



MODELAGEM COMPUTACIONAL DA COLUNA CROMATOGRÁFICA DE
TROCA IÔNICA PARA APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DE
PROTEÍNAS

Joana Borges da Rosa

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: Tito Livio Moitinho Alves

Fernando Luiz Pellegrini Pessoa

Rio de Janeiro
Outubro de 2015

MODELAGEM COMPUTACIONAL DA COLUNA CROMATOGRÁFICA DE
TROCA IÔNICA PARA APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DE
PROTEÍNAS

Joana Borges da Rosa

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

Examinada por:

Prof. Tito Livio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, D.Sc.

Prof. Amaro Gomes Barreto Junior, D.Sc.

Prof^a Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Prof^a Rosana Lopes Lima Fialho, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
OUTUBRO DE 2015

Rosa, Joana Borges da

Modelagem Computacional da Coluna Cromatográfica de Troca Iônica para Aplicação em Processos de Purificação de Proteínas/Joana Borges da Rosa -- Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015.

XXXIV, 277 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Tito Livio Moitinho Alves

Fernando Luiz Pellegrini Pessoa

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2015.

Referências Bibliográficas: p. 182-212.

1. Cromatografia de troca iônica. 2. Proteína. 3. Adsorção.
I. Alves, Tito Livio Moitinho *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Com carinho a toda a minha família,
a minha filha Maria Luisa, todos os outros que estão por vir
e a meu marido.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota". (Madre Teresa de Calcuta)

AGRADECIMENTOS

Nesta ocasião singular não poderia deixar de expressar minha gratidão àqueles que contribuíram para essa importante etapa.

Em primeiro lugar, a Deus, pelo dom da vida e pelo chamado que me faz a participar de Sua comunhão de amor! Sem Ele nada seria possível.

À minha família, sobretudo aos meus pais, meu profundo e sincero agradecimento por todo amor. Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos pela alegria cotidiana, incentivo e tantas horas de serviços de babá.

Aos meus bons amigos, por sempre me lembrarem das perguntas fundamentais e me acompanharem nesse caminho.

A meu marido por todo o amor e companheirismo inestimáveis.

Aos meus queridos orientadores. Ao Prof. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, pela sincera amizade, incentivo e orientação ao longo de toda a pesquisa. Ao Prof. Tito Livio Moitinho Alves pela infinita paciência em meio a tantos problemas que eu apresentava.

Aos professores que direta ou indiretamente colaboraram para o meu crescimento profissional, pessoal e conclusão desta pesquisa de tese. Em especial aos professores Eduardo Mach Queiroz e André Hemerly pela paciência e incentivo para desdobrar-me e prontamente me ajudaram a não deixar os pratinhos caírem. Por toda a convivência simultânea a esta tese.

Ao Prof. Amaro Gomes Barreto Jr. que me forneceu valiosas contribuições no Exame de Qualificação e posteriormente prestou grande auxílio para a implementação dos modelos da coluna cromatográfica.

Aos meus alunos, que me ensinaram que sempre é possível encontrar tempo, ainda que tempo parecesse ser a última coisa que eu pudesse ter; que me mostraram a grandeza de ser professora.

Aos meus colegas de UFRJ e da ANP quem eu aprendi a amar, pelo convívio produtivo e bem humorado.

Ao CNPq e à FAPERJ pelo apoio financeiro em diferentes etapas desta pesquisa.

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

MODELAGEM COMPUTACIONAL DA COLUNA CROMATOGRÁFICA DE
TROCA IÔNICA PARA APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DE
PROTEÍNAS

Joana Borges da Rosa

Outubro/2015

Orientadores: Tito Livio Moitinho Alves

Fernando Luiz Pellegrini Pessoa

Programa: Engenharia Química

Os principais desafios da produção de biomoléculas em escala industrial podem ser divididos em desafios nos processos de *upstream*, que envolvem a obtenção dos produtos; e desafios nos processos de *downstream*, que envolvem a separação e purificação dos biocompostos. A maioria dos métodos de síntese de bioprocessos esbarram na simplicidade dos modelos cromatográficos utilizados para predição da concentração de contaminantes e da proteína desejada na corrente de processos. Usualmente a descrição do equilíbrio de adsorção é realizada por equações empíricas e semi-empíricas que não levam em consideração a influência do sal na adsorção de proteínas. Neste contexto, esta tese apresenta um modelo termodinâmico rigoroso para a descrição do equilíbrio de adsorção de proteínas que incorpora a não idealidade da fase móvel. Foram obtidos dados experimentais de cromatografia de troca iônica por gradiente de eluição das proteínas albumina de soro bovino e lisozima em diferentes resinas, condições de injeção, tamanho do gradiente, tamanho de coluna, concentração e pH do tampão. Os parâmetros do modelo foram determinados utilizando o método inverso a partir da minimização da diferença entre a concentração experimental e simulada de proteína na saída da coluna em três diferentes condições de gradiente. A capacidade preditiva do modelo foi avaliada comparando cenários com outras condições e os parâmetros estimados foram capazes de correlacionar de forma satisfatória os dados experimentais.

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

MODELLING OF PROTEIN GRADIENT ELUTION IN ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

Joana Borges da Rosa

October/2015

Advisors: Tito Livio Moitinho Alves

Fernando Luiz Pellegrini Pessoa

Department: Chemical Engineering

The main challenges of biomolecules production on an industrial scale can be divided into challenges in the upstream processes, which involve the product synthesis, and challenges in downstream processes involving the separation and purification of biomolecules. The simulation of unit operations involved in protein purification, and therefore the prediction of the behavior of proteins in each unit operation, requires the understanding of both the phase behavior of systems and the chemical behavior of fluids in the processes. Usually, authors use empirical or semi-empirical equations for the adsorption equilibrium, which do not take into account the influence of salt in the adsorption of proteins. In this context, this paper presents a robust adsorption equilibrium model that incorporates thermodynamic non ideality of the mobile phase to describe linear gradient elution behavior of hen egg white lysozyme and bovine serum albumin on ion exchange chromatography. Experimental data of gradient elution chromatography of both proteins in three different resins were measured in several different loading conditions, buffer conditions and gradient slopes. Adsorption equilibrium parameters were determined based on the inverse method by minimizing the difference between experimental and calculated elution profiles of three linear gradient experiments. The predictive ability of the model was evaluated comparing scenarios with different protein loads, gradient slopes, and column length, and the estimated parameters were able to fit the range of prediction scenarios.

Sumário

INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CENÁRIO	1
1.2 PRINCIPAIS DESAFIOS DA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE BIOMOLÉCULAS	4
1.3 MOTIVAÇÃO.....	7
1.4 OBJETIVO E APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS	8
PROCESSO DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	11
2.1 ESQUEMA DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	12
2.2 PANORAMA DA SÍNTESE DE PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	17
2.3 CONCLUSÕES PARCIAIS	21
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA PARA A MODELAGEM DA CURVA DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICA	23
3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA MODELAGEM MATEMÁTICA DE SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS E FORMULAÇÃO DO MODELO ADOTADO	23
3.1.1 <i>Balanços de Massa</i>	25
3.1.2 <i>Relação de equilíbrio de adsorção</i>	29
3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA MODELAGEM TERMODINÂMICA DE SISTEMAS CONTENDO BIOMOLÉCULAS.....	38
3.2.1 <i>Conclusões parciais da revisão bibliográfica</i>	46
3.3 CONCLUSÕES PARCIAIS DA MODELAGEM MATEMÁTICA	52
3.4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - DADOS EXPERIMENTAIS	52
3.4.1 <i>Dados experimentais para modelagem da isoterma de adsorção e curva de eluição</i>	52
3.4.2 <i>Dados experimentais para modelagem do equilíbrio de fases</i>	58
3.4.3 <i>Conclusões parciais da revisão bibliográfica de dados experimentais</i>	60
MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1 DEFINIÇÃO DO SISTEMA A SER ESTUDADO	61
4.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	62
4.2.1 <i>Materiais utilizados nos experimentos cromatográficos</i>	62

4.2.2 Metodologia dos experimentos.....	63
4.2.3 Metodologia – curva de calibração	71
4.2.4 Metodologia – porosidade	71
4.3 METODOLOGIA TEÓRICA	72
4.3.1 Simulação do perfil cromatográfico	72
4.3.2 Equilíbrio de adsorção.....	75
4.3.3 Modelagem termodinâmica.....	76
4.3.4 Metodologia para estimação de parâmetros dos modelos termodinâmicos	80
4.3.5 Implementação Computacional.....	82
RESULTADOS EXPERIMENTAIS	84
5.1 CURVAS DE ELUIÇÃO EXPERIMENTAIS	84
5.2 AVALIAÇÃO DOS VOLUMES DE RETENÇÃO EXPERIMENTAIS.....	92
5.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA CURVA DE ELUIÇÃO.....	102
5.4 VERIFICAÇÃO DO ERRO EXPERIMENTAL	111
5.5 CONCLUSÕES PARCIAIS	112
RESULTADOS DA PARTE TEÓRICA.....	113
6.1 MODELAGEM TERMODINÂMICA.....	113
6.1.1 Conclusões parciais da modelagem termodinâmica.....	125
6.2 VALIDAÇÃO DA ROTINA DE SIMULAÇÃO DA COLUNA CROMATOGRÁFICA.....	126
6.3 ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS DA ISOTERMA DE ADSORÇÃO	128
6.3.1 Coluna HiTrap TM Capto TM DEAE - Avaliação da influência da concentração de injeção.....	130
6.3.2 Coluna HiTrap TM Capto TM Q - Avaliação da influência da concentração de injeção.....	138
6.3.3 Coluna HiTrap TM SP FF - Avaliação da influência da concentração de injeção	144
6.3.4 Discussão dos resultados da série "A"	151
6.3.5 Verificação da influência do volume da coluna.....	161
6.3.6 Verificação da influência do tampão	167
6.3.7 Verificação da influência do tamanho do gradiente.....	171

6.3.8 Conclusões parciais da simulação da coluna cromatográfica de troca iônica	177
CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	178
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	182
APENDICE A.....	213
CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	213
APENDICE B.....	216
DETERMINAÇÃO DA POROSIDADE.....	216
APENDICE C.....	220
VALIDAÇÃO DAS ROTINAS COMPUTACIONAIS PARA ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS DE MODELOS TERMODINÂMICOS	220
C.1 SISTEMAS ANALISADOS	221
C.2 DADOS DE ENTRADA.....	221
C.3 RESULTADOS	222
C.4 CONCLUSÕES	226
APENDICE D.....	227
SISTEMAS PARA ESTUDOS DO COMPORTAMENTO TERMODINÂMICO.....	227
APENDICE E.....	235
ESTUDO DE MODIFICAÇÕES DE MODELOS DE ENERGIA LIVRE DE GIBBS EM EXCESSO (G^E) PARA O CÁLCULO DO EQUILÍBRIO DE SISTEMAS CONTENDO PROTEÍNAS.....	235
E.1 INTRODUÇÃO	235
E.2 OBJETIVOS	239
E.3 MODELOS TERMODINÂMICOS.....	240
<i>E.3.1 Modelo de Debye-Hückel modificado por Cardoso (1988).....</i>	<i>240</i>
<i>E.3.2 Modelo UNIQUAC</i>	<i>242</i>
<i>E.3.3 Modelo Flory-Huggins</i>	<i>245</i>
<i>E.3.4 Modelo Flory-Huggins_Volume Livre.....</i>	<i>247</i>
<i>E.3.5 Modelo de Médio Alcance</i>	<i>247</i>
E.4 SISTEMAS ANALISADOS – DADOS DE ENTRADA.....	248
E.5 RESULTADOS	252

<i>E.5.1 Avaliações de modificações no modelo UNIQUAC – termo combinatorial e termo de longo alcance.....</i>	252
<i>E.5.2 Estimação da carga iônica da proteína.....</i>	258
<i>E.5.3 Avaliação da influência de cada parâmetro no termo residual</i>	261
<i>E.5.4 Avaliação da influência de um termo de médio alcance na modelagem</i>	263
<i>E.5.5 Avaliação da influência da dependência de composição nos parâmetros de interação do modelo UNIQUAC.....</i>	266
<i>E.5.6 Avaliação da influência dos parâmetros de forma e volume do modelo UNIQUAC</i>	269
E.6 CONCLUSÕES	271
APENDICE F	273
ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS DE MODELOS TERMODINÂMICOS PARA O EQUILÍBRIO DE SOLUÇÕES PROTEICAS COM SAIS	273

Lista de Figuras

Figura 1.1: Crescimento do mercado de produtos de base tecnológica nos EUA (2008 a 2012).....	2
Figura 1.2: Nove principais categorias de produtos de base biotecnológica em relação às vendas nos EUA em 2012. Os valores do gráfico representam as vendas em bilhões de dólares.....	3
Figura 1.3: Esquema geral dos objetivos da pesquisa de doutorado	9
Figura 2.1: Etapas de recuperação de proteínas	13
Figura 2.2: Etapas de purificação de proteínas	15
Figura 3.1: Representação esquemática dos mecanismos de transferência de massa na coluna cromatográfica.	26
Figura 3.2: Representação esquemática da dependência da carga da proteína efetiva com a força iônica do meio. (a) Impedimento de íons de sal em baixas concentrações salinas. (b) Impedimento de ligação da proteína causada por uma redução no raio efetivo da molécula em maiores concentrações salinas.....	34
Figura 5.1 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap TM Cpto TM DEAE (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,015mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV	85
Figura 5.2 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap TM Cpto TM Q (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,015mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV	85
Figura 5.3 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap TM SP FF (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.....	86
Figura 5.4 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap TM Cpto TM DEAE (1 mL), proteína lisozima, concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV	87

Figura 5.5 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap TM Capto TM Q (1 mL), proteína lisozima, concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV	87
Figura 5.6 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap TM SP FF (1 mL), proteína lisozima, concentração inicial de proteína 0,015mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV	88
Figura 5.7 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap TM Capto TM DEAE (1 mL), proteínas BSA e lisozima, concentração inicial de ambas proteínas 0,301 mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV	88
Figura 5.8 – Perfil cromatográfico – Coluna HiScreen TM Capto TM DEAE (4,7 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV	89
Figura 5.9 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap TM Capto TM DEAE (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,075 mM, tampão fosfato 0,2M, pH 7,0, gradiente de 10 CV	90
Figura 5.10 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap TM Capto TM Q (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,075 mM, tampão fosfato 0,2M, pH 7,0, gradiente de 10 CV	90
Figura 5.11 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap TM SP FF (1 mL), proteína lisozima, concentração inicial de proteína 0,075 mM, tampão fosfato 0,2M, pH 7,0, gradiente de 10 CV	91
Figura 5.12 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap TM Capto TM DEAE (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,075 mM, tampão fosfato 0,02M, pH 8,0, gradiente de 10 CV	91
Figura 5.13 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap TM Capto TM DEAE (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,075 mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 5 CV	92
Figura 5.14 – Resultados de <i>VRmax</i> dos experimentos A1 - A20.	96
Figura 5.15 – Resultados de <i>VRmax</i> dos experimentos A24 - A40.	97
Figura 5.16 – Resultados de <i>VRmax</i> de acordo com o tamanho da coluna.....	98

Figura 5.17 – Resultados de <i>VRmax</i> de acordo com a concentração e pH do tampão fosfato.	100
Figura 5.18 – Resultados de volume de retenção dos experimentos de acordo com o tamanho do gradiente.....	100
Figura 5.19 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes concentrações iniciais de proteína – Coluna HiTrap TM Capto TM DEAE (1 mL), proteína BSA, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente 10 CV	103
Figura 5.20 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes concentrações iniciais de proteína – Coluna HiTrap TM Capto TM Q (1 mL), proteína BSA, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente 10 CV	103
Figura 5.21 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes concentrações iniciais de proteína – Coluna HiTrap TM SP FF (1 mL), proteína lisozima, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente 10 CV	104
Figura 5.22 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes concentrações iniciais da mistura de proteínas – Coluna HiTrap TM Capto TM DEAE (1 mL) tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente 10 CV	104
Figura 5.23 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes concentrações iniciais da mistura de proteínas – Coluna HiTrap TM Capto TM Q (1 mL) tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente 10 CV	105
Figura 5.24 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes concentrações iniciais da mistura de proteínas – Coluna HiTrap TM SP FF (1 mL) tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente 10 CV.....	105
Figura 5.25 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes condições do tampão – Coluna HiTrap TM Capto TM DEAE (1 mL), proteína BSA, gradiente 10 CV	106
Figura 5.26 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes condições do tampão – Coluna HiTrap TM Capto TM Q (1 mL), proteína BSA, gradiente 10 CV	107
Figura 5.27 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes condições do tampão – Coluna HiTrap TM SP FF (1 mL), proteína lisozima, gradiente 10 CV	107

Figura 5.28 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes gradientes – Coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), proteína BSA (0,075mM), tampão fosfato 0,02M, pH 7	108
Figura 5.29 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes gradientes – Coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), proteína BSA (0,301mM), tampão fosfato 0,02M, pH 7	108
Figura 5.30 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes gradientes – Coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), proteína BSA (0,075mM), tampão fosfato 0,02M, pH 7	109
Figura 5.31 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes gradientes – Coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), proteína BSA (0,301mM), tampão fosfato 0,02M, pH 7	109
Figura 5.32 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes gradientes – Coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), proteína lisozima (0,075mM), tampão fosfato 0,02M, pH 7 110	
Figura 5.33 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes gradientes – Coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), proteína lisozima (0,301mM), tampão fosfato 0,02M, pH 7 110	
Figura 6.1 – Sistema E.C.1 - Coeficiente de atividade da BSA em solução aquosa de NaCl em pH 7,4. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.	115
Figura 6.2 – Sistema E.C.2 - Coeficiente de atividade da BSA em solução aquosa de NaCl em pH 4,5. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.	116
Figura 6.3 – Sistema E.C.3 - Coeficiente de atividade da BSA em solução aquosa de NaCl em pH 5,4. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.	116
Figura 6.4 – E.C.4 - Coeficiente de atividade molar da BSA em solução aquosa de (NH ₄) ₂ SO ₄ em pH 4,5. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.	117
Figura 6.5 – E.C.5 - Coeficiente de atividade molar da BSA em solução aquosa de (NH ₄) ₂ SO ₄ em pH 4,8. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.	118

Figura 6.6 – E.C.6 - Coeficiente de atividade molar da BSA em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 5,4. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.	118
Figura 6.7 – E.C.7 - Coeficiente de atividade molar da BSA em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 7,4. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.	119
Figura 6.8 – E.C.8 -Coeficiente de atividade molar de Lisozima em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 4,0. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.	119
Figura 6.9 – E.C.9 - Coeficiente de atividade molar de Lisozima em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 7,0. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.	120
Figura 6.10 – E.C.10 - Coeficiente de atividade molar de Lisozima em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 8,0. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.	120
Figura 6.11 – Resultados obtidos de simulação da coluna cromatográfica com o aumento do número de elementos finitos	126
Figura 6.12 – Diferença entre as malhas de convergência (resultados da função objetivo).....	127
Figura 6.13 – Experimento A1 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrap TM Capto TM DEAE (1 mL), concentração inicial de proteína 0,015mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.....	131
Figura 6.14 – Experimento A2 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrap TM Capto TM DEAE (1 mL), concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.....	132
Figura 6.15 – Experimento A3 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrap TM Capto TM DEAE (1 mL), concentração inicial de proteína 0,150mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.....	132

- Figura 6.16** – Experimento A4 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 133
- Figura 6.17** – Experimento A13 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 133
- Figura 6.18** – Experimento A14 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 134
- Figura 6.19** – Experimento A24 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301mM + lisozima 0,301 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 134
- Figura 6.20** – Experimento A25 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,150 mM + lisozima 0,301 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 135
- Figura 6.21** – Experimento A26 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301 mM + lisozima 0,150 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 135
- Figura 6.22** – Experimento A27 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,015 mM + lisozima 0,075 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 136
- Figura 6.23** – Experimento A28 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,075 mM + lisozima 0,015 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 136

- Figura 6.24** – Experimento A5 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha sólida) para BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), concentração inicial de proteína 0,015mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 138
- Figura 6.25** – Experimento A6 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha sólida) para BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 139
- Figura 6.26** – Experimento A7 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), concentração inicial de proteína 0,150mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 139
- Figura 6.27** – Experimento A8 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 140
- Figura 6.28** – Experimento A15 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 140
- Figura 6.29** – Experimento A16 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 141
- Figura 6.30** – Experimento A30 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301mM + lisozima 0,301 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 141
- Figura 6.31** – Experimento A31 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,150 mM + lisozima 0,301 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 142

- Figura 6.32** – Experimento A32 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301 mM + lisozima 0,150 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 142
- Figura 6.33** – Experimento A33 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,015 mM + lisozima 0,075 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 143
- Figura 6.34**– Experimento A34 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,075 mM + lisozima 0,015 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 143
- Figura 6.35** – Experimento A17 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha sólida) para lisozima em coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), concentração inicial de proteína 0,015mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 145
- Figura 6.36** – Experimento A18 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha sólida) para lisozima em coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 146
- Figura 6.37** – Experimento A19 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), concentração inicial de proteína 0,150mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 146
- Figura 6.38** – Experimento A20 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 147
- Figura 6.39** – Experimento A9 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 147

- Figura 6.40** – Experimento A10 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 148
- Figura 6.41** – Experimento A36 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301mM + lisozima 0,301 mM) em coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 148
- Figura 6.42** – Experimento A37 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,150 mM + lisozima 0,301 mM) em coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 149
- Figura 6.43** – Experimento A38 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301 mM + lisozima 0,150 mM) em coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 149
- Figura 6.44** – Experimento A39 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,015 mM + lisozima 0,075 mM) em coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 150
- Figura 6.45** – Experimento A40 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,075 mM + lisozima 0,015 mM) em coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 150
- Figura 6.46** – Comportamento das curvas de eluição de lisozima em coluna HiTrapTM SP FF (1 mL) em diferentes condições de injeção, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV. (A) Dados experimentais. (B) Resultados da simulação..... 153
- Figura 6.47** – Comportamento das curvas de eluição de BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL) em diferentes condições de injeção, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV. (A) Dados experimentais. (B) Resultados da simulação..... 153

- Figura 6.48** – Comportamento das curvas de eluição de BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL) em diferentes condições de injeção, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV. (A) Dados experimentais. (B) Resultados da simulação..... 154
- Figura 6.49** – Influência do tipo de isoterma sobre o cromatograma..... 156
- Figura 6.50** – (A) Isotermas de adsorção de lisozima em resina SP FF, pH 6,5 (B) Isotermas de adsorção de lisozima em resina SP FF, pH 7 157
- Figura 6.51** – Influência da concentração de NaCl na isoterma de adsorção de BSA em resinas aniônicas. (A) Adsorção de BSA em resina QA52 (B) Adsorção de BSA em resina Diaion..... 158
- Figura 6.52** – Isoterma de adsorção para lisozima em resina CaptoTM DEAE, em pH 7 para diferentes concentrações de NaCl, utilizando os parâmetros da Tabela 6.11..... 158
- Figura 6.53** – Comportamento das curvas de eluição de BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE em diferentes condições de injeção. (A) Isoterma de adsorção considerando todos os coeficientes de atividade iguais a um (B) Isoterma de adsorção contemplando cálculo do coeficiente de atividade da BSA e do sal (C) Isoterma de adsorção linear (D) Curva experimental..... 160
- Figura 6.54** – (A) Comportamento das curvas de eluição de álcool benzílico em diferentes condições de injeção (B) Comportamento das curvas de eluição de cisandrosterona em diferentes condições de injeção..... 161
- Figura 6.55** – Experimento B2 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiScreenTM CaptoTM DEAE (4,7 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 163
- Figura 6.56** – Experimento B4 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiScreenTM CaptoTM Q (4,7 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 163
- Figura 6.57** – Experimento B6 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiScreenTM SP FF (4,7 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 164

