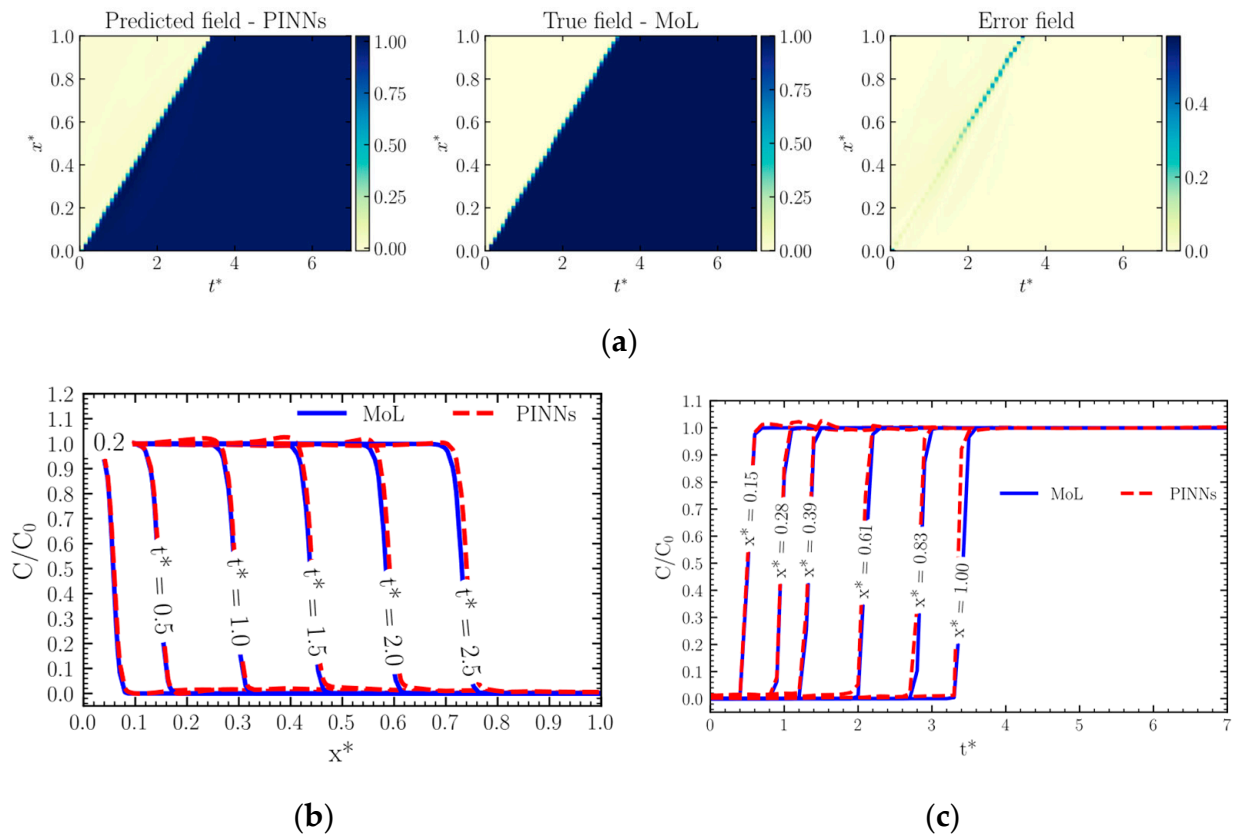
Figure 4 compares the MoL and PINN solutions from three different perspectives. The first (Figure 4a) shows the solutions and error fields as a color map in the dimensionless space-time ( $x^*$ ,  $t^*$ ) domain, i.e., for every tuple ( $x^*$ ,  $t^*$ ), the solution of the PDE can be read by matching the corresponding color at the color bar in the Figures' right-hand side. The rightmost figure shows the absolute difference between the solution field obtained by PINN and by MoL. It can be seen that the PINN could learn PDE solution satisfactorily with the largest errors (mean absolute error) found in the breakthrough region, i.e., the line where the inlet concentration reaches these points. Figure 4b shows the concentration profile at six different dimensionless times. It is possible to see that at higher times and closer to the upper boundary ( $x^* = 1$ ) the error is more pronounced; however, the profiles are satisfactorily learned by the PINN model. Figure 4c shows the history of the concentration



at several axial positions. It shows that the concentration changes suddenly in a short period, characterizing a compressive concentration front propagation.