- Figura 6.58** – Experimento B8 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiScreen™ Capto™ DEAE (4,7 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 164
- Figura 6.59** – Experimento B10 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiScreen™ Capto™ Q (4,7 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 165
- Figura 6.60** – Experimento B12 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiScreen™ SP FF (4,7 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 165
- Figura 6.61** – Experimento B13 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301mM + lisozima 0,301mM) em coluna HiScreen™ Capto™ DEAE (4,7 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 166
- Figura 6.62** – Experimento B14 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301mM + lisozima 0,301mM) em coluna HiScreen™ Capto™ Q (4,7 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 166
- Figura 6.63** – Experimento B15 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301mM + lisozima 0,301mM) em coluna HiScreen™ SP FF (4,7 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 167
- Figura 6.64** – Experimento C3 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para adsorção de BSA em coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), concentração de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 170
- Figura 6.65** – Experimento C7 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para adsorção de BSA em coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), concentração de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV..... 170

Figura 6.66 – Experimento C27 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para adsorção de lisozima em coluna HiTrap TM SP FF (1 mL), concentração de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.	171
Figura 6.67 – Eluição de BSA em coluna HiTrap TM Capto TM DEAE , tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV. (A) Curvas experimentais com concentração de injeção de 0,075mM (B) Curvas simuladas com concentração de injeção de 0,075mM (C) Curvas experimentais com concentração de injeção de 0,301mM (D) Curvas simuladas com concentração de injeção de 0,301mM	174
Figura 6.68 – Eluição de BSA em coluna HiTrap TM Capto TM Q , tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV. (A) Curvas experimentais com concentração de injeção de 0,075mM (B) Curvas simuladas com concentração de injeção de 0,075mM (C) Curvas experimentais com concentração de injeção de 0,301mM (D) Curvas simuladas com concentração de injeção de 0,301mM	175
Figura 6.69 – Eluição de lisozima em coluna HiTrap TM SP FF , tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV. (A) Curvas experimentais com concentração de injeção de 0,075mM (B) Curvas simuladas com concentração de injeção de 0,075mM (C) Curvas experimentais com concentração de injeção de 0,301mM (D) Curvas simuladas com concentração de injeção de 0,301mM	176
Figura A.1 – Curva de calibração de BSA – equação polinomial.....	214
Figura A.2 – Curva de calibração de BSA – equação linear	214
Figura A.3 – Curva de calibração de Lisozima – equação polinomial.....	215
Figura A.4 – Curva de calibração de Lisozima – equação linear.....	215
Figura C.1 – Coeficiente de atividade da α -quimotripsina nos diferentes sistemas analisados. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.	226
Figura E.1 – Coeficiente de atividade da lisozima em solução salina de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 7,0 e força iônica 1M – dados experimentais de Moon e colaboradores (2000b)..	253
Figura E.2 – Coeficiente de atividade da BSA em solução salina de NaCl em pH 7,4 e força iônica 3M – dados experimentais de Wu e Prausnitz (1999).	254

Figura E.3 – Coeficiente de atividade da BSA em solução salina de NaCl em pH 7,4 e força iônica 5M – dados experimentais de Wu e Prausnitz (1999).	255
Figura E.4 – Coeficiente de atividade da α -quimiotripsina em solução salina de K_2SO_4 em pH 8,25 e força iônica 0,1M – dados experimentais de Haynes (1992).	255
Figura E.5 – Coeficiente de atividade da lisozima em solução salina de $(NH_4)_2SO_4$ em pH 4,0.	257
Figura E.6 – Coeficiente de atividade da BSA em solução salina de NaCl em pH 7,4.	257
Figura E.7 – Reprodução dos resultados dos termos combintorial e residual do coeficiente de atividade da da α -quimotripsina com parâmetros descritos em Coutinho e Pessoa (2004).	259
Figura E.8 – Coeficiente de atividade da α -quimotripsina em solução salina 0,1M de sulfato de potássio	259
Figura E.9 – Coeficiente de atividade da α -quimiotripsina em solução salina de K_2SO_4 em pH 8,25 e força iônica 0,1M – dados experimentais de Haynes e colaboradores (1992) – Estimação de 10 parâmetros de interação energética.	262
Figura E.10 – Coeficiente de atividade da α -quimiotripsina em solução salina de K_2SO_4 em pH 8,25 e força iônica 0,1M – dados experimentais de Haynes e colaboradores (1992) – Estimação de 10 parâmetros de interação energética – Carga líquida da proteína = -0,43.	263
Figura E.11 – Estimação de parâmetros de dados de Lisozima em solução salina de $(NH_4)_2SO_4$ – pH 4,0. Dados experimentais de Moon e colaboradores (2000b). RMSD=4,42%	264
Figura E.12 – Estimação de parâmetros de dados com diferentes concentrações de $(NH_4)_2SO_4$ – Sistema de lisozima em pH 4,0. Dados experimentais de Moon e colaboradores (2000b). RMSD=44,11%	265
Figura E.13 – Estimação de parâmetros de dados com diferentes concentrações de $(NH_4)_2SO_4$ – Sistema de lisozima em pH 7,0. Dados experimentais de Monn e colaboradores (2000b). RMSD=13,52%	265

Figura E.14 – Estimação de parâmetros de dados com diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – Sistema de lisozima em pH 8,0. Dados experimentais de Moon e colaboradores (2000b). RMSD=12,31%	266
Figura E.15 – Estimação de parâmetros de dados de BSA em pH 5,4 com diferentes concentrações de NaCl. RMSD =21,13%	268
Figura E.16 – Estimação de parâmetros de dados de Lisozima em pH 8,0 com diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. RMSD =0,47%	268
Figura E.17 – Estimação de parâmetros de dados de BSA em pH 4,5 com diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. RMSD =86,60%	269
Figura E.18 – Esquema da avaliação da influência dos parâmetros de forma e volume	270

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Modelos de equilíbrio de adsorção de sistemas multicomponentes	Erro!
Indicador não definido.	
Tabela 2.1 – Comparação entre sequência sugeridas pelo programa Prot-Ex_Purification (LESER, 1996) e um processo experimental para purificação de uma proteína de uma mistura de quatro proteínas.....	21
Tabela 3.1 – Modelos de equilíbrio de adsorção de sistemas multicomponentes	29
Tabela 3.2 – Resumo da revisão bibliográfica dos modelos termodinâmicos empregados na literatura para representar sistemas contendo biomoléculas.	47
Tabela 3.3 – Dados experimentais de isoterma de adsorção de proteínas.....	54
Tabela 3.4 – Sistemas selecionados para investigação.....	59
Tabela 4.1 – Características das resinas utilizadas nos experimentos	62
Tabela 4.2 – Características das colunas utilizados nos experimentos.....	62
Tabela 4.3 – Planejamento de experimentos – coluna cromatográfica	65
Tabela 4.4 – Planejamento de experimentos – curva de calibração	71
Tabela 4.5 – Parâmetros de entrada do modelo matemático da coluna cromatográfica	74
Tabela 4.6 – Parâmetros do modelo matemático do equilíbrio de adsorção	76
Tabela 4.7 – Sistemas de interesse para esta pesquisa	81
Tabela 4.8 – Propriedades e parâmetros do modelo termodinâmico.....	81
Tabela 4.9 – Coeficientes das correlações de densidade (A, B, C, D) e constante dielétrica (E, F).	82
Quadro 4.1 – Parâmetros U_{ij} utilizados	82
Tabela 5.1 – Volumes de retenção experimentais obtidos - série de experimentos A para verificação da influência da concentração de injeção das proteínas.....	94
Tabela 5.2 – Volumes de retenção experimentais obtidos - série de experimentos B para verificação da influência do volume da coluna	97

Tabela 5.3 – Volumes de retenção experimentais obtidos - série de experimentos C para verificação da influência da concentração e pH do tampão	99
Tabela 5.4 – Volumes de retenção experimentais obtidos - série de experimentos D para verificação da influência do tamanho do gradiente	101
Tabela 5.5 – Verificação da reprodutibilidade dos resultados.....	111
Tabela 5.6 – Verificação do erro experimental	111
Tabela 6.1 – Parâmetros binários de interação energética e parâmetros de forma e volume estimados para cada sistema	114
Tabela 6.2 – Desvios encontrados para cada estudo de caso ao empregar os mesmos parâmetros estimados para o E.C.6	122
Tabela 6.3 – Desvios encontrados com parâmetros binários de interação energética proteína/íon reestimados para cada sistema BSA/NaCl	122
Tabela 6.4 – Desvios encontrados com parâmetros binários de interação energética proteína/íon fixo para todos os sistema BSA/NaCl	122
Tabela 6.5 – Desvios encontrados para cada estudo de caso ao empregar os mesmos parâmetros estimados para o E.C.4	123
Tabela 6.6 – Desvios encontrados com parâmetros binários de interação energética proteína/íon reestimados para cada sistema BSA/NaCl	124
Tabela 6.7 – Desvios encontrados para cada estudo de caso ao empregar os mesmos parâmetros estimados para o E.C.2	124
Tabela 6.8 – Desvios encontrados para o Estudo de Caso 1 ao empregar os diferentes conjuntos de parâmetros	124
Tabela 6.9 – Parâmetros do UNQUAC utilizados para modelagem das curvas de eluição cromatográficas	125
Tabela 6.10 – Convergência do método de resolução do modelo de transporte na coluna cromatográfica	128
Tabela 6.11 – Parâmetros da isoterma de adsorção estimados para BSA e lisozima nas diferentes resinas	129

Tabela 6.12 – Parâmetros de modelos de isoterma de adsorção de lisozima em resina SP FF publicados na literatura.....	129
Tabela 6.13 – Verificação da influência da variação da concentração de injeção de proteína na eluição em coluna HiTrap TM Capto TM DEAE.....	137
Tabela 6.14 –Verificação da influência da concentração de injeção de proteína na eluição em coluna HiTrap TM Capto TM Q	144
Tabela 6.15 – Verificação da influência da concentração de injeção de proteína na eluição em coluna HiTrap TM SP FF.....	151
Tabela 6.16 – Verificação da assimetria dos resultados simulados.....	159
Tabela 6.17 – Verificação da influência do volume da coluna.....	162
Tabela 6.18: Resultados experimentais e teóricos da verificação da influência da concentração do tampão.	167
Tabela 6.19: Parâmetros da isoterma de adsorção estimados para pH 7 e pH 8	168
Tabela 6.20 – Resultados obtidos com parâmetros estimados para cada pH	169
Tabela 6.21 – Verificação da influência do tamanho do gradiente	171
Tabela A.1 – Resultados das curvas de calibração de BSA e lisozima	213
Tabela B.1 – Planejamento de experimentos – porosidade	217
Tabela B.2 – Porosidade total.....	217
Tabela B.3 – Porosidade da partícula e fator de exclusão	218
Tabela B.4 – Porosidade da partícula e fator de exclusão	219
Tabela C.1 – Sistemas analisados - α -quimotripsina.....	221
Tabela C.2 – Parâmetros dos modelos – resultados de Agena e colaboradores (1997)	222
Tabela C.3 – Parâmetros dos modelos – calculados neste trabalho	223
Tabela C.5 – Resultados com parâmetros u_{ij} estimados.....	225
Tabela D.1 – Dados de Haynes e colaboradores (1992) - α -quimiotripsina em solução aquosa de K ₂ SO ₄	227
Tabela D.2 – Dados de Wu e Prausnitz (1999) - BSA em solução aquosa de NaCl... ..	228

Tabela D.3 – Dados de Yousef e colaboradores (2001) - ovoalbumina em solução aquosa de NaCl.....	229
Tabela D.4 – Dados de Moon e colaboradores (2000b) - Lisozima em solução aquosa de (NH ₄) ₂ SO ₄	231
Tabela D.5 – Dados de Lu e colaboradores (2009) - BSA em solução aquosa de (NH ₄) ₂ SO ₄	232
Tabela E.1 – Sistemas estudados.....	249
Quadro E.1 – Parâmetros U_{ij} utilizados	251
Tabela E.2 – Dados de entrada dos modelos termodinâmicos	252
Tabela E.3 – Valores de pKa dos aminoácidos	260
Tabela E.4 – Carga líquida da BSA.....	261
Tabela E.5 – Carga líquida da ovoalbumina	261
Tabela E.6 – Carga líquida da lisozima.....	261
Tabela E.7 – Carga líquida da α -quimiotripsina.....	261
Table 1 – Results of different optimization methods.....	276
Table 2 – Root mean square deviation for the six systems studied (%)	277

Nomenclatura

Latina

<i>Símbolo</i>	<i>Descrição</i>
a	Atividade termodinâmica / Parâmetro de interação binária (modelo UNIQUAC) / Parâmetro de equação
A	Fator de escala / Parâmetro de equação / Área
b	Parâmetro de equação
B	Parâmetro de equação
B_2, B_3	Coefficientes viriais
C	Concentração na fase móvel
C_p	Concentração na fase líquida no interior dos poros
C_2, C_3	Coefficientes que se relaciona com coeficientes viriais
d	Diâmetro
D	Coefficiente de difusividade
D_{ax}	Difusividade axial
D_m	Difusividade molecular
e	Carga do elétron
E	Nível da linha de base do pico de eluição
f	Fugacidade
F	Fluxo volumétrico da fase móvel
F_{obj}	Função objetivo
g	Parâmetro de equação
G	Energia livre de Gibbs
I	Força iônica
k	Constante de Boltzman
K	Constante de equilíbrio
K_D	Fator de exclusão
k_{ef}	Coefficiente de transferência de massa efetivo
L_c	Comprimento da coluna
m	Molalidade

MM	Massa molar
M_I	Primeiro momento
n	Numero de mols
N_A	Numero de Avogrado
Q	Concentração de adsorvato na fase sólida
Q_{AD}	Concentração adimensional de adsorvato na fase sólida
q	Parâmetro de área superficial (modelo UNIQUAC)
r	Raio / Parâmetro de volume (modelo UNIQUAC)
R	Constante dos gases ideais
t	Tempo
T	Temperatura
TM	Taxa de transferência de massa
u	Parâmetro de interação binária (modelo UNIQUAC)
u_{int}	Velocidade intersticial
\bar{v}_p	Volume parcial específico
V	Volume
\bar{V}	Volume específico
x	Distância (coordenada axial)
x_m	Fração molar
Z	Distância adimensional
z	Carga (valência) / Número de coordenação (modelo UNIQUAC)

Grega

<i>Símbolo</i>	<i>Descrição</i>
β	Segundo coeficiente virial
γ	Coeficiente de atividade
ε	Porosidade / constante dielétrica
ζ	Fator de impedimento estérico
θ	Fração de área superficial (modelo UNIQUAC)
Λ	Densidade do ligante
μ	Potencial químico / viscosidade / média da Gaussiana
ν	Coeficiente estequiométrico

π	Pressão osmótica
Π	Produtório
ρ	Densidade
σ	Desvio padrão
Σ	Somatório
τ	Tempo adimensional / Constante de deacimento exponencial
Φ	Fração de volume (modelo UNIQUAC)

Subscritos

<i>Símbolo</i>	<i>Descrição</i>
<i>ad</i>	Adimensional
<i>b</i>	Leito (coluna)
<i>c</i>	Coluna
<i>calc</i>	Calculado
<i>elui</i>	Etapa de eluição
<i>exp</i>	Experimental
<i>i</i>	Componente <i>i</i>
<i>in</i>	Entrada
<i>inj</i>	Etapa de injeção
<i>j</i>	Componente <i>j</i>
<i>lav</i>	Etapa de lavagem
<i>L</i>	Ligante
<i>m</i>	Escala de fração molar
<i>n</i>	Solvente
<i>out</i>	Saída
<i>p</i>	Poros / Partícula adsorvente (resina cromatográfica)
<i>ps</i>	Pseudo-solvente
<i>ptn</i>	Proteína
<i>r</i>	retenção
<i>s</i>	Sal / Solvente / mistura de solventes
<i>t</i>	total
<i>Tampão</i>	Tampão

Sobrescritos

<i>Símbolo</i>	<i>Descrição</i>
Adsorv	Adsorvido
DH	Debye-Huckel
E	Excesso
Flory	Equação de Flory-Huggins
max	Máximo
n _{spec}	Número das diferentes espécies presentes na solução
NDP	Número de pontos experimentais
NDT	Número de conjunto de dados experimentais
NI	Numero de íons
NS	Numero de solventes
solu	Solução
vw	Van der Waals
0	Estado de referência

Números adimensionais

<i>Símbolo</i>	<i>Descrição</i>
Bo	Número de Bodenstein $Bo = \frac{u_{int} L_c}{D_{ax,i}}$
St_{ef}	Número de Stanton efetivo $St_{ef} = \frac{L_c}{u_{int}} \frac{6}{d_p} k_{ef,i}$
Re	Número de Reynolds $Re = \frac{\rho u_{int} d_p}{\mu}$
Sc	Número de Schmidt $Sc = \frac{\mu}{\rho D_{ax}}$

Lista de Siglas

BSA	Albumina de soro bovino
CA	Curto alcance
CLFR	Cromatografia Líquida de Fase Reversa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EUA	Estados Unidos da América
HAp	Hidroxiapatita
HEWL	Lisozima de clara de ovo
HTE	<i>High throughput experimentation</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IgG	Imuno-gamma-globulina
LA	Longo alcance
MA	Médio alcance
mAbs	Anticorpos monoclonais
NISS	Modelo de solução não-ideal na superfície
PLIM	Programação linear inteira mista
PNLIM	Programação não linear inteira mista
RMSD	Raiz quadrada do erro quadrático médio – medida de erro de modelos
SDM	Modelo de deslocamento estequiométrico
SMA	Modelo estérico de ação das massas
SCV	Segundo coeficiente virial
UE	União Europeia

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1 Cenário

A biotecnologia é um dos setores industriais mais promissores deste século. Prova disso são os diversos cursos de graduação, pós-graduação e especialização abertos nos últimos anos nas universidades em todo o mundo. A sociedade precisa de profissionais capacitados que consigam ultrapassar as fronteiras biotecnológicas atuais.

Desde a década de 1970 significativas transformações na área da biotecnologia têm ocorrido de forma cada vez mais intensa e rápida. Biomoléculas (proteínas, peptídeos e aminoácidos) são utilizadas em diferentes aplicações, tais como a agricultura, o tratamento de resíduos ambientais, as indústrias química, alimentícia e farmacêutica e atualmente, também, na produção de combustíveis (como biodiesel).

A Figura 1.1 fornece uma ideia da dimensão do mercado ao apresentar o crescimento das vendas de produtos de base biotecnológica nos Estados Unidos (EUA) entre os anos 2008 e 2012, quando as vendas atingiram aproximadamente 63 bilhões de dólares (AGGARWAL, 2014). A perspectiva é de um aumento contínuo das vendas, uma vez que são esperados novos lançamentos de produtos e expansão da indicação de tratamento de alguns fármacos biotecnológicos (AGGARWAL, 2014). Foram estimadas para 2015 vendas de 4,4 bilhões de dólares apenas de enzimas industriais (amilases, lipases e proteases) (SARROUH *et al.*, 2012).

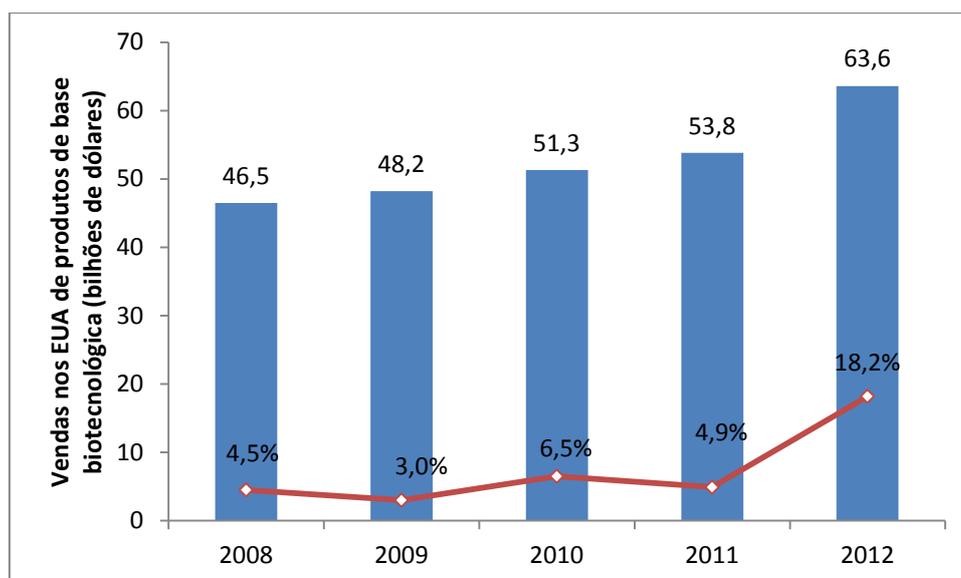


Figura 1.1: Crescimento do mercado de produtos de base tecnológica nos EUA (2008 a 2012)

Fonte: Aggarwal (2010), Aggarwal (2011) e Aggarwal (2014)

Na indústria farmacêutica, existe um grande interesse no desenvolvimento de processos em larga escala de cultivo de células para produção de proteínas terapêuticas e a posterior purificação dos produtos para serem aplicados no tratamento de doenças. Isso pode ser exemplificado pelo grande número de produtos biofarmacêuticos (44% de todos os fármacos) que estão em várias fases de pesquisa (BALASUNDARAM *et al.*, 2009). Em 2010, havia 240 anticorpos monoclonais (mAbs) na fase de testes clínicos junto com outras 120 proteínas recombinantes (SHERIDAN, 2010).

Em uma análise de mercado para biofármacos, Walsh (2010) afirmou que o mercado total para terapias à base de proteínas estava projetado para crescer entre 7% e 15% anualmente nos anos seguintes, sendo que quatro dos cinco maiores medicamentos globais até 2013 deveriam conter proteínas. Em 2013, existiam 425 produtos biofarmacêuticos aprovados nos EUA e União Europeia (UE), incluindo mais de 140 proteínas recombinantes com venda anual estimada em mais de 100 bilhões de dólares (RADER, 2013).

De fato, o crescimento das vendas representado na Figura 1.1 se deve especialmente aos anticorpos monoclonais utilizados no tratamento de problemas oncológicos e anti-inflamatórios, cujas vendas em 2012 chegaram a 24,6 bilhões de dólares (AGGARWAL, 2014), como pode ser visualizado na Figura 1.2.

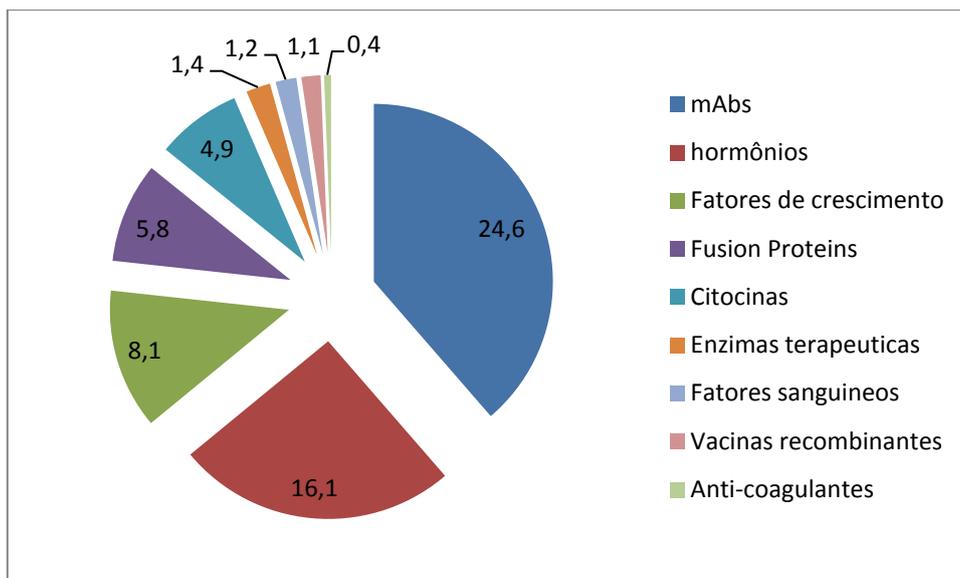


Figura 1.2: Nove principais categorias de produtos de base biotecnológica em relação às vendas nos EUA em 2012. Os valores do gráfico representam as vendas em bilhões de dólares.

Fonte: Aggarwal (2014)

Para atender a demanda futura de produtos, será necessário aumentar a capacidade de produção de biocompostos, produzi-los com maior qualidade e em preços mais acessíveis. Isso porque por um lado alguns medicamentos necessitarão significativas quantidades de proteína para satisfazer a demanda do mercado, níveis que esbarram nas atuais tecnologias para grandes escalas de produção (KELLEY, 2001). Por outro lado, expirações de patentes, biossimilares, reforma no sistema de saúde de diversos países e competição entre as indústrias impõe desafios de longo prazo (AGGARWAL, 2010). Devido a isso, deve ser adotada uma metodologia de produção de bioprodutos mais eficiente.

A perspectiva do mercado tem mudado à medida que os preços de novos bioprodutos diminuem. Petrides e colaboradores (2002) apontam que a comercialização de novas drogas leva de 7 a 12 anos para ser completada e requer investimentos na faixa de 100 milhões de dólares a 800 milhões dólares sendo que 80 a 85% dos produtos falham em algum ponto do desenvolvimento e não chegam a ser comercializados. Dado esse panorama, as metodologias que possam ser empregadas para acelerar o desenvolvimento de produtos e aumentar a confiabilidade dos processos possuem grande impacto para as indústrias.

Keim e Ladisch (2000) afirmam que à medida que a escala de produção de novos bioprodutos cresce, a necessidade de esquemas de purificação custo-efetivos

umenta em importância. Isso porque em pequenas escalas os custos fixos dominam o custo total e uma melhoria nos processos de produção (diminuição de custos operacionais) não produz impacto significativo. Entretanto, em escalas de produção grandes os custos fixos perdem importância e torna-se fundamental a redução dos custos variáveis. Para aumentar as margens de lucro, as empresas estão buscando, pois, diminuir os custos de produção, aumentar a eficiência e, especialmente, planejar o processo corretamente do início para evitar custos associados com mudança posterior (PETRIDES e SILETTI, 2004).

Leser e Asenjo (1992) ressaltam um ponto de extrema importância para justificar a síntese racional dos processos de separação e purificação de proteínas buscando a viabilidade industrial do processo desde as fases iniciais de pesquisa: uma vez recebida a aprovação regulatória, o processo de purificação não pode ser alterado, ou então necessita nova aprovação. Devido a isso, o esquema de purificação permanece fixo, independente das vantagens que poderiam ser obtidas com a alteração de operações unitárias ou condições operacionais. Verifica-se, portanto, mais uma vez a importância da busca pela viabilidade industrial do processo desde as fases iniciais de pesquisa.

A importância do conhecimento sobre o processo, assim como, de uma estratégia de purificação baseada em princípios de engenharia a fim de identificar e mitigar os riscos relacionados à baixa qualidade dos processos, através da utilização de conhecimentos mecanísticos de como os fatores de formulação e processos afetam a performance dos produtos foi enfatizada em diretrizes publicadas pelo US Food and Drug Administration (FDA, 2004).

Assim, estratégias que possam desenvolver racionalmente processos de purificação de proteína utilizando conhecimentos fundamentais como propriedades termodinâmicas do meio, bem como ferramentas de simulação ganham proeminência (NFOR *et al.*, 2009) (GUÉLAT *et al.*, 2010).

1.2 Principais desafios da produção industrial de biomoléculas

Os principais desafios da produção de biomoléculas em escala industrial podem ser divididos em desafios nos processos de *upstream*, que envolvem a obtenção dos

produtos; e desafios nos processos de *downstream*, que envolvem a separação e purificação dos biocompostos.

A produção de proteínas em larga escala possui os problemas usuais encontrados nos processos de *downstream* comuns acrescidos de dificuldades de concentração e purificação de moléculas grandes (LESER e ASENJO, 1994). Estas são:

- i. biocompostos diluídos no meio ao final do processo reacional;
- ii. inúmeros contaminantes que muitas vezes possuem estrutura bastante similar ao produto de interesse, atrapalhando sua separação (ABBOTT e HANTTON, 1988);
- iii. presença de sais, o que somada à presença de tantos componentes dificulta o entendimento teórico do fenômeno e a previsão de condições ótimas para a purificação.

Apesar do significativo avanço nos sistemas de expressão para os novos biofármacos, existe uma lacuna no desenvolvimento de processos de purificação *downstream* para que este seja capaz de lidar com o aumento da produção *upstream* (FREED, 2010) (GUIOCHON e BEAVER, 2011).

A necessidade de purificação de uma proteína de forma eficiente, econômica e em pureza e quantidade suficientes aplica-se a todo processo de purificação de proteína em larga escala, mas dependendo da aplicação comercial da proteína de interesse a extensão da purificação é distinta (WHEELWRIGHT, 1987); (NFOR *et al.*, 2008).

Para proteínas terapêuticas, os processos industriais requerem o rápido desenvolvimento da metodologia de separação e purificação. Estima-se que o custo de recuperação de enzimas em geral possa chegar a mais de 80% do custo total da produção (WENZIG *et al.*, 1993). Para a produção de proteínas terapêuticas, Lowe e colaboradores (2001) estimam que 50 a 80% dos custos totais de produção sejam constituídos pelos processos de *downstream*.

Normalmente, o desenvolvimento de métodos de purificação é baseado no escalonamento de processos bem estabelecidos em escala de bancada. Esses processos, empiricamente desenvolvidos, tornaram-se plataformas padrão ou modelo para algumas categorias de proteínas (SHUKLA *et al.*, 2007) (NFOR *et al.*, 2009). Muitos fluxogramas de processos de bancada são reproduzidos para diferentes sistemas devido

ao crescente número de produtos sendo pesquisados e devido à ênfase em acelerar o processo até o mercado (HAHN *et al.*, 2003).

As vantagens na utilização dessas plataformas incluem a economia de tempo e esforço além da grande similaridade de práticas e informações entre diferentes processos de uma mesma indústria (o que pode representar uma vantagem gerencial para a empresa). Entretanto, existe um debate emergente sobre a habilidade das plataformas atuais de enfrentar os desafios modernos do mercado de biomoléculas (KELLEY *et al.*, 2009). Frequentemente, são encontrados processos operando abaixo do ponto ótimo, com carga de alimentação e utilização dos materiais auxiliares ineficientes (NFOR *et al.*, 2009).

Recentemente, técnicas baseadas em miniaturização e paralelização de experimentos, chamadas unidades combinatórias ou *high throughput experimentation* (HTE) têm sido citadas na literatura como possibilidades para a substituição de experimentos tradicionais em escala laboratorial (BENSCH *et al.*, 2005) (REGE *et al.*, 2006) (BENSCH *et al.*, 2007) (GUERRIER *et al.*, 2007) (STEIN e KIESEWETTER, 2007) (WIERLING *et al.*, 2007) (COFFMAN *et al.*, 2008) (SUSANTO *et al.*, 2008) (WIENDAHL *et al.*, 2008) (SUSANTO *et al.*, 2009) (HANSEN, 2013). Através dessa técnica é possível explorar uma vasta gama de condições e opções de processo em mínimo tempo e custo.

Nfor e colaboradores (2009) afirmam que atualmente o desenvolvimento de processos nas maiores indústrias biofarmacêuticas (Genentech, Wyeth e Merck-Serono) tem sido baseado em HTE robotizado de materiais auxiliares, métodos e condições para fornecer um fluxograma de purificação que é posteriormente otimizado.

Bhambure e colaboradores (2011) apresentaram uma revisão bibliográfica sobre as várias ferramentas de HTE disponíveis para realizar o desenvolvimento de processos de *upstream* e *downstream* de bioprodutos farmacêuticos. É possível, por exemplo, selecionar o meio cromatográfico e sequenciar as etapas cromatográficas sem qualquer informação explícita sobre as propriedades dos componentes da mistura (REGE *et al.*, 2006) (GUERRIER *et al.*, 2007).

A vantagem deste tipo de metodologia é a necessidade de menos experimentos quando comparado ao processo tradicional de experimentação quase aleatória. A desvantagem é a necessidade de estratégias eficientes de planejamento de experimentos

e a dificuldade de analisar a grande quantidade de dados gerados. Adicionalmente não se pode afirmar que este é um método propriamente racional de síntese de bioprocessos, porque ainda que racionalize a obtenção de dados necessários sobre as operações unitárias, não é capaz de sistematicamente propor um fluxograma para o processo.

A melhor abordagem a ser empregada para a utilização de métodos HTE seria um método híbrido onde ferramentas de HTE seriam utilizadas para a aquisição de dados dos componentes da mistura inicial e dados das operações unitárias. Posteriormente, um método de síntese heurístico ou algorítmico seria empregado para a determinação do fluxograma do processo.

1.3 Motivação

Diversos autores já ressaltaram que existe a necessidade de estratégias e ferramentas que forneçam soluções de longo prazo com o desenvolvimento de processos de biosseparação mais racionais (ASENJO e ANDREWS, 2004) (NFOR *et al.*, 2008) (GUIOCHON e BEAVER, 2011), ou seja, existe, ainda hoje, a necessidade de metodologias estruturadas de síntese de bioprocessos.

Nfor e colaboradores (2008) acreditam que enquanto houver grande pressão do mercado de proteínas terapêuticas em relação à rapidez do desenvolvimento do processo como um todo (desde a descoberta, passando pela fase de testes, até a produção industrial), as metodologias de síntese baseadas em heurística e excessiva experimentação irão perdurar no meio científico. Entretanto, quanto mais restritos ficarem os requerimentos de qualidade dos produtos e outras questões regulatórias, possivelmente haverá crescimento no desenvolvimento de metodologias de síntese mais racionais. As ferramentas de modelagem e simulação de bioprocessos desenvolvidas nas últimas décadas ganharão larga aplicabilidade.

A maioria dos métodos de síntese de bioprocessos já desenvolvidos esbarram no rigor dos modelos cromatográficos utilizados para predição da concentração de contaminantes e da proteína de interesse na corrente de processos. Verifica-se, pois, a necessidade de implementação de modelos matemáticos mais eficientes para a descrição da separação cromatográfica.

Segundo Ahamed e colaboradores (2006), a sistematização racional do projeto de um processo de *downstream* para biomoléculas tem sido virtualmente impossível por falta do conhecimento de propriedades termodinâmicas dos componentes a serem separados. Apesar dos muitos avanços na área, existe uma lacuna de dados precisos que descrevam o comportamento dos sistemas nas técnicas de separação comumente utilizadas na indústria de bioprocessos, bem como o comportamento da grande maioria de proteínas comerciais para serem utilizados no projeto de um processo. Apenas com o entendimento de seus comportamentos pode-se com eficiência sintetizar, dimensionar e otimizar processos industriais e suas operações unitárias (PESSOA, 2011).

Comparando com a indústria química de forma geral, os bioprocessos não possuem modelos termodinâmicos confiáveis para a estimação de propriedades moleculares; não possuem também banco de dados confiáveis de propriedades físico-químicas e termodinâmicas das biomoléculas. Pode-se afirmar que até agora, tem sido virtualmente impossível determinar o processo ótimo de separação e purificação de proteínas de forma racional devido à falta de conhecimento fundamental das propriedades moleculares dos componentes a serem separados e também devido à falta de um sistema eficiente que organize tais informações (ASENJO e ANDREWS, 2009).

Poucas bases de dados de propriedades termodinâmicas e modelos para o projeto de processos foram desenvolvidas na indústria biofarmacêutica em contraste com a indústria petroquímica (SIIROLA, 1996). Uma abordagem similar à ocorrida na indústria petroquímica com o desenvolvimento de modelos termodinâmicos precisos, e a aquisição de dados termodinâmicos para as principais moléculas pequenas ou grupos moleculares, precisa ser realizada na indústria de biotecnologia.

1.4 Objetivo e apresentação dos capítulos

Previamente apresentou-se o cenário e as respectivas necessidades de metodologia de síntese de fluxogramas de separação e purificação de biomoléculas e previsão da concentração de contaminantes e da proteína de interesse na corrente de processo de forma mais acurada. Dessa forma, o objetivo geral desta tese de doutorado é apresentar um modelo termodinâmico rigoroso para a modelagem de uma coluna cromatográfica, capaz de realizar a separação e purificação de proteínas de forma a

tornar possível prever satisfatoriamente o tempo de retenção de cada proteína e sua curva de eluição.

A Figura 1.3 apresenta um esquema geral da pesquisa de tese.

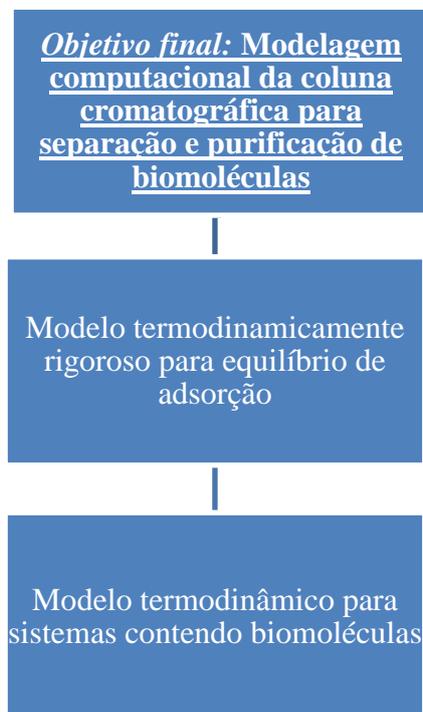


Figura 1.3: Esquema geral dos objetivos da pesquisa de doutorado

Os objetivos específicos deste trabalho podem ser divididos em duas partes:

- Experimental:
 - i. obtenção de dados de eluição cromatográfica dos sistemas estudados.
- Teórica:
 - i. desenvolvimento de um modelo termodinâmico capaz de correlacionar dados experimentais de pressão osmótica de soluções salinas contendo proteínas;
 - ii. utilização de um modelo rigoroso do equilíbrio de adsorção de proteínas que considere a não idealidade da fase móvel por

meio da utilização de um modelo de energia livre de Gibbs em excesso;

- iii. estimação de parâmetros de equilíbrio de adsorção com a utilização do método inverso;
- iv. estudo de condições preditivas para o modelo de transporte desenvolvido.

Este texto é dividido em sete capítulos, incluindo este introdutório. O segundo capítulo descreve o processo de separação e purificação de proteínas ressaltando as principais operações unitárias empregadas em cada etapa. O terceiro capítulo apresenta uma revisão bibliográfica para a simulação da curva de eluição cromatográfica de sistemas contendo proteínas, incluindo a modelagem do equilíbrio de adsorção de proteínas nas resinas cromatográficas bem como do equilíbrio termodinâmico de sistemas contendo biomoléculas. O quarto capítulo apresenta os materiais e métodos empregados, tanto para a parte experimental, quanto as equações empregadas na modelagem matemática e métodos da implementação computacional. O quinto capítulo traz os resultados experimentais obtidos, enquanto o sexto capítulo apresenta e discute os resultados da parte teórica. Por fim, o último capítulo apresenta as conclusões desta pesquisa de tese e as sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

Processo de Separação e Purificação de Proteínas

A separação e a purificação de uma biomolécula são realizadas por uma sequência de operações unitárias. Numerosas opções de operações unitárias (e de combinação de operações unitárias) são capazes de satisfazer as restrições do processo geral e da especificação do produto (AHAMED *et al.*, 2006). Os processos variam não apenas em função do produto, mas também em função do sistema de expressão da proteína de interesse (bactérias, fungos, célula animal ou célula vegetal).

Como ressaltado na introdução, é de sumo interesse tornar os processos de produção de biocompostos mais atraentes economicamente, uma vez que devido à expiração de muitas patentes na próxima década, a competição industrial aumentará no sentido de reduzir os custos de purificação para se conseguir vantagens de mercado (NFOR *et al.*, 2009). Assim, uma comparação quantitativa das opções de fluxograma disponíveis é necessária para permitir a seleção da melhor alternativa.

Proteínas diferenciam-se umas das outras de acordo com o tamanho, a densidade de carga, a forma e a atividade biológica. Os métodos de separação exploram tais diferenças entre o composto alvo e os contaminantes de tal forma que o esquema de purificação englobe uma combinação de técnicas de separação baseadas nas várias propriedades físico-químicas das proteínas.

O processamento *downstream* consiste em etapas de recuperação de proteínas seguidas de etapas de purificação. Técnicas de recuperação primárias são empregadas no esquema de purificação antes de (ou em conjunto com) técnicas de alta resolução. As etapas de recuperação costumam ser simples e impõem poucas complicações ao projeto

e seleção (LESER e ASENJO, 1992). Por outro lado, uma grande variedade de técnicas está disponível para purificação de alta resolução e diferentes e diversas combinações delas podem alcançar os níveis de pureza desejados (LESER e ASENJO, 1994).

Combinando de forma ótima essas etapas, é possível purificar o produto com custo aceitável e em período de tempo razoável (o que é de extrema importância tanto devido a restrições pela estabilidade do bioproduto, quanto para aumentar a produtividade).

Este capítulo apresenta uma breve descrição das principais operações unitárias empregadas para separação e purificação de biomoléculas dando ênfase às diferentes etapas envolvidas, seus objetivos e desafios. Dessa forma, é possível contextualizar melhor os capítulos seguintes onde serão discutidos os aspectos específicos da cromatografia de troca iônica.

2.1 Esquema de separação e purificação de proteínas

As proteínas podem ser classificadas comercialmente em alimentícias, aditivos alimentícios, farmacêuticas, terapêuticas, enzimas industriais e enzimas de diagnóstico. Exemplos de proteínas industriais são as amilases, lipases e proteases que requerem pouco processamento *downstream*, uma vez que elas são extracelulares e o produto comercial é essencialmente uma preparação enzimática contendo a enzima com atividade requerida e outras substâncias. Já as proteínas para fins de diagnósticos (por exemplo, glicose oxidase empregada para determinação da glicose no sangue) são submetidas a, pelo menos, algumas etapas de purificação utilizando técnicas de alta resolução, especialmente para retirar enzimas que possam interferir na função de diagnóstico do produto final (HEADON e WALSH, 1994). Por fim, os casos de maior requerimento de pureza ocorrem, geralmente, com as proteínas terapêuticas (grau de pureza chega a exceder 99%) e o processo de separação e purificação deve retirar não apenas contaminantes proteicos, mas substâncias adicionais como partículas virais e endotoxinas que poderiam comprometer a segurança do produto já que existe uma exigência bastante alta das agências reguladoras sobre a qualidade e segurança dos produtos terapêuticos que se relacionam diretamente com seu grau de pureza. Especialmente, com o advento da tecnologia do DNA recombinante, critérios de

qualidade altamente restritivos foram impostos para garantir a segurança de biomoléculas.

Generalizando um esquema de separação de uma biomolécula, é possível ressaltar quatro etapas: recuperação, concentração, purificação e formulação do produto. Tal esquema possui algumas diferenças caso a biomolécula seja expelida pela célula (extracelular) ou não (intracelular). Caso seja extracelular, basta proceder a uma etapa de separação das células e o sobrenadante será posteriormente purificado. Entretanto, caso o produto de interesse seja intracelular, é necessário realizar uma etapa de rompimento da célula e posterior separação da proteína de interesse. Mas seja a proteína intracelular ou extracelular, após a etapa de recuperação obtém-se uma corrente com o biocomposto de interesse e diversos contaminantes que segue para as etapas de concentração e purificação.

A Figura 2.1 apresenta as principais etapas da recuperação de proteínas e as operações unitárias que podem ser utilizadas em cada etapa.

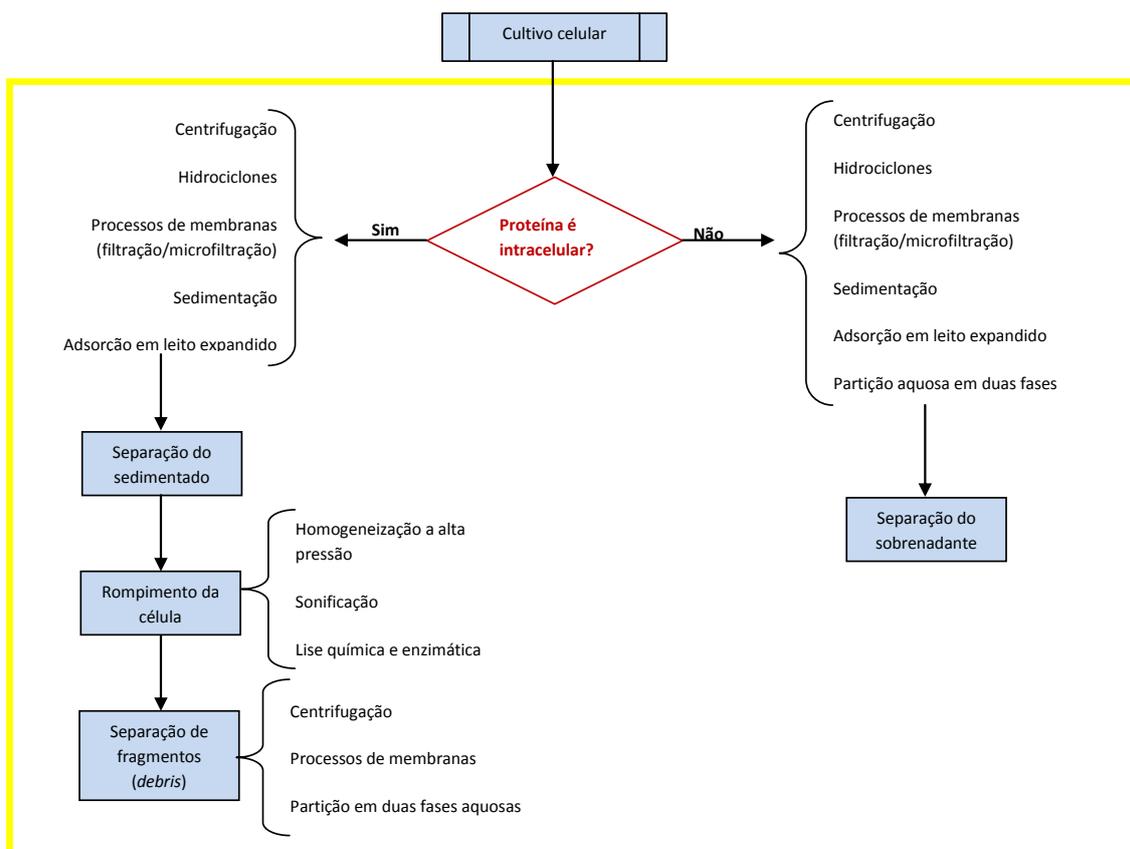


Figura 2.1: Etapas de recuperação de proteínas

Fonte: Adaptado de Lienqueo e Asenjo (2000)

O objetivo principal das etapas de recuperação é separar as proteínas e partes não proteicas da mistura (etapa também chamada clarificação). Quando a recuperação é realizada por extração dos produtos diretamente das células ou fragmentos celulares, essa etapa torna-se também uma purificação parcial.

Quando a proteína de interesse é intracelular, independente de ser solúvel ou insolúvel (é comum a formação de corpos de inclusão insolúveis da proteína de interesse em microorganismos), o isolamento tipicamente requer o uso de técnicas de rompimento da célula. Este pode ser obtido por diferentes métodos que podem ser classificados em mecânicos e não mecânicos, podendo ser combinados para aumentar a eficiência total do rompimento celular (BALASUNDARAM *et al.*, 2009). A escolha da técnica de rompimento celular determina o tamanho dos fragmentos (*debris*) resultantes que, por sua vez, influenciam as operações subsequentes.

Após o rompimento das células, é necessária a remoção dos fragmentos celulares. Em escala industrial o pequeno tamanho das partículas traz dificuldades extras. O resultado dessa etapa é uma solução contendo o produto, metabólitos celulares e componentes remanescentes do meio de cultura. A separação das células comumente resulta em uma solução com uma concentração de proteínas totais na faixa de 60-70 g/l (LESER e ASENJO, 1992). Muitas vezes, neste ponto são adicionados inibidores de proteases para evitar a destruição do produto de interesse.