**Figure 3.** Train loss history for numerical adsorption experiment.



**Figure 4.** MoL and PINNs solution's comparison for adsorption experiment.

The numerical adsorption experiment is challenging to simulate for any numerical method. As known [18], neural networks are universal approximators for  $C^1$  continuous functions, and fields with steep gradients as those seen in adsorption are challenging. Even so, the PINN provides a satisfactory approximation to the PDE solution (mean absolute error calculated from a ground truth of less than 1%).

It is important to highlight that the PINNs are replacing the numerical method to solve the PDE system that composes the mechanistic model of the adsorption separation. Hence, it is preferred to compare its solution with a classical numerical method, the MoL, rather than experimental data. Furthermore, the model used as a reference was already

experimentally validated in the literature. The validation against experimental data can be achieved in future applications of this method in other systems, which would be an important development of this work.

Therefore, we certify that the PINNs can efficiently solve the numerical problem within a continuous domain. This also allows us to compare the computational effort of trained PINNs against the numerical solution by a classical numerical method. For instance, the MoL solved the model in 37 s. While the PINNs, once trained, provide a prediction in a fraction of a second. The comparison was made in an Intel Core i7-7500U CPU @ 2.70 GHz 2.90 GHz. This difference is significant in an optimization context, where hundreds of thousands of model evaluations are performed. In this way, the PINNs might allow the employment of mechanistic-informed models in an online context, such as real-time optimization, process control, and optimization. This can unlock several new possibilities in the field of process systems engineering. However, we are in an early stage of this technique, and further studies need to be carried out.

#### 4. Conclusions

This work presents one of the first attempts to solve numerical problems arising from adsorption models with physics-informed neural networks. This is a very recent field of study and needs further studies to explore its full potential. This work provides the basis in this direction in chemical engineering, more specifically in the area of adsorption-based systems.

One key aspect to consider when comparing PINN with traditional numerical solvers is that the former does not require special treatment for issues arising in methods such as MoL, namely: a careful choice of spatial discretization scheme, index reduction methods, and appropriate time integrators for stiff systems. In a PINN solver, space-time points are sampled straightforwardly, and the problem is solved when the residuals reach an acceptable value (L2 norm in the order  $1 \times 10^{-4}$  for conservation laws is enough for most practical applications). Moreover, the PINN can accept additional independent variables in the input layer apart from spatial and time, such as PDE, geometrical parameters, and initial and boundary conditions. Then, inference-time predictions can be delivered in a fraction of a second at any position and time within the training domain for several system configurations. Once the PINN is known to solve the PDE describing adsorption, it can be safely used for parameter estimation with simultaneous solution of the PDE and assimilation from sensor data and time-demanding tasks with traditional numerical solvers.

Therefore, the results of this work demonstrated that the PINNs are efficient in addressing the numerical solution of fixed-bed protein separation by adsorption. Both monoclonal antibody adsorption were calculated using the first-principles model solved using the physical-informed networks. The next step to explore this technique would be to evaluate more complex processes, such as continuous chromatography. From the current state of the literature and the present results, it is possible to envision the significant impact of the PINNs on the chemical systems phenomenological modeling.