Após a remoção dos fragmentos celulares, caso a proteína de interesse esteja na forma de corpos de inclusão insolúveis é necessário realizar uma renaturação através de dissolução em um agente desnaturante forte como ureia ou sulfato de guanidina e depois proceder um reenovelamento (*refolding*).

Uma vez que a proteína de interesse está presente no meio líquido clarificado, entra-se nas etapas de concentração e purificação. A Figura 2.2 apresenta as principais etapas da purificação de proteínas e as operações unitárias que podem ser utilizadas em cada uma.

Comumente, em microorganismos não modificados geneticamente, uma proteína de interesse representa uma fração pequena da proteína celular total ou proteína extracelular. Já quando se lida com a superexpressão em bactérias, em alguns casos, pode-se ter a presença da proteína de interesse representando até 25% da proteína total da célula (HAMEL e HUNTER, 1990).

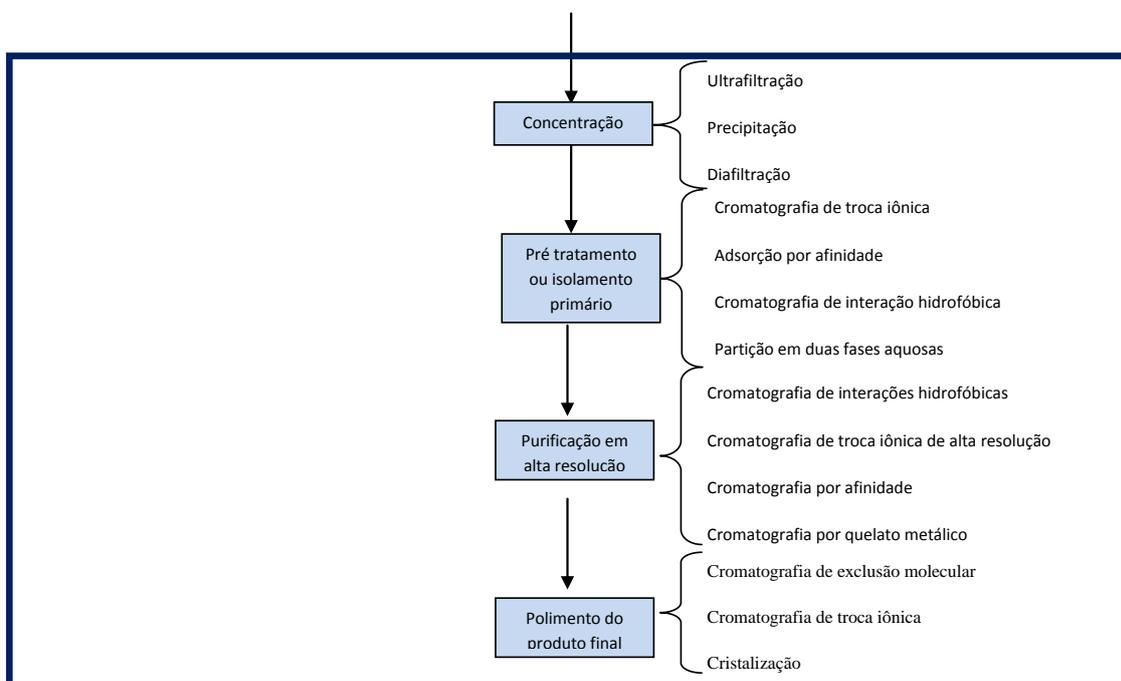


Figura 2.2: Etapas de purificação de proteínas

Fonte: Adaptado de Lienqueo e Asenjo (2000)

Após a etapa de concentração, começa-se propriamente o que se conhece como o processo de purificação de proteínas. A seção de purificação pode ser dividida, normalmente, em três partes: captura, purificação intermediária e polimento. Durante a captura, a proteína é isolada e concentrada. Durante a purificação intermediária há remoção de impurezas do meio ou dos principais contaminantes proteicos. Por fim, o polimento serve para remover traços de impureza, contaminantes com propriedades muito similares ao produto de interesse e agregados proteicos.

As técnicas de purificação empregadas podem ser divididas em dois grandes grupos: métodos que empregam membranas (ultrafiltração e osmose inversa) e técnicas cromatográficas que exploram distintas propriedades da proteína de interesse.

A cromatografia é um processo de adsorção seletiva da molécula de interesse de um solvente para um adsorvente. Lavando o adsorvente com o solvente dessorvente, os compostos da mistura são eluídos a distintas velocidades através do leito cromatográfico e podem ser coletados separadamente. Os processos posteriores de refinamento objetivam a concentração do produto de interesse. Isso porque após esta etapa o produto de interesse, usualmente, está presente em alta pureza (dado que os contaminantes já foram retirados anteriormente), mas muito diluído no solvente.

A cromatografia de troca iônica normalmente é utilizada como primeiro estágio cromatográfico. Essa técnica aproveita as interações elétricas entre as proteínas e as cargas imobilizadas nas resinas de troca iônica. As resinas podem ser de dois tipos: catiônicas ou aniônicas. Uma vez que a maioria das proteínas é negativamente carregada em pH fisiológico, a resina de troca aniônica é a mais empregada. Essa técnica cromatográfica possui alto poder de resolução e capacidade e pode ser utilizada para a purificação de quase qualquer molécula carregada que seja solúvel em um solvente aquoso (KALYANPUR, 2002). Entretanto, raramente este tipo de coluna é utilizado como etapa única de purificação devido à baixa especificidade (ADHIKARI *et al.*, 2010).

A cromatografia de interação hidrofóbica baseia-se na interação entre a proteína de interesse e resíduos hidrofóbicos presentes na matriz da resina cromatográfica. Usualmente é empregada para separação de pequenas proteínas e peptídeos (massa molar de cerca de 1000 g/mol). A eluição costuma ser por diminuição da concentração salina do solvente, por mudança de pH ou temperatura.

A cromatografia de fase reversa emprega o mesmo princípio da cromatografia de interação hidrofóbica. Entretanto, neste caso, a própria resina é hidrofóbica e interage reversivelmente com proteínas hidrofóbicas. Normalmente esta técnica é utilizada como etapa de polimento final em separação de proteínas pequenas (massa molar ≤ 3000 g/mol). A eluição é realizada com solvente usualmente composto de água misturada com aditivos orgânicos para modificar o tempo de retenção dos componentes do produto. Um exemplo típico de uso dessa separação é a purificação final de insulina.

A cromatografia de afinidade emprega o princípio de adsorção biosseletiva. Apenas proteínas específicas adsorvem na resina e as demais são eluídas durante a lavagem. Este é o caso, por exemplo, da purificação de anticorpos monoclonais.

A cromatografia de exclusão molecular separa as moléculas por diferença de tamanho relativo e volume hidrodinâmico, sendo amplamente empregada na etapa de polimento final.

Nos últimos anos, vem se destacando também as pesquisas relativas ao uso de hidroxiapatita (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) para a purificação de proteínas. Os resíduos amino das proteínas são atraídos por grupos fosfato da HAp e repelidos pelos grupos positivos (Ca^{2+}). O contrário acontece para os resíduos carboxílicos da proteína. A

elução é realizada com solução de sais de Ca^{2+} ou PO_4^{2-} . Essa técnica possui alta seletividade e baixo custo.

Por fim, vem ganhando grande espaço a cromatografia multimodal, onde as resinas possuem capacidade de interagir de formas diferentes. Ou seja, resinas que possuem características de cromatografia de troca iônica e de cromatografia de interação hidrofóbica. Esse tipo de resina possui alta especificidade e alta seletividade.

Cada técnica cromatográfica apresenta vantagens e desvantagens específicas que devem ser consideradas dependendo da etapa de purificação em que é empregada. Para a etapa de captura é importante buscar técnicas com alta capacidade, altas velocidades e de elevada recuperação. Para a etapa de purificação intermediária além da alta capacidade, desejam-se técnicas de alta resolução. Para a etapa final de polimento, a resolução e a recuperação são os fatores-chave.

O produto deve ser isolado como uma substância pura após a cromatografia. Para esta etapa de polimento é possível utilizar a técnica de cristalização ou evaporação do solvente.

2.2 Panorama da síntese de processos de separação e purificação de proteínas

Ao longo desta seção são discutidas as estratégias existentes para a síntese de processos de separação e purificação de proteínas ressaltando suas potencialidades e fragilidades.

A síntese de um processo consiste no desenvolvimento de fluxogramas e na seleção daqueles que se apresentem mais favoráveis. São eliminadas as configurações indesejáveis ou inviáveis reduzindo o número de alternativas a serem analisadas e otimizadas em etapas posteriores.

De forma geral, os métodos de síntese de processos podem ser classificados em métodos heurísticos (sistemas especialistas), métodos algorítmicos de programação matemática, procedimento algorítmicos baseados em conceitos termodinâmicos (tecnologia *pinch*) e métodos híbridos que combinam duas ou mais abordagens de síntese de processo. Os métodos baseados em extensiva experimentação (HTE) não são

em si mesmo racionalizações para a síntese de processos, mas sim para evitar experimentos aleatórios normalmente empregados no desenvolvimento de fluxogramas de processos.

Uma ampla revisão dos métodos de síntese de bioprocessos pode ser encontrada em Nfor e colaboradores (2008) e Nfor (2011). As principais metodologias já desenvolvidas são apresentadas a seguir.

Os métodos heurísticos são constituídos de uma série de regras que se baseiam na experiência adquirida em processos semelhantes ao estudado. As vantagens dessa abordagem referem-se à facilidade de aplicação e à possibilidade de influência do projetista ao longo da análise. Tais métodos são muito convenientes de serem usados quando os dados sobre os componentes a serem separados são inexistentes ou insuficientes. Porém, por serem inerentemente qualitativos, não garantem a seleção do melhor processo dentre todas as opções avaliadas (ótimo global). Os processos puramente heurísticos geralmente resultam em resultados não-ótimos, com alto custo e utilização ineficiente das utilidades. Adicionalmente, o uso de conhecimento heurístico pode levar à eliminação de fluxogramas que contrariem a experiência, mas que possuem características desejáveis.

Ainda que nem sempre a síntese do processo com a utilização das regras heurísticas seja bem estruturada, na grande maioria dos projetos a seleção e a determinação da ordem das operações unitárias ocorrem seguindo as heurísticas dos engenheiros responsáveis.

Pode-se dizer que a racionalização dos processos puramente heurísticos se dá através do desenvolvimento de sistemas especialistas que contém informações sobre propriedades físicas dos componentes a serem separados, tornando-se sistemas híbridos.

Um sistema especialista para a síntese de bioprocessos foi desenvolvido por Asenjo e colaboradores com publicações ao longo de 20 anos (ASENJO *et al.*, 1989) (PROKOPAKIS e ASENJO, 1990) (ASENJO *et al.*, 1991) (LESER e ASENJO, 1992) (LESER e ASENJO, 1994) (LESER *et al.*, 1996) (LIENQUEO *et al.*, 1996) (LIENQUEO *et al.*, 1998) (LIENQUEO *et al.*, 1999) (LIENQUEO e ASENJO, 2000) (ASENJO e ANDREWS, 2004) (ASENJO e ANDREWS, 2008) (ASENJO e ANDREWS, 2009). Neste modelo foi utilizada uma combinação entre conhecimento especialista e alguns cálculos simplificados (*shortcut*) para a síntese de todo o

fluxograma do sistema de separação e purificação.

O método combina regras heurísticas com correlações matemáticas para a seleção de processos de separação de proteínas. O algoritmo contém cerca de 600 regras lógicas que emulam o conhecimento especialista (LIENQUEO *et al.*, 1996).

Foi demonstrado que o uso do sistema especialista desenvolvido é suficiente para a síntese das etapas de recuperação de proteínas (LESER e ASENJO, 1992). Já a síntese das etapas de purificação necessita informações de propriedades físico-químicas da proteína de interesse e dos contaminantes (WATANABE *et al.*, 1994) (ASENJO *et al.*, 1994) (ANDREWS *et al.*, 1994).

Os trabalhos publicados em meados da década de 1990 já trazem, portanto, uma metodologia híbrida onde a sequência de operações unitárias é determinada através de um procedimento sistemático que envolve o uso de análise semiquantitativa das técnicas cromatográficas (LESER e ASENJO, 1994) (LIENQUEO *et al.*, 1996) (ASENJO e ANDREWS, 2004).

Nos trabalhos de Asenjo e colaboradores é realizada uma aproximação triangular de um pico de eluição cromatográfico gaussiano (LESER *et al.*, 1996). Considera-se que não há perdas da proteína de interesse na corrente de efluente (rendimento de 100%). Considera-se, também, que a largura do pico de eluição é constante para cada tipo de cromatografia, independente da proteína e de sua concentração (LIENQUEO *et al.*, 1996).

Os autores sugerem que seja realizada uma etapa posterior de otimização das condições das operações unitárias e em diversos trabalhos publicam resultados sobre essa metodologia (HUENUPI *et al.*, 1999) (SHENE *et al.*, 2006) (ASENJO e ANDREWS, 2009) (ORELLANA *et al.*, 2009).

O principal problema apontado concernente à metodologia desenvolvida por Asenjo e colaboradores é a utilização de uma teoria simplificada de cromatografia e a análise sequencial das operações unitárias não considerando adequadamente interações entre as unidades de purificação (NFOR *et al.*, 2008).

No final da década de 1990, Bogle e colaboradores (WAI *et al.*, 1996) (BOGLE *et al.*, 1996) (STEFFENS *et al.*, 1999b) (STEFFENS *et al.*, 1999a) (STEFFENS *et al.*, 2000a) (STEFFENS *et al.*, 2000b) apresentaram uma metodologia de síntese onde as operações unitárias de separação e purificação são inicialmente classificadas utilizando

informações de propriedades físico-químicas dos componentes da mistura. Com isso, reduz-se a quantidade de operações unitárias que podem ser selecionadas, diminuindo o problema combinatorial. Em seguida, é realizada uma avaliação sistemática de uma superestrutura gerada utilizando modelos preditivos das operações unitárias consideradas. Nesta metodologia é empregado o modelo cromatográfico de picos triangulares proposto por Asenjo e colaboradores.

Outro caminho que foi seguido ao longo dos anos reporta a utilização de programação linear inteira mista (PLIM) para a síntese ótima do processo de purificação de proteína (VASQUEZ-ALVAREZ e PINTO, 2001) (VASQUEZ-ALVAREZ *et al.*, 2001). Mais uma vez, a modelagem matemática dos processos cromatográficos é realizada segundo a metodologia previamente descrita por Lienqueo e colaboradores (1998). Posteriormente, os autores incorporaram perdas da proteína de interesse no decorrer do processo de purificação a fim de avaliar as vantagens e desvantagens entre a qualidade do produto dada pela pureza e a quantidade (VASQUEZ-ALVAREZ e PINTO, 2002) (VASQUEZ-ALVAREZ e PINTO, 2003) (VASQUEZ-ALVAREZ e PINTO, 2004).

Mais recentemente, Simeonidis e colaboradores (SIMEONIDIS *et al.*, 2004); (SIMEONIDIS *et al.*, 2005a) propuseram o uso de uma formulação PNLIM para a síntese de uma planta integrada de produção de proteína que realiza simultaneamente a síntese do processo de separação e purificação de uma proteína e a seleção da melhor cauda de peptídeo a ser inserida na molécula da proteína de interesse através de técnicas de DNA recombinante a fim de facilitar o processo de purificação. O programa foi aplicado em um sistema pequeno composto de uma mistura de quatro proteínas e em um sistema maior contendo 13 proteínas.

Posteriormente, o mesmo grupo utilizou aproximações lineares às funções não lineares anteriormente trabalhadas resultando em um programa PLIM (SIMEONIDIS *et al.*, 2005b). Entretanto, alguns problemas da formulação anterior persistiram tais como a necessidade de resolução em duas etapas (seleção da cauda de aminoácido e síntese posterior do fluxograma) e a incapacidade de atingir um resultado satisfatório para o sistema contendo 13 proteínas.

Em 2009, foi apresentada uma formulação baseada na técnica não linear com outras estratégias de linearização onde é possível realizar uma otimização simultânea da seleção da cauda peptídica e do fluxograma do processo (NATALI *et al.*, 2009). O

modelo proposto utiliza a mesma aproximação triangular dos picos cromatográficos utilizada pelos demais autores.

2.3 Conclusões parciais

As principais metodologias de síntese de bioprocessos esbarram na simplicidade do modelo cromatográfico utilizado para previsão da concentração de contaminantes e da proteína de interesse na corrente de processo.

Lienqueo e Asenjo (2000) avaliaram os motivos de diferenças da ordem de 20% entre a pureza estimada em cada etapa de purificação pelo programa Prot_Ex_Purification (LESER, 1996) e a pureza obtida experimentalmente. A Tabela 2.1 apresenta dois exemplos de resultado obtido por (LIENQUEO *et al.*, 1999). As diferenças podem ser resultantes da consideração de picos de eluição triangulares e simplificação demasiada do modelo de coeficiente de retenção hidrofóbico. Tais erros poderiam ser diminuídos através de melhores correlações para predição do tempo de retenção e aproximação do formato do pico de eluição.

Tabela 2.1 – Comparação entre sequência sugeridas pelo programa Prot-Ex_Purification (LESER, 1996) e um processo experimental para purificação de uma proteína de uma mistura de quatro proteínas

Proteína	Etapa	Sequência sugerida pelo programa Prot_Ex_Purification (Leser, 1996)		Validação experimental	
		Etapa cromatográfica	Pureza (%)	Etapa cromatográfica	Pureza (%)
BSA	1	Troca aniônica pH 7,0	64	Troca aniônica pH 7,0	64
	2	Interação hidrofóbica	95	Interação hidrofóbica	80
β -glucanase	1	Interação hidrofóbica	32	Interação hidrofóbica	35
	2	Troca aniônica pH 6,5	70	Troca aniônica pH 6,5	60

Fonte: Lienqueo *et al.* (1999)

Percebe-se, assim, a necessidade da modelagem do perfil cromatográfico de forma que seja possível prever satisfatoriamente o tempo de retenção de cada proteína e a curva de eluição. A partir da integração deste modelo desde o tempo de início de

eluição da proteína de interesse até o tempo final de eluição é possível obter com maior precisão a concentração de contaminantes eluída junto com a proteína de interesse em cada etapa.

CAPÍTULO 3

Revisão Bibliográfica para a Modelagem da Curva de Eluição Cromatográfica

No decorrer deste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre a modelagem matemática de sistemas cromatográficos com ênfase na cromatografia de troca iônica. São apresentadas também, principalmente, as justificativas para a formulação da base do modelo adotado, posteriormente resumido no Capítulo 4. Reserva-se para a subseção 3.2, uma revisão bibliográfica sobre as equações termodinâmicas empregadas para a consideração de não idealidade das soluções na modelagem do equilíbrio de adsorção. A subseção 3.3 resume as principais conclusões obtidas com esta revisão bibliográfica. Já a subseção 3.4 traz uma revisão bibliográfica sobre os métodos experimentais e dados experimentais necessários para a modelagem da curva de eluição cromatográfica e fornece uma justificativa sobre os experimentos que foram realizados no decorrer desta pesquisa de tese.

3.1 Revisão bibliográfica da modelagem matemática de sistemas cromatográficos e formulação do modelo adotado

Diversos modelos matemáticos foram desenvolvidos desde o final da década de 1930 e início da década de 1940 para a representação do comportamento de colunas de cromatografia (WILSON, 1940) (DE VAULT, 1943) (MARTIN e SYNGE, 1941) (JAMES e MARTIN, 1952).

Martin e Synge (1941) foram os primeiros a relacionar os modelos de colunas de

destilação com colunas cromatográficas. O modelo considera que a coluna é formada por um número de pratos teóricos onde a concentração de soluto na fase móvel está em equilíbrio com a concentração de soluto na fase estacionária. As hipóteses desse modelo são: ausência de difusão no interior da coluna e equilíbrio local e linear entre a concentração de soluto na fase móvel e na fase estacionária (hipótese válida apenas para soluções diluídas). Para contornar a limitação da hipótese da difusão, propõe-se uma relação entre a altura do prato teórico, a vazão da fase móvel e o diâmetro da partícula da fase estacionária.

Na década seguinte, Lapidus e Amundson (1952) modelaram uma coluna cromatográfica considerando a transferência de massa no interior da coluna. Quando se considerou equilíbrio local instantâneo e linear na descrição da taxa de acúmulo na fase sólida (equação da continuidade), o resultado obtido foi bastante semelhante ao de Martin e Synge (1941).

Com o passar dos anos, muitos autores melhoraram a representação do comportamento com diferentes graus de complexidade. Vários foram os que desenvolveram a modelagem focando em problemas típicos de separações cromatográficas de proteínas (YAMAMOTO *et al.*, 1983) (GU, 1995) (WIBLIN *et al.*, 1995) (CHANG e LENHOFF, 1998) (HUNTER, 2002) (FREDERIKSEN, 2004) (YAMAMOTO, 2005) (BONOMO, 2005) (AL-JIBBOURI, 2006) (SHENE *et al.*, 2006) (KALTENBRUNNER *et al.*, 2007) (MOLLERUP *et al.*, 2007) (ORELLANA *et al.*, 2009) (GUÉLAT *et al.*, 2010) (EL-SAYED, 2010).

Shene e colaboradores (2006) compararam a utilização das duas formas de modelagem da coluna cromatográfica (modelo de pratos e descrição das equações de transporte) para um sistema composto de uma mistura de proteínas (α -lactoalbumina, ovalbumina e β -lactoglobulina) separada em coluna de troca iônica. O desvio máximo obtido em unidades de absorvância foi de 0,0189 unidades para o modelo de pratos e de 0,0252 unidades para o modelo de transferência de massa. Eles concluíram que os desvios obtidos por ambos os métodos eram da mesma ordem de magnitude. Entretanto, afirmam que para concentrações maiores de proteínas que as utilizadas no trabalho, o modelo de pratos forneceria picos menos confiáveis.

Devido às limitações do modelo de pratos em relação à modelagem do equilíbrio (considera equilíbrio linear), e possíveis distorções quando as soluções não são diluídas, optou-se por trabalhar com a modelagem completa do balanço de massa do sistema e

consideração de diversos mecanismos de transferência de massa.

3.1.1 Balanços de Massa

O modelo de transporte mais completo para descrição do comportamento cromatográfico de proteínas é o modelo de taxa geral (*general rate model*) que consiste de equações que descrevem o transporte convectivo e dispersivo (na coluna e no nível das partículas adsorventes), as resistências à transferência de massa (na coluna e no nível da partícula adsorventes) e equações que descrevem a cinética de adsorção. Entretanto, devido a sua complexidade, diversos autores optam por utilizar modelos com parâmetros agrupados (*lumped rate models*) tais como o modelo de transporte dispersivo (*transport-dispersive model*).

No modelo de taxa geral, para uma cromatografia de fluxo axial, o modelo de transporte pode ser dividido em quatro mecanismos, conforme ilustrado na Figura 3.1: (i) dispersão axial; (ii) transferência de massa no filme extrapartícula; (iii) difusão intraparticular (no poro e na superfície da partícula); (iv) equilíbrio de adsorção (MIYABE e GUIOCHON, 2003).

Diversos modelos simplificados foram desenvolvidos para partículas não porosas para as quais o mecanismo de difusão intrapartícula é negligenciável (LIAPIS *et al.*, 1989) (MAO *et al.*, 1991). Frequentemente, considera-se apenas o fenômeno de dispersão axial (GUIOCHON *et al.*, 1994) (MIGLIORINI *et al.*, 1999) (SCHRAMM *et al.*, 2003). Esse modelo, comumente chamado de "*equilíbrio dispersivo*" é válido quando a eficiência da coluna é alta, como na Cromatografia Líquida de Fase Reversa (CLFR) de pequenas moléculas de polaridade moderada. Muitos estudos que tiveram como foco o fenômeno de difusão na superfície, trataram de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) lidando apenas com moléculas pequenas relativamente rígidas (MIYABE e GUIOCHON, 1999) (MIYABE e GUIOCHON, 2003). Entretanto, proteínas são moléculas grandes, anfóteras, com conformação dependente do meio que a circunda e possuem pequeno coeficiente de difusão o que torna a resistência à transferência de massa significativa, não podendo ser negligenciada (FREDERIKSEN, 2004) (YU *et al.*, 2015).

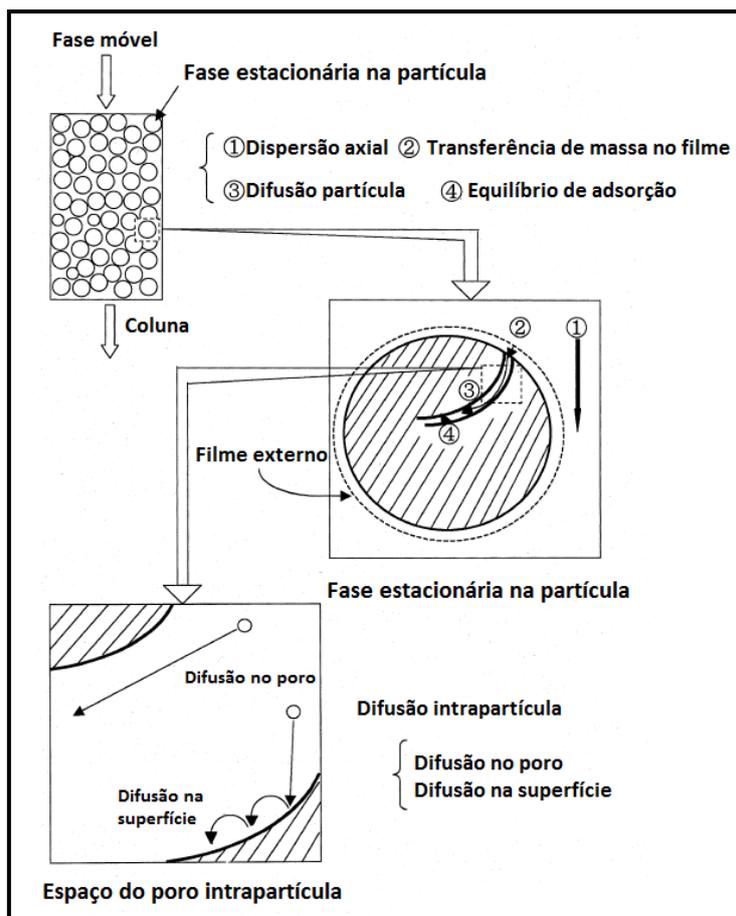


Figura 3.1: Representação esquemática dos mecanismos de transferência de massa na coluna cromatográfica.

Fonte: Adaptado de Miyabe e Guiochon (1999)

A difusão intrapartícula não é simples de ser modelada devido à complexidade da mistura de fenômenos envolvidos (CHANG e LENHOFF, 1998) (YU *et al.*, 2015). Dentre os modelos que partem da modelagem do balanço de massa do sistema contendo partículas porosas (caso típico das resinas cromatográficas utilizadas para separação de biomoléculas) há aqueles que consideram apenas uma etapa limitante (mecanismo de interação, de difusão no poro, ou de difusão no filme), como os trabalhos de Chase (1984), Arnold e colaboradores (1985), Liapis e colaboradores (1989), Skidmore e colaboradores (1990), Mao e colaboradores (1991) e Finette e colaboradores (1998). Mas também há trabalhos que consideram três mecanismos simultaneamente (difusão no poro, difusão no filme intrapartícula e interação entre adsorvato e adsorvente), como os trabalhos de Arve e Liapis (1987) (1988) e Chen e colaboradores (2002).

Nesta pesquisa de doutorado, foi utilizada uma abordagem com parâmetros agrupados (*lumped transport-dispersive*) e as hipóteses gerais adotadas para

equacionamento do balanço de massa na coluna cromatográfica são as seguintes:

- i. processo isotérmico;
- ii. fluido incompressível;
- iii. escoamento permanente, uniforme e empistonado;
- iv. distribuição de tamanho de partículas da resina cromatográfica unimodal com monodispersão;
- v. grupos funcionais da resina adsorvente uniformemente distribuídos na superfície interior das partículas;
- vi. a velocidade intersticial e a difusividade não são dependentes das coordenadas axial e radial, nem do tempo;
- vii. a difusão das proteínas e do sal ocorre de forma independente;
- viii. gradiente de concentração na direção radial desprezível;
- ix. fluido estagnado no interior das partículas; e
- x. equilíbrio local instantâneo entre o grupo funcional da resina e o fluido estagnado.

Chang e Lenhoff (1998) realizaram cálculos comparativos incorporando a informação completa de distribuição de tamanho de partículas, mas os resultados não apresentam melhoria significativa à hipótese de distribuição unimodal com baixa dispersão e sugerem que não seja incorporado o cálculo completo a fim de promover uma economia computacional.

Helferich (1995) afirma que em colunas de troca iônica a etapa limitante do processo é a difusão de forma que a cinética de adsorção/dessorção pode ser desprezada, podendo ser considerado equilíbrio instantâneo.

Tendo como base essas considerações, o balanço de massa por componente pode ser descrito pela Equação 3.1.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \nabla(-D_i \nabla C_i + u_{int} C_i) = T M_i \quad (3.1)$$

Onde: $(-D_i \nabla C_i)$ é o fluxo difusivo; $(u_{int} C_i)$ é o fluxo convectivo; C_i é a concentração

molar do componente i na fase móvel; t é o tempo; D_i é o coeficiente de difusividade do componente i ; u_{int} é a velocidade intersticial; TM_i é a taxa de transferência de massa do componente i da fase móvel para a fase estacionária.

Admitindo que a velocidade intersticial e a difusividade são independentes das coordenadas axial e radial, e que o gradiente de concentração na direção radial é desprezível, tem-se a Equação 3.2 que expressa a dependência da concentração de cada componente em função da coordenada axial e do tempo.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ax,i} \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} - u_{int} \frac{\partial C_i}{\partial x} + \frac{(1 - \varepsilon_b)}{\varepsilon_b} \left[L_c \frac{6}{d_p} k_{ef,i} (C_i - C_{P,i}) \right] \quad (3.2)$$

Onde: $D_{ax,i}$ é a difusividade axial do componente i ; L_c é o comprimento da coluna; ε_b é a porosidade intersticial (porosidade da coluna); $k_{ef,i}$ é o coeficiente de transferência de massa efetivo; d_p é o diâmetro da partícula adsorvente (resina cromatográfica); $C_{P,i}$ é a concentração molar do componente i na fase líquida no interior dos poros.

O primeiro termo do lado direito da Equação 3.2 descreve o transporte dispersivo, o segundo o transporte convectivo através da coluna e o terceiro a transferência de massa dos componentes da coluna para a partícula, sendo representado utilizando-se a teoria de filme.

O balanço de massa por componente microscópico na fase estacionária na partícula é descrito pela Equação 3.3.

$$\varepsilon_p K_d \frac{\partial C_{P,i}}{\partial t} + (1 - \varepsilon_p K_d) \frac{\partial Q_i}{\partial t} = L_c \frac{6}{d_p} k_{ef,i} (C_i - C_{P,i}) \quad (3.3)$$

Onde: ε_p é a porosidade da partícula adsorvente; K_D é o fator de exclusão; Q_i é a concentração de adsorvato na fase sólida dada por uma relação de equilíbrio: $Q_i = f(C_{P,i})$.

Para a simulação do perfil de eluição de uma cromatografia de troca iônica com gradiente de eluição não se deveria considerar apenas a proteína em solução, mas também a presença do sal. Como a molécula de sal é pequena, ela possui um coeficiente de difusão significativamente maior que o da proteína, e, além disso, sua concentração

em solução costuma ser maior que a concentração das proteínas em solução. Devido a isso, pode-se considerar a mesma concentração salina na fase móvel e na fase estagnada no interior do poro ($C_{p,s} = C_s$).

3.1.2 Relação de equilíbrio de adsorção

A relação funcional que correlaciona a concentração de soluto (adsorvato) na fase estagnada no interior dos poros e sua concentração na superfície do adsorvente (fase estacionária) é chamada isoterma de equilíbrio de adsorção.

$$Q_i = f(C_{p,i}) \tag{3.5}$$

Costumeiramente, utilizam-se equações empíricas ou semi empíricas de isoterma de adsorção tais como as isotermas apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Modelos de equilíbrio de adsorção de sistemas multicomponentes

Nome	Equação	Parâmetros
Langmuir multicomponente	$q_i = q^{\max} \frac{b_i c_i}{1 + \sum_{j=1}^{N_{comp}} b_j c_j}$	q^{\max}, b_i
Langmuir-Freundlich	$q_i = q^{\max} \frac{b_i c_i^{n_i}}{1 + \sum_{j=1}^{N_{comp}} b_j c_j^{n_j}}$	q^{\max}, b_i, n_i
Tóth	$q_i = q^{\max} \frac{b_i c_i}{\left(1 + \sum_{j=1}^{N_{comp}} b_j c_j^n\right)^{\frac{1}{n}}}$	q^{\max}, b_i, n
Langmuir multicomponente com modificador	$q_i = q^{\max} \frac{b_{0,i} \exp(-S_i \varphi) c_i}{1 + \sum_{j=1}^{N_{comp}} b_{0,j} \exp(-S_j \varphi) c_j}$	$q^{\max}, b_{0,i}, S_i \varphi$

Fonte: Barreto Jr. (2005)

De forma geral, as isotermas empíricas existentes na literatura não levam em consideração a influência do sal na adsorção das proteínas e suas hipóteses dificilmente se adéquam à adsorção de proteínas (KALTENBRUNNER e JUNGBAUER, 1996).

Para modelos de cromatografia que não sejam por eluição isocrática, a influência do sal precisa ser levada em consideração explicitamente.

O equacionamento rigoroso do equilíbrio de adsorção de proteínas foi primeiramente apresentado por Regnier e colaboradores (KOPACIEWICZ *et al.*, 1983); (ROUNDS e REGNIER, 1984); (REGNIER e MAZSAROFF, 1987) e é uma descrição simples e intuitiva do processo de troca-iônica de uma proteína, sendo designado pelos autores de Modelo de Deslocamento Estequiométrico (*stoichiometric displacement model – SDM*). Nesta abordagem, o equilíbrio de adsorção é descrito como uma reação estequiométrica sendo considerado que a troca-iônica é o único mecanismo de adsorção; toda a capacidade de troca-iônica está disponível para a adsorção da proteína; e as fases móvel e estacionária são consideradas soluções ideais. O modelo funciona satisfatoriamente apenas para baixas concentrações de proteínas.

Em 1992, Brooks e Cramer propuseram um modelo chamado Modelo Estérico de Ação das Massas (*steric mass action model – SMA*) utilizando a estrutura do SDM. Em tal modelo, o impedimento estérico do contra-íon do sal é considerado na ligação da proteína à resina. Em altas concentrações de proteínas o efeito estérico seria o principal limitante para a adsorção. O modelo mostrou-se capaz de prever a adsorção de proteínas em sistemas cromatográficos de troca-iônica em uma ampla faixa de concentração salina (IYER *et al.*, 1999).

Originalmente, consideraram-se soluções ideais, entretanto Mollerup (2006); (2007), Al-Jibbouri (2007) e Mollerup e colaboradores (2007, 2008 e 2011) consideraram a não idealidade da proteína na fase móvel na modelagem de equilíbrio com resinas cromatográficas de interação hidrofóbica e de troca-iônica, sem, contudo, terem utilizado modelos termodinâmicos satisfatórios para o cálculo do coeficiente de atividade.

Mollerup (2006, 2007) afirmou que, em geral, em cromatografia de troca iônica é considerado que ambas as fases (estacionária e estagnada no interior do fluido) possuem aproximadamente a mesma força iônica e que esta poderia ser uma razão não justificável para considerar que as não idealidades são similares em ambas as fases. Para o modelo de cromatografia de troca iônica, considerou-se que todas as contribuições para não idealidade se cancelavam. Para a isoterma de adsorção de interação hidrofóbica considerou-se que todos os coeficientes de atividades, com exceção do coeficiente de atividade da proteína eram unitários ou constantes

(MOLLERUP, 2006, 2007; MOLLERUP *et al.*, 2008). Em seguida, foi utilizada uma função linear da concentração do sal e da proteína para descrever o logaritmo do coeficiente de atividade assimétrico da proteína (Equação 3.6) (MOLLERUP, 2006, 2007). Baseado em dados experimentais de Pedersen e colaboradores (2003) da adsorção de BSA em quatro diferentes resinas de troca aniônica, assim como em dados experimentais de Staby e Mollerup (1996) do coeficiente de partição da lisozima em quatro resinas de interação hidrofóbica, a conclusão foi que a magnitude dos desvios da idealidade depende do sal e da concentração de sal. Adicionalmente, sugeriram que para a melhoria do modelo de troca iônica, o coeficiente de atividade da proteína em solução deveria ser considerado (MOLLERUP, 2006).

$$\ln(\gamma_{ptn}) = K_s C_s + K_{ptn} C_{ptn} \quad (3.6)$$

Al-Jibbouri (2007) comparou o ajuste do volume de retenção da eluição isocrática da BSA em duas resinas de troca aniônica para vários tipos de sal empregando um modelo que negligenciou todos os coeficientes de atividade e outro que descreveu o coeficiente de atividade da proteína na fase móvel como uma função linear da concentração salina (Equação 3.7). Utilizando os dados experimentais de Pedersen (PEDERSEN, 2002; PEDERSEN *et al.*, 2003), verificou-se boa aderência entre os dados experimentais e a correlação proposta apenas quando o coeficiente de atividade da proteína na fase móvel foi levado em consideração.

$$\gamma_{ptn} = vAC_s \quad (3.7)$$

Mollerup e colaboradores (2011) correlacionaram o fator de retenção cromatográfico e a solubilidade da lisozima empregando um modelo de potencial químico derivado da teoria de solução de Kirkwood. O modelo não inclui nenhum parâmetro específico para o tipo de sal e as conclusões dos autores afirmaram que embora o modelo tenha provado ser suficiente para uma correlação adequada, existe espaço para melhorar a teoria.

Li e Pinto (1995) propuseram o modelo de Solução Não Ideal na Superfície (*nonideal surface solution – NISS*) também baseado no SDM. Nele, a fase adsorvida é entendida como uma solução não ideal em equilíbrio com uma solução não ideal do seio da solução. A não idealidade da fase móvel é considerada como sendo devido às interações entre os íons de sal, enquanto a não idealidade da fase estacionária é devido às interações entre moléculas adsorvidas vizinhas. Para os autores, a não idealidade da superfície é o principal fator limitante para a adsorção.

Raje e Pinto (1997) combinaram os modelos SMA e NISS a fim de elucidar qual seria o principal fator limitante para a adsorção, não tendo chegado a uma conclusão geral que pudesse ser estendida a qualquer proteína. Os mesmos autores realizaram um estudo experimental para obter novas informações sobre os efeitos que governam a adsorção de proteínas (RAJE e PINTO, 1998) tendo concluído que o modelo NISS por considerar apenas as não idealidades entálpicas (sem considerar efeitos entrópicos) não consegue prever o equilíbrio de adsorção de BSA e ovoalbumina em uma resina PAE-1000.

Em 1999, Oberholzer e Lenhoff propuseram uma equação de isoterma de adsorção baseada na teoria coloidal de adsorção de proteínas. Chang e Lenhoff (1998) empregaram essa equação para a modelagem de isotermas de adsorção de lisozima em diversas resinas catiônicas.

Xia e colaboradores (2003) modelaram a adsorção de proteínas (lisozima e lecitina) em coluna de interação hidrofóbica através do modelo de interação preferencial desenvolvido por Perkins e colaboradores (1997) acoplado a uma isoterma quadrática não linear (modelo de isoterma polinomial de Langmuir), tendo considerado ambas as fases, estacionária e móvel, ideais.

Kaltenbrunner e colaboradores (2007) modelaram o equilíbrio de adsorção partindo da expressão da reação estequiométrica de troca-iônica, tendo calculado o coeficiente de distribuição por uma relação empírica em função da força iônica do meio. Entretanto, não são apresentados os desvios encontrados no cálculo da curva de eluição em uma cromatografia de troca iônica.

Deitcher e colaboradores (2010) propuseram um modelo de equilíbrio de adsorção de proteínas em resinas de interação hidrofóbica incluindo a água como participante no processo de adsorção. Eles empregaram um modelo linear simples para o coeficiente de atividade das proteínas, mas devido a altos desvios obtidos entre os dados experimentais e os resultados calculados, os autores sugerem que um modelo mais robusto (como o modelo UNIQUAC) seja empregado, e sugerem a adição de um termo do tipo Debye-Hückel para melhorar a correlação dos dados em baixas concentrações salinas.

Percebe-se, portanto, que existe na literatura uma evolução da modelagem do equilíbrio de adsorção, porém não foi encontrado algum trabalho que tenha representado

de forma satisfatória a não idealidade das fases em equilíbrio, sendo este ainda um ponto a ser estudado.

A partir das propostas discutidas na literatura, descreve-se a seguir a base da modelagem do equilíbrio adotada nesta tese. Trata-se de uma modificação do modelo SMA originalmente desenvolvida por Brooks e Cramer (1992) e comumente utilizada para modelagem de cromatografia de troca iônica com gradiente de eluição (GADAM *et al.*, 1993), (IYER *et al.*, 1999) (PEDERSEN *et al.*, 2003); (LADIWALA *et al.*, 2005) (CHAN *et al.*, 2008).

Nesta dedução não são considerados casos de cooperatividade como, por exemplo, no sistema hemoglobina/oxigênio, ou seja, a energia livre de Gibbs padrão não depende do nível de ocupação do adsorvente. Uma descrição do equilíbrio para casos como esse pode ser encontrada em Mollerup (2007).

O equilíbrio da adsorção é descrito pela Equação 3.8 considerando um sistema unifásico com reação química. Proteína e sal competem pelos sítios de ligação disponíveis na resina. A proteína blinda alguns ligantes devido a seu tamanho gerando um impedimento estérico. Considerou-se que fatores que influenciam a estrutura tridimensional das proteínas e o efeito da concentração salina nas interações intermoleculares das proteínas podem ser negligenciados.



O coeficiente estequiométrico v é descrito pela Equação 3.9. A carga de ligação da proteína (z_{ptn}) é menor que sua carga líquida já que apenas parte das cargas superficiais da proteína podem interagir com o ligante imobilizado (MOLLERUP, 2007).

$$v = z_{ptn}/z_s \quad (3.9)$$

Onde: z_s é a carga do contra-íon do sal; z_{ptn} é a carga de ligação da proteína.

Segundo Pedersen e colaboradores (2003), z_{ptn} depende do pH, da proteína e do meio cromatográfico. Já Lim e colaboradores (2005) afirmam que a carga da proteína pode variar com a força iônica do meio devido a efeitos de blindagem do sal e variação do raio efetivo da proteína, conforme representado na Figura 3.2. Originalmente essa hipótese não é prevista no modelo SMA onde a carga da proteína é considerada

constante para diferentes concentrações salinas.

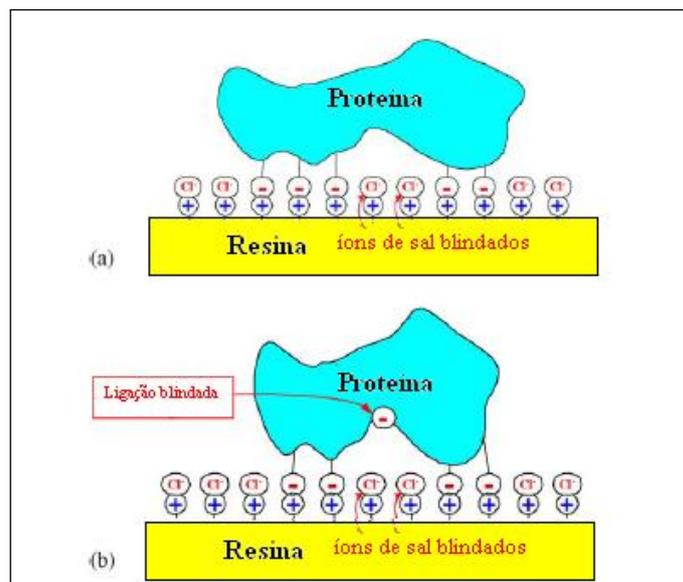


Figura 3.2: Representação esquemática da dependência da carga da proteína efetiva com a força iônica do meio. (a) Impedimento de íons de sal em baixas concentrações salinas. (b) Impedimento de ligação da proteína causada por uma redução no raio efetivo da molécula em maiores concentrações salinas.

Fonte: Adaptado de Lim *et al.* (2005)

Os co-íons não participam da reação de troca-iônica, entretanto influenciam o potencial químico das espécies em solução (MOLLERUP, 2006).

A constante de equilíbrio da reação (K) descrita na Equação 3.8 é definida na Equação 3.10.

$$K = \exp\left(\frac{-\sum_i v_i \mu_i^0}{RT}\right) = \exp\left(\frac{-\Delta G^0}{RT}\right) = \prod_i a_i^{v_i} = \prod_i (\hat{f}_i / f_i^0)^{v_i} \quad (3.10)$$

Onde: μ_i^0 é o potencial químico do componente i em um estado de referência arbitrário; v_i é o coeficiente estequiométrico do componente i ; T é a temperatura do sistema; R é a constante dos gases ideais; ΔG^0 é a diferença na energia livre de Gibbs padrão da reação; a_i é a atividade do componente i ; \hat{f}_i é a fugacidade do componente i na mistura; f_i^0 é a fugacidade do componente i em um estado de referência arbitrário; \prod_i representa o produto sobre todas as espécies i .

A fugacidade, ou a atividade, pode ser relacionada com propriedades mensuráveis como temperatura, pressão e composição. Para isso são necessárias funções auxiliares que dependem dos modelos de idealidade adotados para cada uma

das fases.

No caso de soluções de proteínas, a modelagem da fase líquida é usualmente realizada utilizando uma abordagem que consiste em adotar como estado de referência da fase líquida uma solução líquida ideal. Com isso, define-se o coeficiente de atividade (γ_i) que é a razão entre a atividade de uma espécie i (a_i) e sua composição molar (c_i) (Equação 3.11).

$$\gamma_i = a_i/c_i \tag{3.11}$$

A constante de equilíbrio pode, pois, ser representada pela Equação 3.12.

$$K = \prod_i a_i^{v_i} = \prod_i (\gamma_i c_i)^{v_i} \tag{3.12}$$

Para modelar o equilíbrio de adsorção, são necessários, portanto, equações para o cálculo do coeficiente de atividade. Alguns modelos serão descritos na seção 3.2. É possível encontrar uma descrição detalhada de diversos modelos em (PRAUSNITZ *et al.*, 1999).

Retomando a expressão apresentada na Equação 3.8 e aplicando a Equação 3.12 temos a constante de equilíbrio descrita pelas Equações 3.13 e 3.14.

$$K = \frac{a_{ptn}^{ad}}{a_{ptn}^{sol}} \left(\frac{a_s^{sol}}{a_s^{ad}} \right)^v \tag{3.13}$$

Onde: a_{ptn}^{ad} é a atividade da proteína na fase adsorvida; a_{ptn}^{sol} é a atividade da proteína em solução no interior do poro da partícula; a_s^{sol} é a atividade do sal em solução no interior do poro da partícula; a_s^{ad} é a atividade do sal na fase adsorvida.

$$K = \frac{\gamma_{ptn}^{ad} Q_{ptn}}{\gamma_{ptn} C_{P,ptn}} \left(\frac{\gamma_s C_{P,S}}{\gamma_s^{ad} Q_s} \right)^v \tag{3.14}$$

Onde: γ_{ptn}^{ad} é o coeficiente de atividade da proteína na fase adsorvida em escala de concentração molar; $C_{P,ptn}$ é concentração molar de proteína em solução no interior do poro da partícula; Q_{ptn} é a concentração molar de proteína na fase adsorvida; γ_{ptn} é o coeficiente de atividade da proteína em solução no interior do poro da partícula em

escala de concentração molar; γ_s é o coeficiente de atividade do sal em solução no interior do poro da partícula em escala de concentração molar; $C_{P,S}$ é concentração molar de sal em solução no interior do poro da partícula; γ_s^{ad} é o coeficiente de atividade do sal na fase adsorvida em escala de concentração molar; Q_s é a concentração molar de sal na fase adsorvida; ν é o coeficiente estequiométrico.