**Author Contributions:** Conceptualization, I.B.R.N. and V.V.S.; formal analysis, V.V.S. and M.S.G.; writing—original draft preparation, V.V.S., I.B.R.N., M.S.G. and A.G.B.J.; review and editing, I.B.R.N., A.G.B.J., A.M.R., J.M.L., A.E.R. and F.W.T.; supervision, I.B.R.N., A.G.B.J., A.M.R., J.M.L., A.E.R. and F.W.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was financially supported by LA/P/0045/2020 (ALiCE), UIDB/50020/2020 and UIDP/50020/2020 (LSRE-LCM), funded by national funds through FCT/MCTES (PIDDAC). and FCT—Fundação para a Ciência e Tecnologia under CEEC Institucional program, and the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq, Brazil) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil). The authors thank the financial support from the Brazilian National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP, Brazil) and PETROBRAS through the Clause of Investments in Research, Development, and Innovation.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Raissi, M.; Perdikaris, P.; Karniadakis, G.E. Physics-informed neural networks: A deep learning framework for solving forward and inverse problems involving nonlinear partial differential equations. *J. Comput. Phys.* **2019**, *378*, 686–707. [[CrossRef](#)]
2. Karniadakis, G.E.; Kevrekidis, I.G.; Lu, L.; Perdikaris, P.; Wang, S.; Yang, L. Physics-informed machine learning. *Nat. Rev. Phys.* **2021**, *3*, 422–440. [[CrossRef](#)]
3. Lagaris, I.E.; Likas, A.; Fotiadis, D.I. Artificial neural networks for solving ordinary and partial differential equations. *IEEE Trans. Neural Netw.* **1998**, *9*, 987–1000. [[CrossRef](#)]
4. Yang, L.; Zhang, D.; Karniadakis, G.E.M. Physics-informed generative adversarial networks for stochastic differential equations. *SIAM J. Sci. Comput.* **2020**, *42*, A292–A317. [[CrossRef](#)]
5. Nicoud, L.; Owczarz, M.; Arosio, P.; Morbidelli, M. A multiscale view of therapeutic protein aggregation: A colloid science perspective. *Biotechnol. J.* **2015**, *10*, 367–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mehta, A.; Tse, M.L.; Fogle, J.; Len, A.; Shrestha, R.; Fontes, N.; Lebreton, B.; Wolk, B.; van Reis, R. Purifying therapeutic monoclonal antibodies. *Chem. Eng. Prog.* **2008**, *104*, S14–S20.
7. Lee, J.; Liu, Z.; Chen, W.H.; Wei, J.; Kundu, R.; Adhikari, R.; Rivera, J.A.; Gillespie, P.M.; Strych, U.; Zhan, B.; et al. Process development and scale-up optimization of the SARS-CoV-2 receptor binding domain-based vaccine candidate, RBD219-N1C1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 4153–4165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Guélat, B.; Ströhlein, G.; Lattuada, M.; Delegrange, L.; Valax, P.; Morbidelli, M. Simulation model for overloaded monoclonal antibody variants separations in ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1253*, 32–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Gama, M.S.; Simões, M.; Rocha, E.; Lima, D.A.; Wanderley, F.; Gomes, A.; Barreto, B. A modified Poisson-Boltzmann equation applied to protein adsorption. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1531*, 74–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Gama, M.S.; Barreto, A.G.; Tavares, F.W. The binding interaction of protein on a charged surface using Poisson-Boltzmann equation: Lysozyme adsorption onto SBA-15. *Adsorption* **2021**, *27*, 1137–1148. [[CrossRef](#)]
11. 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. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 5610–5621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lu, L.; Meng, X.; Mao, Z.; Karniadakis, G.E. DeepXDE: A Deep Learning Library for Solving Differential Equations. *SIAM Rev.* **2021**, *63*, 208–228. [[CrossRef](#)]
13. Raissi, M.; Perdikaris, P.; Karniadakis, G.E. Physics Informed Deep Learning (Part I): Data-driven Discovery of Nonlinear Partial Differential Equations. *arXiv* **2017**, arXiv:1711.10561.
14. Jagtap, A.D.; Kawaguchi, K.; Em Karniadakis, G. Locally adaptive activation functions with slope recovery for deep and physics-informed neural networks. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2020**, *476*, 20200334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. McKay, M.D.; Beckman, R.J.; Conover, W.J. A comparison of three methods for selecting values of input variables in the analysis of output from a computer code. *Technometrics* **1979**, *21*, 239–245. [[CrossRef](#)]
16. Kingma, D.P.; Ba, J.L. Adam: A method for stochastic optimization. In Proceedings of the 3rd International Conference on Learning Representations, San Diego, CA, USA, 7–9 May 2015.
17. Byrd, R.H.; Lu, P.; Nocedal, J.; Zhu, C. A Limited Memory Algorithm for Bound Constrained Optimization. *SIAM J. Sci. Comput.* **1994**, *16*, 1190–1208. [[CrossRef](#)]
18. Hornik, K.; Stinchcombe, M.; White, H. Multilayer feedforward networks are universal approximators. *Neural Netw.* **1989**, *2*, 359–366. [[CrossRef](#)]