Considera-se, por hipótese, que a solução adsorvida é uma solução ideal ($\gamma_{ptn}^{ad} = \gamma_s^{ad} = 1$). Assim, simplifica-se a Equação 3.14 para a Equação 3.15.

$$K = \frac{Q_{ptn}}{\gamma_{ptn} C_{P,ptn}} \left(\frac{\gamma_s C_{P,S}}{Q_s} \right)^\nu \quad (3.15)$$

Segundo o princípio da eletroneutralidade, o somatório das cargas na resina deve ser zero, assim é válida a Equação 3.16.

$$\Lambda z_L = z_s Q_s + (z_{ptn} + \zeta) Q_{ptn} \quad (3.16)$$

Onde: Λ é a densidade do ligante (mol/volume de poro); z_L é a valência do ligante (usualmente unitária); ζ é o fator de impedimento estérico que leva em consideração ligantes inacessíveis, conforme pode ser deduzido da Figura 3.2.

Manipulando a Equação 3.16 é possível substituir Q_s da Equação 3.15 dando origem à Equação 3.17.

$$K = \frac{Q_{ptn}}{\gamma_{ptn} C_{P,ptn}} \left(\frac{\gamma_s C_{P,S} z_s}{\Lambda - (z_{ptn} + \zeta) Q_{ptn}} \right)^\nu \quad (3.17)$$

A capacidade máxima de adsorção (Q_{ptn}^{max}) é dada pela Equação 3.18 que expressa a quantidade máxima de proteína que pode ser adsorvida na resina quando $Q_s = 0$ (MOLLERUP, 2006).

$$Q_{ptn}^{max} = \frac{\Lambda}{(z_{ptn} + \zeta)} \quad (3.18)$$

Substituindo a Equação 3.18 na Equação 3.17 conforme apresentado na Equação 3.19, temos a isoterma de adsorção da Equação 3.20.

$$(3.19)$$

$$\frac{Q_{ptn}}{C_{P,ptn}} = K\gamma_{ptn} \left(\frac{\Lambda - (z_{ptn} + \zeta)Q_{ptn}}{\gamma_s C_{P,S}Z_s} \right)^v = K\gamma_{ptn} \left(\frac{\Lambda}{\gamma_s C_{P,S}Z_s} \right)^v \left(1 - \frac{(z_p + \zeta)Q_{ptn}}{\Lambda} \right)^v$$

$$\frac{Q_{ptn}}{C_{P,ptn}} = K\gamma_{ptn} \left(\frac{\Lambda}{\gamma_s C_{P,S}Z_s} \right)^v \left(1 - \frac{Q_{ptn}}{Q_{ptn}^{max}} \right)^v \quad (3.20)$$

Quando m proteínas adsorvem na resina, o equilíbrio de adsorção pode ser calculado resolvendo as m equações resultantes da Equação 3.21.

$$\frac{Q_m}{C_{P,m}} = K_m \left(\frac{\Lambda}{C_{P,S}Z_s} \right)^{v_m} \frac{\gamma_m}{\gamma_s^{v_m}} \left(1 - \sum_{j=1}^m \frac{Q_j}{Q_j^{max}} \right)^{v_m} \quad (3.21)$$

Caso queira-se simplificar este modelo considerando que os coeficientes estequiométricos são unitários assim como o coeficiente de atividade (solução ideal na fase móvel), a Equação 3.20 resulta na isoterma de Langmuir para um componente (Equação 3.22)

$$Q_{ptn} = Q_{ptn}^{max} \frac{bC_{P,ptn}}{1 + bC_{P,ptn}} \quad (3.22)$$

Manipulando algebricamente a equação é possível obter a Equação 3.23.

$$\frac{Q_{ptn}}{C_{P,ptn}} = bQ_{ptn}^{max} \left(1 - \frac{Q_{ptn}}{Q_{ptn}^{max}} \right) \quad (3.23)$$

Percebe-se que o parâmetro b da isoterma de Langmuir pode ser relacionado com a isoterma da Equação 3.20.

A isoterma de Langmuir para multicomponentes (Equação 3.24) foi estendida a partir da consideração de um componente de forma empírica (GUIOCHON *et al.*, 1994). Fazendo a comparação com a isoterma de Langmuir para multicomponentes com a Equação 3.21, poder-se-ia propor que a forma correta de expansão da isoterma de Langmuir seria dada pela Equação 3.25 (MOLLERUP, 2007).

$$Q_m = Q_m^{max} \frac{b_m C_{P,m}}{1 + \sum_{j=1}^m b_m C_{P,m}} \quad (3.24)$$

$$\frac{Q_m}{C_{P,m}} = b_m Q_m^{max} \left(1 - \sum_{j=1}^m \frac{Q_j}{Q_j^{max}} \right) \quad (3.25)$$

3.2 Revisão bibliográfica da modelagem termodinâmica de sistemas contendo biomoléculas

Conforme pôde ser visto na seção anterior, a simulação do perfil cromatográfico de soluções contendo proteínas envolve a descrição do equilíbrio de adsorção do sistema proteína/resina cromatográfica. Verificou-se a necessidade de modelos adequados que representem a não idealidade das fases em equilíbrio, especialmente da fase líquida.

As abordagens tradicionais de representação do equilíbrio de fases são a abordagem gamma-gamma (utilização do coeficiente de atividade em ambas as fases), a phi-phi (utilização do coeficiente de fugacidade em ambas as fases) e a gamma-phi (utilização do coeficiente de atividade em uma fase e do coeficiente de fugacidade na outra fase). Normalmente, fases líquidas são representadas utilizando o coeficiente de atividade, enquanto fases vapores são representadas empregando o coeficiente de fugacidade. Isso ocorre principalmente devido a atuais limitações dos modelos para representação de cada coeficiente e não por limitações teóricas. Devido a isso, o desenvolvimento do modelo do equilíbrio de adsorção já foi realizado utilizando diretamente o coeficiente de atividade.

Para o cálculo do coeficiente de atividade pode-se utilizar modelos de energia livre de Gibbs em excesso (G^E) que se relacionam com o coeficiente de atividade segundo as expressões das Equações 3.26 e 3.27. A função de Gibbs em excesso depende da temperatura, da pressão e da composição do sistema.

$$\ln \gamma_i = \left[\frac{\partial \left(nG^E / RT \right)}{\partial n_i} \right]_{P,T,n_j} \quad (3.26)$$

$$\frac{G^E}{RT} = \sum_i x_i \ln \gamma_i \quad (3.27)$$

A modelagem termodinâmica do equilíbrio de adsorção vem sendo simplificada na literatura conforme pôde ser visto na seção 3.1.

Para a modelagem do perfil de eluição de albumina sérica bovina (BSA) em uma coluna cromatográfica de troca aniônica, Li e Pinto (1995) consideraram o coeficiente

de atividade da proteína como sendo igual a um justificando que a proteína geralmente encontra-se em soluções diluídas. O coeficiente de atividade do sal na fase móvel foi expresso utilizando a equação desenvolvida por (BROMLEY, 1973) que é uma modificação da Equação de Debye-Hückel (DEBYE e HUCKEL, 1923). O coeficiente de atividade na fase estacionária foi calculado utilizando a equação de Talu e Zwiebel (1986) que depende de dados do calor de adsorção das proteínas.

A fim de prever a retenção de lisozima em colunas cromatográficas de interação hidrofóbica, Staby e Mollerup (1996) utilizaram uma equação de Debye-Hückel modificada para modelar o coeficiente de atividade do sulfato de amônio e uma equação empírica para correlacionar o coeficiente de atividade da lisozima com a força iônica do meio.

Van der Wielen e Rudolph (1999) propuseram um modelo termodinâmico generalizado capaz de identificar princípios quantitativos generalizados na determinação de propriedades termodinâmicas. Esse trabalho foi focado em aminoácidos e pequenos peptídeos para os quais mudanças conformacionais não são significativas. No trabalho posterior do grupo, Ahamed e colaboradores (2006) propuseram a utilização do segundo coeficiente virial (SCV) para modelar ou explicar termodinamicamente um grande número de técnicas de separação incluindo cristalização, precipitação, separação aquosa em duas fases, enovelamento/reenovelamento e agregação. Entretanto, os autores não chegaram a modelar o equilíbrio de adsorção.

Também em 2006, Mollerup (2006) empregou a equação de estado de Van der Waals para calcular o coeficiente de atividade de proteínas ajustando dados de equilíbrio de adsorção de lisozima em resinas de cromatografia de interação hidrofóbica e considerando o coeficiente de atividade do sal igual a um. Foram obtidos resultados de predição de solubilidade da lisozima dentro do erro experimental bem como resultados de coeficiente de retenção de cromatografia de interação hidrofóbica.

Al-Jibbouri (2007) calculou empiricamente o coeficiente de atividade da albumina sérica bovina como uma função linear da concentração salina durante a modelagem do tempo de retenção desta proteína em uma coluna cromatográfica de troca-iônica. Grandes desvios foram obtidos com dados experimentais em pH 8 e 9 e altas concentrações salinas.

Percebe-se, portanto, que não foram explorados na modelagem do equilíbrio de

adsorção modelos termodinâmicos capazes de prever satisfatoriamente o coeficiente de atividade de proteínas e dos sais. Majoritariamente, foram empregados modelos empíricos correlativos onde os parâmetros do modelo do coeficiente de atividade foram ajustados com os próprios dados do equilíbrio de adsorção. Contudo, a literatura contém algumas tentativas de descrição do comportamento de biomoléculas em solução, ainda que na maioria dos casos modelem-se apenas soluções contendo aminoácidos ou peptídeos simples.

Conforme resumido em Costa (1993) é possível perceber uma divisão entre trabalhos publicados até a década de 1940 (cujo objetivo era obter propriedades de soluções contendo aminoácidos) e trabalhos posteriores à década de 1980 onde existe uma clara tentativa de modelar o comportamento das soluções contendo biomoléculas. Existiu, portanto, uma lacuna de tempo onde pouquíssimos trabalhos foram publicados na área e durante o qual o conhecimento termodinâmico foi desenvolvido.

Será apresentada a seguir uma revisão bibliográfica em ordem cronológica de trabalhos que modelaram o comportamento de soluções contendo biomoléculas. Inicialmente, não será dada nenhuma ênfase particular a trabalhos contendo proteínas ou aminoácidos, uma vez que a modelagem de sistemas contendo aminoácidos é a base para a modelagem de sistemas de soluções proteicas.

Os primeiros trabalhos que modelaram o coeficiente de atividade de proteínas foram baseados na expansão do virial (ROSS e MINTON, 1977) (WILLS *et al.*, 1993).

Nass (1988) modelou o coeficiente de atividade de aminoácidos em solução aquosa usando a constante de equilíbrio de reação química. Ela considerou que o coeficiente de atividade é uma contribuição de dois termos devido à reação química e às interações físicas usando a equação de Wilson (WILSON, 1964). A correlação dos dados experimentais foi satisfatória, mas foi estudado apenas um pequeno número de aminoácidos.

Chen e colaboradores (1989) modelaram sistemas contendo aminoácidos e peptídeos considerando duas contribuições no cálculo de G^E . A primeira representa as interações de longo alcance através da equação conhecida como Pitzer-Debye-Hückel (PITZER, 1980). A segunda contribuição relaciona-se com as interações locais tendo sido empregada uma forma modificada da equação NRTL (RENON e PRAUSNITZ, 1968) com dois parâmetros ajustáveis para o par aminoácido/água. Foram encontrados

resultados com erros menores que 2%.

Gupta e Heidemann (1990) modelaram soluções aquosas de aminoácidos com a equação UNIFAC modificada (LARSEN *et al.*, 1987) tendo sido considerado apenas interações de curto alcance. Na média, os resultados podem ser considerados pobres, tanto para correlação como para predição tendo sido encontrados desvios de até 18% (PINHO *et al.*, 1994).

Orella e Kirwan (1991) empregaram as equações de Wilson, NRTL e equação de Margules para modelar a solubilidade de vários aminoácidos. Eles obtiveram péssimos resultados com a equação de Margules e os melhores resultados com a equação de Wilson (erro médio de 15%).

Pinho e colaboradores (1994) utilizaram a equação UNIFAC original (FREDESLUND *et al.*, 1975) combinada com o modelo Debye-Hückel para a modelagem de aminoácidos e pequenos peptídeos em soluções aquosas, tendo definido novos grupos de acordo com o conceito de contribuição de grupos. Eles obtiveram erros médios menores que 6%.

Minton (1995) propuseram uma modelagem baseada em partículas rígidas para descrever o comportamento da pressão osmótica de soluções aquosas de albumina sérica sem, entretanto, correlacionar com modelos de coeficiente de atividade.

Khoshkbarchi e Vera (1996a) propuseram um modelo para o cálculo do coeficiente de atividade em sistemas aquosos eletrolíticos contendo aminoácidos onde o termo de longo alcance foi representado pela equação de Bromley (BROMLEY, 1973) ou a equação K-V (KHOSHKBARCHI e VERA, 1996b) e o termo de curto alcance foi representado pela equação NRTL ou equação de Wilson. Foram obtidos desvios menores que 1% empregando a equação NRTL.

Khoshkbarchi e Vera (1996a) (1997) (1998) desenvolveram um modelo simplificado de perturbação de primeira ordem de esferas rígidas para calcular o coeficiente de atividade de aminoácidos e peptídeos em soluções aquosas contendo eletrólitos. O modelo é preditivo para baixas concentrações de eletrólitos. Os resultados correlativos forneceram desvios de até 7%. Posteriormente, tal modelo foi modificado por Mortazavi-Manesh e colaboradores (2003). Foram consideradas forças de dispersão e dipolo-dipolo entre as biomoléculas, mas foram negligenciadas as interações entre solventes e entre solvente/biomoléculas tendo sido obtidos desvios de até 1,5%.

Agena e colaboradores (1997) (1998) obtiveram resultados preliminares modelando sistemas contendo proteínas com o modelo UNIQUAC original (ABRAMS e PRAUSNITZ, 1975) considerando os sistemas como se fossem binários (proteína + pseudosolvente). Os desvios foram de até 3%. Foi proposta uma correlação para cálculo dos parâmetros estruturais do modelo UNIQUAC que depende apenas da massa molar da proteína em sua forma cristalizada.

Kuramochi e colaboradores (1997) utilizaram o modelo UNIFAC modificado (LARSEN *et al.*, 1987) associado à equação Pitzer-Debye-Hückel (PITZER, 1980) para correlacionar o coeficiente de atividade e o coeficiente osmótico de aminoácidos. Eles criaram novos grupos de acordo com o conceito de contribuição de grupos e obtiveram erros de até 3% para correlação e 6% para predição.

Pradhan e Vera (1998) estudaram o efeito de ácidos e bases na solubilidade de aminoácidos empregando o modelo NRTL para o coeficiente de atividade. Nas faixas extremas de pH o modelo não fornece bons resultados quantitativos.

Liu e colaboradores (1998) propuseram um modelo de perturbação não primitivo para aminoácidos em água considerando interações soluto/soluto, solvente/soluto e solvente/solvente obtendo desvios de até 9%.

Soto e colaboradores (1998) empregaram o modelo proposto anteriormente por Koshbarchi e Vera (1996a) para correlacionar a solubilidade do ácido aminobutírico. Em seguida, os autores utilizaram o modelo NRTL e um modelo de perturbação de esferas rígidas para prever a solubilidade de outros aminoácidos (SOTO *et al.*, 1999). Ambos descreveram satisfatoriamente a solubilidade das soluções aquosas de dois aminoácidos, mas o modelo NRTL mostrou-se melhor para extrapolar o coeficiente de atividade dos aminoácidos em concentrações maiores que a saturação na água pura.

Kim e colaboradores (2001) utilizaram o modelo de Chen e colaboradores no cálculo da solubilidade de dois aminoácidos em um sistema ternário contendo água e metanol (CHEN *et al.*, 1982) (CHEN e EVANS, 1986). Eles obtiveram desvios médios de até 0,9%.

Lin e colaboradores (2001) (2002) propuseram uma nova equação de estado baseada na teoria de solução de McMillan-Mayer capaz de correlacionar e prever a pressão osmótica de soluções aquosas de albumina sérica, lisozima e α -quimiotripsina obtendo desvios de até 20%.

Chang e Bae (2003) propuseram uma equação de estado com base na teoria da perturbação e calcularam a pressão osmótica da lisozima obtendo desvios elevados.

Coutinho e Pessoa (2004) modificaram o modelo revisado UNIQUAC estendido para eletrólitos (REUNI) para predição de coeficientes de atividade de α -quimotripsina em tampão de sulfato de potássio com um número reduzido de parâmetros utilizando o termo entrópico na forma do modelo de Flory-Huggins. Foi encontrada uma boa descrição do coeficiente de atividade em toda a faixa de pH estudada e os parâmetros estimados permitiram predições do comportamento da proteína na região de *salting-out*.

Zhang e colaboradores (2004) e Naik e Bhagwat (2005) modelaram a solubilidade de cinco diferentes proteínas: lisozima, caboxihemoglobina, ovoalbumina, glicose isomerase e concavalina em soluções contendo NaCl através de uma rede neural artificial, tendo obtido desvios médios de até 0,2%.

Xu e colaboradores (2004) utilizaram o modelo de Wilson modificado (XU *et al.*, 2003) para calcular o coeficiente de atividade de diversos aminoácidos obtendo desvios de até 1,4%.

Ferreira e colaboradores (2005) calcularam o coeficiente de atividade de glicina e alanina utilizando o modelo Pitzer-Simonson-Clegg (CLEGG e PITZER, 1992). Qualitativamente conseguiu-se representar a tendência dos dados experimentais.

Shulgin e Ruckenstein (2005) modelaram a solubilidade da lisozima em soluções salinas através da introdução de um parâmetro de blindagem preferencial no equacionamento. Os resultados foram quantitativamente bons para soluções contendo cloreto de sódio, porém apenas qualitativamente satisfatórios para soluções contendo acetato de sódio e cloreto de magnésio.

Pazuki e colaboradores (2005) utilizaram o modelo de Khoshkbarchi e Vera (1998) associado tanto ao modelo de Wilson quanto ao modelo NRTL para calcular o coeficiente de atividade de vários aminoácidos. Posteriormente, Pazuki e colaboradores (2006) desenvolveram uma equação de estado usando a teoria de perturbação para a modelagem de dados de aminoácidos e peptídeos em soluções aquosas. No ano seguinte, foi publicado um trabalho onde empregou-se o modelo de Wilson modificado (ZHAO *et al.*, 2000) na modelagem do coeficiente de atividade de aminoácidos obtendo erros de até 10% (PAZUKI *et al.*, 2007).

Druchok e colaboradores (2006) realizaram uma simulação Monte Carlo e

estudaram o comportamento do coeficiente osmótico de soluções salinas contendo proteínas verificando a ocorrência de dimerização.

Yokozeki (2006) propôs uma equação de estado para modelar a pressão osmótica de diversos sistemas, inclusive proteínas. Foram apresentados resultados ditos satisfatórios para soluções de lisozima e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e BSA e NaCl.

Jin e colaboradores (2006) descreveram através de termodinâmica molecular a pressão osmótica de soluções contendo albumina sérica, lisozima, α -quimiotripsina e imuno-gamma-globulina (IgG). O modelo apresentou resultados satisfatórios apenas para descrição dos sistemas com baixa força iônica e pequena auto-associação.

Pazuki e Nikookar (2006) propuseram uma modificação ao modelo NRTL definindo uma nova fração molecular local para a modelagem do coeficiente de atividade de aminoácidos. Eles obtiveram resultados melhores em comparação com o modelo original conseguindo desvios menores que 1,35% para solubilidade.

Fuchs e colaboradores (2006) modelaram aminoácidos em água e álcool empregando uma equação de estado baseada na equação PC-SAFT (GROSS e SADOWSKI, 2001) (GROSS e SADOWSKI, 2002). Os parâmetros estimados para soluções contendo apenas um solvente foram utilizados para predição de dados de mistura de solventes resultando em boa predição.

Ji e colaboradores (2007) usaram a versão de engenharia de Huang-Radosz da SAFT (HUANG e RADOSZ, 1990) (HUANG e RADOSZ, 1991) para modelar a densidade de soluções aquosas de aminoácidos. Os parâmetros da equação SAFT foram preditos utilizando dados de propriedades críticas e temperatura normal de ebulição. Baseados em resultados de sistemas binários, a densidade de sistemas multicomponentes foi calculada com alta acurácia.

Sadeghi (2007) utilizou uma equação de Wilson modificada para a representação do equilíbrio de fases de soluções aquosas de aminoácidos obtendo desvios de até 17%, porém menores que os desvios calculados empregando o modelo NRTL.

Em 2008, Cameretti e Sadowski utilizaram a equação PC-SAFT para modelar a pressão de vapor e solubilidade de aminoácidos e oligopeptídeos, obtendo resultados bastante satisfatórios, porém sem indicar os valores dos desvios.

Ji e Feng (2008) modelaram a solubilidade de aminoácidos com auxílio da

equação SAFT obtendo erros de até 8%.

Ferreira (2008) em sua tese de doutorado mediu e correlacionou a solubilidade dos aminoácidos glicina, DI-alanina, L-serina, L-treonina e L-isoleucina em solventes puros e soluções aquosas contendo alcoóis ou eletrólitos. Para o cálculo do coeficiente de atividade das soluções aquosas de eletrólitos empregou-se o modelo de Debye-Hückel associado a uma expansão de Margules. Já para as soluções contendo álcool, comparou-se os modelos NRTL, UNIQUAC e PC-SAFT. Os resultados obtidos não indicam firmemente qual modelo é o melhor para ser utilizado, ainda que com o modelo NRTL modificado tenha sido possível correlacionar e prever a solubilidade dos aminoácidos com precisão mais elevada.

Alves (2008a) desenvolveu um modelo para coeficientes de atividade de aminoácidos e peptídeos em solução aquosa utilizando uma contribuição do equilíbrio químico, uma contribuição de grupos de UNIFAC e interações de longo alcance de Debye-Huckel. O modelo correlacionou dados experimentais de oito aminoácidos com desvio de 0,9% e efetuou predição dos dados experimentais com desvio menor que 6%.

Tjong e Zhou (2008) calcularam a energia livre de transferência através de simulação de dinâmica molecular para gerar a curva de solubilidade de insulina suína e ribonuclease.

Xue e colaboradores (2008) desenvolveram uma equação de estado baseada na teoria da perturbação e a empregaram para descrição da pressão osmótica de soluções salinas de albumina sérica, lisozima e α -quimiotripsina obtendo desvios de até 20%.

Em 2009 foi proposta uma nova equação de energia livre de Gibbs de excesso para o fenômeno de partição de biomoléculas em soluções aquosas polímero-polímero e polímero-sal e um novo grupo para a contribuição do modelo UNIFAC-FV para solução aquosa de biomoléculas (PAZUKI *et al.*, 2009). Obtiveram-se resultados melhores do que aqueles utilizando o modelo UNIQUAC. Também foi empregada a equação SAFT (JI *et al.*, 2009) e a PC-SAFT (FERREIRA *et al.*, 2009) na modelagem da solubilidade de aminoácidos com erros médios de 0,3 % para correlação e 0,7% para predição.

Tseng e colaboradores (2009) investigaram a solubilidade de aminoácidos em vários valores de pH utilizando o modelo NRTL para o coeficiente de atividade obtendo resultados bastante satisfatórios.

Daldrup e colaboradores (2010) mediram a solubilidade binária de alguns

aminoácidos e realizaram a modelagem empregando o modelo PC-SAFT. Obtiveram-se desvios médios de 3,34% na predição da solubilidade de misturas aquosas de três aminoácidos

Seyfi e colaboradores (2009) modificaram a equação de estado SAFT e a utilizaram para prever a solubilidade de aminoácidos em soluções aquosas e soluções aquosas com eletrólitos, em função do pH e da temperatura obtendo desvios menores que 1%.

Franco e Pessoa Filho (2011) buscaram descrever a curva de solubilidade de proteínas (insulina suína e β -lactoglobulina) em função do pH nas proximidades do ponto isoelétrico considerando válida a lei de Henry. Obtiveram-se desvios compatíveis com o erro experimental dos dados.

Held e colaboradores (2011) utilizaram a equação PC-SAFT para descrição da solubilidade e do coeficiente osmótico de diversos aminoácidos e peptídeos em solução aquosa (inclusive contendo dois aminoácidos). Os autores obtiveram desvios de 3,45% na solubilidade.

Bretti e colaboradores (2012) obtiveram dados de solubilidade de DL-tirosina e DL-triptofano e correlacionaram os dados utilizando no modelo para o cálculo de solubilidade a equação de coeficiente de atividade de Long e McDevit (1952).

Franco e colaboradores (2013) propuseram um modelo para descrição da solubilidade de aminoácidos e compostos β -lactâmicos como função do pH tendo por base o modelo de Pessoa Filho e Maurer (2008) para soluções polieletrólíticas. Foram obtidos desvios menores que 10%.

Em 2014, Held e colaboradores utilizaram a equação ePC-SAFT (CAMERETTI e SADOWSKI, 2008) obtendo parâmetros para os eletrólitos e para os aminoácidos L-alanina, DL-alanina, L-valina, DL-valina e L-prolina. Os erros encontrados foram de 3,7% para predição do coeficiente osmótico e 9,3% para predição da solubilidade.

3.2.1 Conclusões parciais da revisão bibliográfica

Mediante a revisão bibliográfica realizada pode-se apresentar observações importantes e a motivação para esta tese.

Foram encontrados 36 trabalhos que realizam a modelagem de sistemas contendo aminoácidos e peptídeos e 18 trabalhos que lidam com a modelagem de sistemas contendo proteínas. A maior parte dos estudos é baseada em forças potenciais ou equações de estado com potencial de interação de esferas duras (Perturbação, Lattice, SAFT). Em poucas pesquisas empregaram-se modelos de energia livre de Gibbs de excesso (NRTL, UNIQUAC, UNIFAC, Wilson).

A Tabela 3.2 traz um resumo da revisão bibliográfica apresentada, onde são destacados em azul os trabalhos que calcularam coeficientes de atividade de proteínas e servirão de base para o desenvolvimento da modelagem termodinâmica desta proposta de tese e em laranja trabalhos que calcularam o coeficiente de atividade de aminoácidos.

Tabela 3.2 – Resumo da revisão bibliográfica dos modelos termodinâmicos empregados na literatura para representar sistemas contendo biomoléculas.

Autores	Parâmetro investigado	Biomolécula	Modelo empregado	Equação
(ROSS e MINTON, 1977)	Pressão osmótica	Hemoglobina	Equação de estado	Expansão virial
(NASS, 1988)	Solubilidade	Aminoácidos	Coeficiente de atividade	Wilson + consideração de reação química
(CHEN et al., 1989)	Solubilidade	Aminoácidos	Coeficiente de atividade	NRTL + Pitzer-Debye-Hückel
(GUPTA e HEIDEMANN, 1990)	Coeficiente de atividade/solubilidade	Aminoácidos	Coeficiente de atividade	UNIFAC modificado
(ORELLA e KIRWAN, 1991)	Solubilidade	Aminoácidos	Coeficiente de atividade	Wilson
(WILLS et al., 1993)	Atividade	Ribonuclease, α -quimiotripsina e quimiotripsinogênio A	Equação de estado	Expansão virial
(PINHO et al., 1994)	Coeficiente de atividade /solubilidade	Aminoácidos	Coeficiente de atividade	UNIFAC original + Debye-Hückel

Tabela 3.2 – Continuação

Autores	Parâmetro investigado	Biomolécula	Modelo empregado	Equação
(MINTON, 1995)	Pressão osmótica	Albumina sérica bovina	Equação de estado	Equação de estado baseada no modelo de perturbação de esferas rígidas
(KHOSHKBARCHI e VERA, 1996a)	Coefficiente de atividade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Modelo de perturbação de esferas rígidas
(AGENA et al., 1997)	Coefficiente de atividade	α -quimiotripsina	Coefficiente de atividade	UNIQUAC original
(AGENA et al., 1998)	Solubilidade	Lisozima e concavalina	Coefficiente de atividade	UNIQUAC original
(KHOSHKBARCHI e VERA, 1998)	Coefficiente de atividade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Modelo de perturbação de esferas rígidas
(PRADHAN e VERA, 1998)	Solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	NRTL
(LIU et al., 1998)	Coefficiente de atividade /solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Modelo de perturbação não-primitivo
(SOTO et al., 1998)	Solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Modelo de Khoshkbarchi e Vera
(SOTO et al., 1999)	Solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	NRTL e modelo de perturbação de esferas rígidas
(KIM et al., 2001)	Solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Modelo de Chen
(LIN et al., 2001)	Pressão osmótica	BSA	Equação de estado	Nova equação de estado baseada na termodinâmica estatística
(LIN et al., 2002)	Pressão osmótica	Lisozima e α -quimiotripsina	Equação de estado	Nova equação de estado baseada na termodinâmica estatística
(MORTAZAVI-MANESH et al., 2003)	Coefficiente de atividade /solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Modelo de perturbação de esferas rígidas

Tabela 3.2 - Continuação

Autores	Parâmetro investigado	Biomolécula	Modelo empregado	Equação
(CHANG e BAE, 2003)	Pressão osmótica	Lisozima	Equação de estado	Novo modelo de termodinâmica estatística
(COUTINHO e PESSOA, 2004)	Coefficiente de atividade	α -quimiotripsina	Coefficiente de atividade	UNIQUAC estendido modificado (REUNI)
(ZHANG et al., 2004)	Solubilidade	Lisozima	Rede neural	Rede neural
(XU et al., 2004)	Coefficiente de atividade/solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Wilson modificado
(FERREIRA et al., 2005)	Coefficiente de atividade/solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Pitzer-Simonson-Clegg
(NAIK e BHAGWAT, 2005)	Solubilidade	Caboxihemoglobina, ovalbumina, glicose isomerase e concavalina	Rede neural	Rede neural
(SHULGIN e RUCKENSTEIN, 2005)	Solubilidade	Lisozima	Equação de estado	Utilização de um parâmetro de blindagem preferencial
(PAZUKI et al., 2005)	Coefficiente de atividade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Khoshkbarchi e Vera + NRTL ou Wilson
(DRUCHOK et al., 2006)	Coefficiente osmótico	Lisozima, albumina sérica	Equação de estado	Simulação Monte Carlo
(YOKOZEKI, 2006)	Pressão osmótica	Albumina sérica e lisozima	Equação de estado	Nova equação de estado
(PAZUKI et al., 2006)	Coefficiente de atividade /solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Modelo de perturbação de esferas rígidas
(JIN et al., 2006)	Pressão osmótica	Albumina sérica, lisozima, α -quimiotripsina e imuno-gamma-globulina (IgG)	Equação de estado	Equação de estado baseada no modelo de perturbação de esferas rígidas

Tabela 3.2 - Continuação

Autores	Parâmetro investigado	Biomolécula	Modelo empregado	Equação
(PAZUKI e NIKOOKAR, 2006)	Coefficiente de atividade /solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	NRTL modificado
(FUCHS et al., 2006)	Solubilidade	Aminoácidos	Equação de estado	PC-SAFT
(JI et al., 2007)	Densidade	Aminoácidos	Equação de estado	Huang-Radosz - SAFT
(SADEGHI, 2007)	Coefficiente de atividade/solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Wilson modificado
(PAZUKI et al., 2007)	Coefficiente de atividade /solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Wilson modificado
(FERREIRA, 2008)	Coefficiente de atividade/Solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Debye-Hückel + Margules, NRTL, PC-SAFT, UNIQUAC
(ALVES, 2008a)	Coefficiente de atividade	Aminoácidos/peptídeos	Coefficiente de atividade	UNIFAC+Debye-Huckel
(JI e FENG, 2008)	Solubilidade	Aminoácidos	Equação de estado	SAFT
(CAMERETTI e SADOWSKI, 2008)	Densidade/pressão de vapor	Aminoácidos	Equação de estado	PC-SAFT
(TJONG e ZHOU, 2008)	Solubilidade	Insulina suína e ribonuclease	Equação de estado	Dinâmica molecular
(XUE et al., 2008)	Pressão osmótica	Albumina sérica, lisozima e α -quimiotripsina	Equação de estado	Equação de estado baseada no modelo de perturbação de esferas rígidas
(JI et al., 2009)	Solubilidade	Aminoácidos	Equação de estado	SAFT
(FERREIRA et al., 2009)	Solubilidade/coeficiente osmótico	Aminoácidos	Equação de estado	PC-SAFT
(PAZUKI et al., 2009)	Solubilidade/coeficiente de partição	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	Novo modelo de contribuição de grupos
(TSENG et al., 2009)	Solubilidade	Aminoácidos	Coefficiente de atividade	NRTL

Tabela 3.2 - Continuação

Autores	Parâmetro investigado	Biomolécula	Modelo empregado	Equação
(SEYFI et al., 2009)	Solubilidade	Aminoácidos	Equação de estado	RP-SAFT
(DALDRUP et al., 2010)	Solubilidade	Aminoácidos	Equação de estado	PC-SAFT
(FRANCO e PESSOA FILHO, 2011)	Solubilidade	Insulina suína e β -lactoglobulina	-	Nova equação para cálculo de solubilidade
(HELD et al., 2011)	Solubilidade e Coeficiente osmótico	Aminoácidos e peptídeos	Equação de estado	SAFT
(BRETTI et al., 2012)	Solubilidade	Aminoácidos	Coeficiente de atividade	Long and McDevit (1952)
(FRANCO et al., 2013)	Solubilidade	Aminoácidos	Coeficiente de atividade	Equação de Pitzer estendida
(HELD et al., 2014)	Solubilidade e Coeficiente osmótico	Aminoácidos	Equação de estado	e-PC-SAFT

Na parte teórica citada, grande parte dos modelos presentes na literatura foi utilizada para modelar sistemas contendo apenas aminoácidos. Os sistemas contendo proteínas foram, em geral, modelados utilizando modelos de estrutura complexa que possuem uma grande quantidade de parâmetros a serem determinados, sendo aplicados somente em faixas estreitas das condições experimentais. Além disso, a maioria desses modelos não apresenta característica preditiva o que dificulta a aplicação pretendida em programas de síntese de fluxogramas de bioprocessos.

Apenas três trabalhos investigam o coeficiente de atividade de proteínas tendo utilizado o modelo UNIQUAC original e o modelo UNIQUAC estendido para eletrólitos modificado (REUNI). O modelo preditivo UNIFAC foi investigado em três trabalhos sempre para soluções de aminoácidos. Percebe-se, portanto, que ainda existe uma lacuna em relação aos modelos de G^E para o cálculo do coeficiente de atividade de proteínas, especialmente no que se refere a modelos preditivos.

O Apêndice E contém uma revisão breve sobre o uso dos modelos de G^E em sistemas contendo biomoléculas.

3.3 Conclusões parciais da modelagem matemática

Nas seções anteriores foi apresentada a dedução matemática empregada como base teórica nesta tese de doutorado. A curva de eluição cromatográfica de soluções contendo proteínas puras e misturas com duas proteínas será simulada a partir de um modelo de transporte na coluna cromatográfica. Para isso são necessários dados de transferência de massa no interior da coluna (calculados a partir de correlações empíricas), bem como dados do equilíbrio de adsorção das proteínas com a resina cromatográfica.

A modelagem do equilíbrio de adsorção será realizada a partir de uma abordagem pouco encontrada na literatura que considera a não idealidade da fase móvel. A literatura não modela de forma satisfatória, com modelos termodinâmicos bem estabelecidos, o coeficiente de atividade de proteínas e do sal em solução quando realiza o equacionamento do equilíbrio de adsorção de proteínas em resinas cromatográficas. Na maior parte dos trabalhos, apesar da dedução formal do equilíbrio termodinâmico, a solução contendo proteínas e sal foi considerada ideal (coeficiente de atividade das proteínas e do sal em solução foram considerados como sendo igual à unidade), ou os coeficientes de atividade foram estimados como um parâmetro a partir de medidas experimentais de adsorção ou cromatografia, ou ainda, foram utilizadas correlações empíricas para a modelagem do coeficiente de atividade.

3.4 Revisão bibliográfica - Dados experimentais

3.4.1 Dados experimentais para modelagem da isoterma de adsorção e curva de eluição

Existem diversos métodos experimentais na literatura capazes de fornecer dados para isoterma de adsorção, podendo ser classificados em métodos estáticos (banho finito e método da adsorção/dessorção) e métodos dinâmicos (análise frontal, eluição por pontos característicos, análise frontal por pontos característicos, método de pulsos ou perturbações e método inverso). Uma breve descrição de cada método pode ser

encontrada em Severo Jr. (2011).

Os métodos estáticos são aqueles onde se analisa a concentração do composto de interesse após o sistema atingir o equilíbrio. Gritti e Guiochon (2005) afirmam que tais métodos possuem como desvantagem serem muito dispendiosos, usualmente consumirem maior tempo, e em diversas circunstâncias não serem tão precisos quanto os métodos dinâmicos. Por outro lado, o método dinâmico de análise frontal, por exemplo, possui como desvantagem utilizar grande quantidade de reagente e não ser adequado para misturas ternárias ou de mais componentes (SEVERO JR., 2011).

Os estudos termodinâmicos e cinéticos em colunas cromatográficas normalmente estão focados no estudo do comportamento de materiais adsorventes com diferentes tamanhos de partículas e poros (SHUKLA *et al.*, 1998) (AVCI *et al.*, 2000) (STABY *et al.*, 2000) (STABY *et al.*, 2007). Além disso, também costumam ser estudados os efeitos de parâmetros de adsorção como: constante de dissociação, constante de taxa cinética e quantidade de adsorvente (FINETTE *et al.*, 1998).

Algumas vezes, os estudos de adsorção de proteínas em resinas cromatográficas são realizados através de experimentos utilizando métodos dinâmicos (como por exemplo em Avci e colaboradores (2000) e Osberghaus e colaboradores (2012)) onde são avaliados efeitos de temperatura, concentração de injeção, tamanho da coluna e diâmetro da coluna. Entretanto, a maior parte dos experimentos é realizada através do método do banho finito (SHUKLA *et al.*, 1998) (UBIERA e CARTA, 2006).

A Tabela 3.3 apresenta os sistemas que puderam ter os dados extraídos dos artigos. Foram selecionados apenas artigos que citavam dados experimentais das proteínas estudadas nesta tese em resinas comerciais comumente empregadas. Foram ressaltados de azul os trabalhos que utilizam a mesma resina cromatográfica utilizada nesta tese. Como pode ser verificado, todos utilizaram a resina de troca catiônica SP Sepharose FF. Não foram encontrados trabalhos publicados na literatura com as demais resinas utilizadas na parte experimental desta tese.

Dentre estes, muitos realizam os experimentos de isoterma, porém não citam a temperatura em que o experimento foi realizado, ou apenas colocam uma observação que o experimento foi conduzido em temperatura ambiente. Isso porque, os estudos não se destinavam a fornecer os dados de equilíbrio, nem estudar o comportamento do equilíbrio.

Adicionalmente, ressalta-se que todos os artigos citados trazem os dados de equilíbrio de adsorção no formato de gráficos, não fornecendo a informação em tabelas. A fim de obter os pontos experimentais para utilizar na modelagem tais dados perdem precisão. Os estudos de casos que serão apresentados no Capítulos 6 utilizam os dados experimentais obtidos com o auxílio do *software* Pega Ponto (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Por fim, observa-se que os trabalhos apresentados realizam a modelagem da isoterma de adsorção empregando equações empíricas ou empregando uma abordagem baseada no equilíbrio da reação, porém com considerações distintas das apresentadas nesta proposta de tese. Os resultados da modelagem são ditos satisfatórios pelos autores, porém não são apresentados valores de desvio, erro experimental ou erro paramétrico de forma que posteriormente possam-se comparar os resultados obtidos na tese com os apresentados na literatura.

Tabela 3.3 – Dados experimentais de isoterma de adsorção de proteínas

Referência dos dados	Proteína	Coluna	Resina	Tipo de experimento	Temp (°C)	Sal	pH
(LI e PINTO, 1995)	BSA	Anionica	Matrex PAE-1000	Banho finito	6,1-35,5	NaCl (0,15M e 0,4M)	7,0
(TAO <i>et al.</i> , 1997)	BSA	Anionica	CM-Sephadex C-50 / DEAE-Sephadex A-25	Banho finito	25 / 20	-	3,6-9,2
(RAJE e PINTO, 1998)	BSA; ovalbumina	Anionica/Catiônica	Matrex PAE-1000	Banho finito	30	NaCl- (100mM / 200mM)	7,0
(BOWEN <i>et al.</i> , 1998)	BSA	Anionica	Whatman QA52	Banho finito	25±0.2	NaCl (0M – 0,06M)	5,6; 6,3; 6,8; 7,6; 9,0; 9,8

Tabela 3.3 – Continuação

Referência dos dados	Proteína	Coluna	Resina	Tipo de experimento	Temp (°C)	Sal	pH
(CHANG e LENHOFF, 1998)	Lisozima	Catiônica	Toyopearl SP650C; Toyopearl SP550C; SP Sepharose FF; Fractogel EMD SO 650M ; Bakerbond Carboxy-Sulfone; SP Spherodex M	Banho finito	Temp ambiente (~25)	NaCl (0,1M e 0,2M)	7,0
(AVCI <i>et al.</i> , 2000)	BSA	Anionica	Whatman DE52	Método dinâmico	6 e 25	-	8,3
(CONDER e HAYEK, 2000)	BSA	Aniônica e Interação hidrofóbica	Meio preparado (PEI/propil)	Banho finito	25	NaCl (3, 5, 10 g/L) / (NH ₄) ₂ SO ₄ (1M)	7,5 / 7,0
(LAN <i>et al.</i> , 2001)	BSA	Anionica	Diaion HPA25	Banho finito	25	NaCl (0M-0,05M)	7,0
(CHEN <i>et al.</i> , 2002)	BSA e γ -globulina	Anionica	DEAE Spherodex M	Banho finito	25	NaCl (0,05M)	7,6
(CHEN e SUN, 2003)	BSA	Interação hidrofóbica	Phenyl Sepharose FF LS ; Phenyl Sepharose FF HS	Banho finito	25	NaCl (0,9; 1,8M; 2,4M)	7,5
(DIAS-CABRAL <i>et al.</i> , 2003)	BSA	Interação hidrofóbica	PPG– Sepharose CL-6B	Banho finito	25, 30, 35	(NH ₄) ₂ SO ₄ e Na ₂ SO ₄ (1,0; 1,2M e 1,5M)	

Tabela 3.3 – Continuação

Referência dos dados	Proteína	Tipo de coluna	Resina	Tipo de dado	Temp (°C)	Sal	pH
(HUBBUCH <i>et al.</i> , 2003)	BSAe IgG 2a	Catiônica	SP Sepharose FF; SP Sepharose XL	Banho finito	Temp ambiente (~25)	-	4,5 e 5,0
(YAO <i>et al.</i> , 2003)	Lisozima	Catiônica	CM Sepharose FF	Banho finito	20; 25; 30	-	8,0
(XIA <i>et al.</i> , 2003)	Lisozima e lectina	Interação hidrofóbica	Resina phenyl 650M	Análise frontal	Temp ambiente (~25)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,7M a 1,4M)	7,0
(DIAS- CABRAL <i>et al.</i> , 2005)	BSA	Interação hidrofóbica	PPG- Sepharose CL-6B	Banho finito	15, 23, 30, 35	(NH ₄) ₂ SO ₄ , (1,0; 1,2 M, 1,4M e 1,5M)	7,0
(MARTIN <i>et al.</i> , 2005)	Lisozima e citocromo c (mistura binária)	Catiônica	SP Sepharose- FF	Banho finito	23±2	10mM Na ₂ HPO ₄	6,5
(CARTA <i>et al.</i> , 2005)	Lisozima	Catiônica	SP Sepharose- FF	Banho finito	Temp ambiente (~25)	Na+ (20; 50; 120 mM)	6,5
(GARCIA ROJAS <i>et al.</i> , 2006)	Albumina, conalbumina, lisozima	Interação hidrofóbica	Streamline Pheny	Banho finito	25	NaCl (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0M), Na ₂ SO ₄ e (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,0; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0M)	7,0

Tabela 3.3 – Continuação

Referência dos dados	Proteína	Tipo de coluna	Resina	Tipo de dado	Temp (°C)	Sal	pH
(STONE e CARTA, 2007)	Lisozima	Catiônica	SP-X-S6B-L; SP-X-S6B-H; SP-T10-X-S6B; SP-T40-X-S6B	Banho finito	Temp ambiente (~25)	10mM Na ₂ HPO ₄	6,5
(CHEN e CRAMER, 2007)	Ribonuclease A; tripsinogenio; HAS; lactoglobulina B; lisozima; quimotripsina; protease Carlsberg; lactalbumina; celulase; catalase; lecitina	Interação hidrofóbica	Butyl sepharose; Phenyl Sepharose 6 FF LS; Phenyl Sepharose 6 FF HS	Banho finito	20	(NH ₄) ₂ SO ₄ , (0,5M – 1,5M)	7,0
(SUSANTO <i>et al.</i> , 2008)	Lisozima	Catiônica	Toyopearl SP-650M	Banho finito	Temp ambiente (~25)	NaCl (0,05M – 0,2M)	7,0
(STONE <i>et al.</i> , 2009)	Lisozima; BSA; IgG	Catiônica	SP-X-S6B-L; SP-X-S6B-H; SP-T10-X-S6B; SP-T40-X-S6B	Banho finito	Temp ambiente (~25)	Na ⁺ (20; 45; 70; 120; 170 mM)	6,5 / 4,75 / 5,0

Tabela 3.3 – Continuação

Referência dos dados	Proteína	Tipo de coluna	Resina	Tipo de dado	Temp (°C)	Sal	pH
(NFOR <i>et al.</i> , 2010)*	BSA, lisozima, ovalbumina, α -quimotripsina, amiloglicosidase	Interação hidrofóbica e troca iônica	PPA	Banho finito	Temp ambiente (~25)	NaCl (0 M, 0.4 M, 0.8 M, 1.2 M, 1.6 M and 2.0 M),	4,5-6,5
			HyperCel; HEA HyperCel; Capto MMC; Capto Adhere				
(TO e LENHOFF, 2011)	BSA; α -lactalbumina; lisozima; ovalbumina	Interação hidrofóbica	Phenyl Sepharose FF HS; Phenyl Sepharose FF LS; Phenyl Sepharose HP;	Banho finito	Temp ambiente (~25)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,5m – 2,0m)	7,0
			Toyopearl phenyl 650S; TSK-gel phenyl 5PW; Fractogel EMD phenyl (S); Source 15HE; POROS 20HP2				

* Neste trabalho foram realizadas duplicatas de cada experimento e são fornecidos os valores dos erros dos parâmetros estimados.

3.4.2 Dados experimentais para modelagem do equilíbrio de fases

Diversos autores obtiveram dados experimentais de solubilidade e pressão osmótica de soluções binárias de aminoácidos sendo estes mais fáceis de serem

encontradas na literatura. Por outro lado, dados de soluções contendo proteínas são escassos compreendendo, na maioria dos casos, faixas pequenas de pH e temperatura.

Foram recolhidos dados de pressão osmótica de sistemas contendo proteínas de sete diferentes artigos compreendendo um conjunto de 11 sistemas. Um resumo dos quais pode ser encontrado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Sistemas selecionados para investigação

Referência dos dados	Proteína	Tipo de dado	Temperatura (°C)	Sal	pH
(LU <i>et al.</i> , 2009)	BSA	Pressão osmótica	25	(NH ₄) ₂ SO ₄	4,5-7,4
(YOUSEF <i>et al.</i> , 2002)	Ovalbumina / albumina sérica	Pressão osmótica	25	-	7
(YOUSEF <i>et al.</i> , 2001)	Ovalbumina	Pressão osmótica	25	NaCl	7
(MOON <i>et al.</i> , 2000a)	BSA, Lisozima, BSA/lisozima	Pressão osmótica	25	(NH ₄) ₂ SO ₄	4-8
(MOON <i>et al.</i> , 2000b)	Lisozima	Pressão osmótica	25	(NH ₄) ₂ SO ₄ , (NH ₄) ₂ HPO ₄ , (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	4-8
(WU e PRAUSNITZ, 1999)	BSA	Pressão osmótica	25	NaCl	4,5-7,4
(HAYNES <i>et al.</i> , 1992)	α-quimiotripsina	Pressão osmótica	25	K ₂ SO ₄ / Na ₃ PO ₄	3-12

Em relação ao uso dos dados da literatura para modelagem posterior, serão utilizados todos os sistemas encontrados (contendo albumina sérica, ovalbumina, lisozima e α-quimiotripsina em presença de diversos sais). Os dados podem ser encontrados de forma mais detalhada no Apêndice D, enquanto a modelagem é investigada no Apêndice E.

3.4.3 Conclusões parciais da revisão bibliográfica de dados experimentais

Na parte experimental, verifica-se pelos trabalhos analisados uma escassez de dados experimentais para sistemas multicomponentes, bem como faixas estreitas de pH e concentração salina. Apenas dois trabalhos apresentam dados de sistema binário de proteínas (MOON *et al.*, 2000a) (YOUSEF *et al.*, 2002). Adicionalmente, não foi encontrado nenhum trabalho contendo dados de equilíbrio (solubilidade ou pressão osmótica) de soluções salinas de lisozima com NaCl.

Não foram encontrados dados experimentais de isoterma de adsorção de BSA ou lisozima nas resinas empregadas na parte experimental desta tese para validação dos dados de isoterma de adsorção. Foram encontrados apenas dados de sistemas de Lisozima/SP FF ou da adsorção das proteínas em outras resinas.

Em muito poucos sistemas foram encontrados dados equilíbrio termodinâmico e dados de equilíbrio de adsorção para as mesmas condições de temperatura, pH, tipo de sal e concentração salina. Devido a isso, faz-se necessária a obtenção de dados experimentais de curva de eluição para permitir a validação do sistema.

CAPÍTULO 4

Materiais e Métodos

No presente capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados na realização dos experimentos bem como a metodologia para a modelagem matemática e estimação dos parâmetros dos modelos.

4.1 Definição do sistema a ser estudado

A cromatografia de troca iônica é representada como um estudo de caso modelo devido a sua ampla aplicação como primeiro estágio cromatográfico.

O sistema estudado experimentalmente consiste de uma mistura sintética das proteínas lisozima (HEWL) e albumina de soro bovino (BSA). Tais proteínas são usualmente estudadas na literatura como sistemas modelo e já possuem diversas propriedades descritas (massa molar, ponto isoelétrico etc). A lisozima é uma proteína utilizada como padrão de cromatografia de troca catiônica, enquanto a BSA é utilizada como padrão de cromatografia de troca aniônica. Além disso, a BSA é também utilizada como padrão de alguns métodos de quantificação de proteínas e como auxiliar de proteção para armazenamento de enzimas. Adicionalmente, ambas são de fácil obtenção e baixo custo.

As resinas cromatográficas utilizadas tem como base agarose altamente reticulada, formando macroporos. São comumente utilizadas em aplicações em larga escala devido a seu custo e boa estabilidade.

4.2 Metodologia experimental

4.2.1 Materiais utilizados nos experimentos cromatográficos

Albumina de soro bovina (BSA) e lisozima (HEWL) foram obtidas da Sigma–Aldrich com pureza 98%.

As colunas cromatográficas empregadas foram todas colunas empacotadas da GE Healthcare: HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), HiTrap™ SP FF (1 mL), HiScreen™ Capto™ DEAE (4,7 mL), HiScreen™ Capto™ DEAE (4,7 mL), HiScreen™ SP FF (4,7 mL). As Tabelas 4.1 e 4.2 mostra algumas características das resinas e colunas utilizadas.

Tabela 4.1 – Características das resinas utilizadas nos experimentos

Resina	Capto™ DEAE	Capto™ Q	SP FF
Tipo	Aniônica fraca	Aniônica forte	Catiônica forte
Ligante	Dietilaminoetil	Amina quaternária	Sulfopropil
Matriz	Agarose altamente reticulada com dextrana	Agarose altamente reticulada com dextrana	Agarose 6% reticulada
d_p	90µm	90µm	90µm
A	0,29-0,35 mol Cl ⁻ /L	0,16-0,22 mol Cl ⁻ /L	0,18-0,25 mol H ⁺ /L

Tabela 4.2 – Características das colunas utilizados nos experimentos

Coluna	HiTrap™ Capto™ DEAE	HiTrap™ Capto™ Q	HiTrap™ SP FF	HiScreen™ Capto™ DEAE	HiScreen™ Capto™ Q	HiScreen™ SP FF
L_c	0,025 m	0,025 m	0,025 m	0,10 m	0,10 m	0,10 m
D_c	0,07 m	0,07 m	0,07 m	0,077 m	0,077 m	0,077 m
V_c	0,962 mL	0,962 mL	0,962 mL	4,657mL	4,657mL	4,657mL

O Tampão A (de equilíbrio e lavagem) foi tampão fosfato 20 mM preparado com fosfato dibásico de sódio anidro (VETEC) e fosfato de potássio monobásico (VETEC). O Tampão B também era composto de cloreto de sódio 1M (VETEC). Os tampões foram ajustados para pH 7, filtrados em filtros de membrana Durapore, tipo

HVLP, de 0,45µm de diâmetro (Merck Millipore) e previamente a cada corrida, permaneceram por 20 minutos em banho de ultrassom para reduzir a formação de bolhas. Cada proteína foi dissolvida no Tampão A até a concentração de injeção. Foi utilizada água microfiltrada no preparo de todas as soluções.

4.2.2 Metodologia dos experimentos

A eluição das proteínas foi realizada em cromatógrafo comercial ‘AKTA Purifier UPC 100’ (GE Healthcare). Os conectores e mangueiras utilizados foram os padronizados para o equipamento e todos os parâmetros do sistema cromatográfico foram mantidos constantes. O efluente da coluna foi monitorado a 280 nm e todos os dados foram armazenados. A fim de transformar medidas de absorbância em valores de concentração de saída de proteína, foram elaboradas curvas de calibração para cada proteína utilizando soluções de concentração conhecida. As análises preliminares e a documentação dos cromatogramas foi realizada com o *software* de controle UNICORN.

A coluna foi inicialmente equilibrada com Tampão A por 10 volumes de coluna (CV) e o detector de UV foi zerado. Em seguida foi injetado 500µL de amostra através de amostrador automático com loop de 2,5ml. As amostras foram filtradas com membrana de 0,45µm antes da injeção. A injeção foi seguida de uma etapa de lavagem com Tampão A com duração de 5 CV. Iniciou-se, então, a eluição com gradiente linear de concentração salina utilizando o misturador automático do sistema entre o Tampão A e o Tampão B. O tamanho do gradiente variou dependendo dos experimentos tendo sempre um *delay* de 3 CV ao final. Por fim, a coluna foi lavada com 5 CV de Tampão B e reequilibrada com 5 CV de Tampão A.

A vazão empregada foi de 1 mL/min para as colunas de 1mL e 2,3 mL/min para as colunas de 4,7 mL. Todos os experimentos foram realizados a 25°C ± 1 com a temperatura das soluções controlada por um banho termostático. O cromatógrafo não possui controle de temperatura, porém admitiu-se que o tempo de percurso no sistema era suficientemente rápido para garantir a manutenção da temperatura.

As variáveis manipuladas foram: proteína, concentração inicial de proteína na solução, coluna cromatográfica, tamanho do gradiente e concentração e pH do tampão. O planejamento de experimento foi dividido em quatro etapas (A, B, C, D):

- a. *Variação da concentração inicial de cada proteína com colunas de 1mL, gradiente linear de 10 CV e tampão fosfato 0,02M pH 7.*
 - i. para BSA e lisozima puras foram realizados experimentos com concentração inicial de 0,015 mM, 0,075 mM, 0,150 mM e 0,301 mM.
 - ii. para a mistura BSA + lisozima foram realizados experimentos com concentração inicial de ambas proteínas iguais a 0,301 mM, concentração inicial de uma 0,301mM e de outra 0,150 mM e concentração inicial de uma 0,150mM e da outra 0,075mM.

- b. *Variação do tamanho de coluna com concentração inicial de proteína de 0,301mM, gradiente linear de 10CV e tampão fosfato 0,02M pH7.*
 - i. foram realizados experimentos com colunas de 1mL e colunas de 4,7mL.

- c. *Variação do tampão com concentração inicial de proteína de 0,075mM, colunas de 1mL e gradiente linear de 10CV.*
 - i. foram realizados experimentos utilizando tampão fosfato 0,02M / pH 7, tampão fosfato 0,2M / pH 7 e tampão fosfato 0,02M / pH 8.

- d. *Variação do tamanho do gradiente com duas concentrações de proteína, colunas de 1mL, tampão fosfato 0,02M pH7.*
 - i. foram realizados experimentos com concentrações iniciais de proteína de 0,075mM e 0,301 mM e tamanho de gradiente linear de 5 CV, 10 CV, 30 CV, 60 CV, 80 CV e 100 CV.

A Tabela 4.3 apresenta o resumo do planejamento de experimentos realizado. Cabe ressaltar que uma vez que algumas etapas apresentavam duplicatas de experimentos anteriores, e parte do planejamento inicial não foi realizado, a numeração dos experimentos não é sequencial.

Tabela 4.3 – Planejamento de experimentos – coluna cromatográfica

Exp	Coluna	Proteína	Concentração inicial	Tampão	Tamanho do gradiente	Vazão
A1-A4	HiTrap TM Capto TM DEAE 1 mL	BSA	0,015 mM, 0,075 mM, 0,150 mM, 0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
A5-A8	HiTrap TM Capto TM Q 1 mL	BSA	0,015 mM, 0,075 mM, 0,150 mM, 0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
A9-A10	HiTrap TM SP FF 1 mL	BSA	0,075 mM, 0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
A13-A14	HiTrap TM Capto TM DEAE 1 mL	Lisozima	0,075 mM, 0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
A15-A16	HiTrap TM Capto TM Q 1 mL	Lisozima	0,075 mM, 0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
A17-A20	HiTrap TM SP FF 1 mL	Lisozima	0,015 mM, 0,075 mM, 0,150 mM, 0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)

Tabela 4.3 – Continuação

Exp	Coluna	Proteína	Concentração inicial		Tampão	Tamanho do gradiente	Vazão
A24-A28	HiTrap™ Capto™ DEAE 1 mL	BSA + Lisozima	BSA	Lisozima	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
			0,3mM	0,3mM			
			BSA	Lisozima			
			0,15mM	0,3 mM			
			BSA	Lisozima			
			0,3 mM	0,15mM			
			BSA	Lisozima			
			0,015mM	0,075mM			
			BSA	Lisozima			
			0,075mM	0,015mM			

Tabela 4.3 – Continuação

Exp	Coluna	Proteína	Concentração inicial		Tampão	Tamanho do gradiente	Vazão
A30-A34	HiTrap™ Capto™ Q 1 mL	BSA + Lisozima	BSA	Lisozima	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
			0,3mM	0,3mM			
			BSA	Lisozima			
			0,15mM	0,3 mM			
			BSA	Lisozima			
0,3 mM	0,15mM						
A36-A40	HiTrap™ SP FF 1 mL	BSA + Lisozima	BSA	Lisozima	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
			0,3mM	0,3mM			
			BSA	Lisozima			
			0,15mM	0,3 mM			
			BSA	Lisozima			
0,3 mM	0,15mM						
A36-A40	HiTrap™ SP FF 1 mL	BSA + Lisozima	BSA	Lisozima	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
			0,3mM	0,3mM			
			BSA	Lisozima			
			0,15mM	0,3 mM			
			BSA	Lisozima			
0,3 mM	0,15mM						
A36-A40	HiTrap™ SP FF 1 mL	BSA + Lisozima	BSA	Lisozima	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
			0,3mM	0,3mM			
			BSA	Lisozima			
			0,15mM	0,3 mM			
			BSA	Lisozima			
0,3 mM	0,15mM						
A36-A40	HiTrap™ SP FF 1 mL	BSA + Lisozima	BSA	Lisozima	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
			0,3mM	0,3mM			
			BSA	Lisozima			
			0,15mM	0,3 mM			
			BSA	Lisozima			
0,3 mM	0,15mM						
A36-A40	HiTrap™ SP FF 1 mL	BSA + Lisozima	BSA	Lisozima	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
			0,3mM	0,3mM			
			BSA	Lisozima			
			0,15mM	0,3 mM			
			BSA	Lisozima			
0,3 mM	0,15mM						
A36-A40	HiTrap™ SP FF 1 mL	BSA + Lisozima	BSA	Lisozima	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
			0,3mM	0,3mM			
			BSA	Lisozima			
			0,15mM	0,3 mM			
			BSA	Lisozima			
0,3 mM	0,15mM						

Tabela 4.3 – Continuação

Exp	Coluna	Proteína	Concentração inicial	Tampão	Tamanho do gradiente	Vazão
B2	HiScreen™ Capto™ DEAE /4,7 mL	BSA	0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	2,3 mL/min (0,49 cm/min)
B4	HiScreen™ Capto™ Q / 4,7 mL	BSA	0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	2,3 mL/min (0,49 cm/min)
B6	HiScreen™ SP FF / 4,7 mL	BSA	0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	2,3 mL/min (0,49 cm/min)
B8	HiScreen™ Capto™ DEAE /4,7 mL	Lisozima	0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	2,3 mL/min (0,49 cm/min)
B10	HiScreen™ Capto™ Q / 4,7 mL	Lisozima	0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	2,3 mL/min (0,49 cm/min)
B12	HiScreen™ SP FF / 4,7 mL	Lisozima	0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	2,3 mL/min (0,49 cm/min)
B13	HiScreen™ Capto™ DEAE /4,7 mL	BSA + Lisozima	0,301 mM / 0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	2,3 mL/min (0,49 cm/min)
B14	HiScreen™ Capto™ Q / 4,7 mL	BSA + Lisozima	0,301 mM / 0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	2,3 mL/min (0,49 cm/min)
B15	HiScreen™ SP FF / 4,7 mL	BSA + Lisozima	0,301 mM / 0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	2,3 mL/min (0,49 cm/min)

Tabela 4.3 – Continuação

Exp	Coluna	Proteína	Concentração inicial	Tampão	Tamanho do gradiente	Vazão
C2-C3	HiTrap TM Capto TM DEAE / 1 mL	BSA	0,075 mM	Fosfato 0,2M / pH 7, Fosfato 0,02M / pH 8	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
C6-C7	HiTrap TM Capto TM Q / 1 mL	BSA	0,075 mM	Fosfato 0,2M / pH 7, Fosfato 0,02M / pH 8	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
C10-C11	HiTrap TM SP FF / 1 mL	BSA	0,075 mM	Fosfato 0,2M / pH 7, Fosfato 0,02M / pH 8	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
C18-C19	HiTrap TM Capto TM DEAE / 1 mL	Lisozima	0,075 mM	Fosfato 0,2M / pH 7, Fosfato 0,02M / pH 8	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
C22-C23	HiTrap TM Capto TM Q / 1 mL	Lisozima	0,075 mM	Fosfato 0,2M / pH 7, Fosfato 0,02M / pH 8	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)
C26-C27	HiTrap TM SP FF / 1 mL	Lisozima	0,075 mM	Fosfato 0,2M / pH 7, Fosfato 0,02M / pH 8	10 CV	1 mL / min (1 cm/min)

Tabela 4.3 – Continuação

Experimento	Coluna	Proteína	Concentração inicial	Tampão	Tamanho do gradiente	Vazão
D1/D3-D6	HiTrap TM Capto TM DEAE / 1 mL	BSA	0,075 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	5CV – 30 CV – 60CV – 80CV – 100CV	1 mL / min (1 cm/min)
D8/D10-D13	HiTrap TM Capto TM DEAE / 1 mL	BSA	0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	5CV – 30 CV – 60CV – 80CV – 100CV	1 mL / min (1 cm/min)
D15/D17-D20	HiTrap TM Capto TM Q / 1 mL	BSA	0,075 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	5CV – 30 CV – 60CV – 80CV – 100CV	1 mL / min (1 cm/min)
D22/D24-D27	HiTrap TM Capto TM Q / 1 mL	BSA	0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	5CV – 30 CV – 60CV – 80CV – 100CV	1 mL / min (1 cm/min)
D29/D31-D34	HiTrap TM SP FF / 1 mL	Lisozima	0,075 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	5CV – 30 CV – 60CV – 80CV – 100CV	1 mL / min (1 cm/min)
D36/D38-D41	HiTrap TM SP FF / 1 mL	Lisozima	0,301 mM	Fosfato 0,02M / pH 7	5CV – 30 CV – 60CV – 80CV – 100CV	1 mL / min (1 cm/min)

4.2.3 Metodologia – curva de calibração

Para determinar a curva de calibração da BSA e da lisozima o procedimento anterior foi repetido porém sem a presença de uma coluna. A injeção da amostra ocorreu manualmente até garantir a estabilidade de um platô no perfil cromatográfico. Foram injetadas amostras com diferentes concentrações iniciais de proteína conforme apresentado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Planejamento de experimentos – curva de calibração

Experimento	Proteína	Concentração (g/L)	Experimento	Proteína	Concentração (g/L)
Calib 1	BSA	25	Calib 10	Lisozima	6
Calib 2	BSA	20	Calib 11	Lisozima	5
Calib 3	BSA	15	Calib 12	Lisozima	3
Calib 4	BSA	10	Calib 13	Lisozima	2,5
Calib 5	BSA	7,5	Calib 14	Lisozima	2
Calib 6	BSA	5	Calib 15	Lisozima	1,5
Calib 7	BSA	2,5	Calib 16	Lisozima	1
Calib 8	BSA	1	Calib 17	Lisozima	0,5
Calib 9	BSA	0,5	Calib 18	Lisozima	0,25
			Calib 19	Lisozima	0,15

4.2.4 Metodologia – porosidade

Também foram realizados experimentos para determinar a porosidade intersticial (porosidade da coluna) ε_b e a porosidade da partícula adsorvente (porosidade da resina cromatográfica) ε_p que se relacionam pela Equação 4.1, onde ε_t é a porosidade total.

$$\varepsilon_t = \varepsilon_b + (1 - \varepsilon_b) \varepsilon_p \quad (4.1)$$

A descrição da metodologia, assim como os resultados, pode ser encontrada com mais detalhes no Apêndice B.

A porosidade total é determinada por uma injeção do tipo pulso de 0,75M NaNO₃ em um tampão fosfato contendo 1,0M NaNO₃. O volume de retenção medido é corrigido pelo volume morto para obter o volume total (Equação 5.2). Este volume

morto é o volume de retenção entre o ponto de injeção e o ponto em que a primeira gota de afluente sai da coluna quando o tampão puro é injetado no sistema.

$$V_t = V_R - V_m \quad (4.2)$$

A porosidade total é, então, calculada pela Equação 4.3.

$$\varepsilon_t = V_t/V_{col} \quad (4.3)$$

Pedersen (2002) afirma que a porosidade intersticial é muito difícil de ser determinada em colunas de troca aniônica uma vez que os compostos usualmente empregados nos experimentos adsorvem na coluna influenciando o resultado. Assim, empregou-se um valor típico na literatura para a porosidade intersticial e calculou-se a porosidade da partícula com a Equação 4.4.

$$\varepsilon_p = (\varepsilon_t - \varepsilon_b)/(1 - \varepsilon_b) \quad (4.4)$$

4.3 Metodologia teórica

4.3.1 Simulação do perfil cromatográfico

Foi utilizado o método inverso para obtenção dos parâmetros da isoterma de adsorção através da minimização da diferença entre os perfis de eluição experimentais e os calculados seguindo o disposto em Kaczmariski (2007).

Para possibilitar a implementação computacional das equações 3.1 a 3.3, apresentadas no Capítulo 3, foi necessário modificá-las para variáveis adimensionais apresentadas a seguir.

$$C_{AD,i} = \frac{C_i}{Cf0,i} \quad (4.5)$$

$$C_{p,AD,i} = \frac{C_{p,i}}{Cf0,i} \quad (4.6)$$

$$Q_{AD,i} = \frac{q_i}{Cf0,i} \quad (4.7)$$

$$Z = \frac{x}{L_c} \quad (4.8)$$

$$\tau = \frac{u_{int} t}{L_c} \quad (4.9)$$

Com isso, as Equações 3.2 e 3.3 foram transformadas em variáveis adimensionais na forma das Equações 4.10 e 4.11.

$$\frac{\partial C_{AD,i}}{\partial \tau} - \frac{1}{Bo} \frac{\partial^2 C_{AD,i}}{\partial Z^2} + \frac{\partial C_{AD,i}}{\partial Z} = -\frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \left[K_D \varepsilon_p \frac{\partial C_{p,AD,i}}{\partial \tau} + (1 - K_D \varepsilon_p) \frac{\partial Q_{AD,i}}{\partial \tau} \right] \quad (4.10)$$

$$K_D \varepsilon_p \frac{\partial C_{p,AD,i}}{\partial \tau} + (1 - \varepsilon_p K_D) \frac{\partial Q_{D,i}}{\partial \tau} = St_{ef,i} (C_{AD,i} - C_{p,AD,i}) \quad (4.11)$$

Onde: Bo é o número de Bodenstein (Peclet axial / $Bo(Pe_{ax}) = \frac{u_{int} L_c}{D_{ax,i}}$);

St_{ef} é o número de Stanton ($St_{ef} = \frac{L_c}{u_{int} d_p} k_{ef,i}$).

O número de Bodenstein (Bo) leva em conta os efeitos de dispersão axial enquanto o número de Stanton (St_{ef}) representa um coeficiente de transporte de massa agrupado que leva em conta efeitos de difusão no filme e na superfície.

Segundo Gu e Zheng (1999) essa abordagem de descrição da coluna não é muito sensível aos números adimensionais de transferência de massa, diminuindo, assim, a necessidade de obtenção dos parâmetros experimentalmente. Devido a isso, os parâmetros de transferência de massa foram estimados utilizando correlações da literatura.

O coeficiente de dispersão axial foi estimado pela correlação proposta por Chung e Wen (1968) que é válida para $0,001 < Re < 1000$.

$$D_{ax} = \frac{d_p u_{int} \varepsilon_p}{0,2 + 0,011 Re^{0,48}} \quad (4.12)$$

Onde: Re é o número de Reynolds ($Re = \frac{\rho u_{int} d_p}{\mu}$); ρ é a densidade do fluido; μ é a viscosidade; d_p é o diâmetro da partícula; u_{int} é a velocidade intersticial; ε_p é a porosidade da partícula.

O número de Sherwood foi calculado utilizando a Equação 4.13 proposta por Wakao e colaboradores (1958) e utilizada diversas vezes em modelagem de adoração em geral, e na separação de proteínas.

$$Sh_i = 2,0 + 1,45Sc_i^{1/3}Re^{1/2} \tag{4.13}$$

$$St_{ef,i} = \frac{3}{2} \frac{Sh_i D_{m,i}}{R_p^2} \frac{L_c}{u_{int}} \tag{4.14}$$

Onde: Sc é o número de Schmidt ($Sc = \frac{\mu}{\rho D_{ax}}$).

A difusividade molecular (D_m) do sal utilizada foi de $9,98 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{min}$ (LU, 2004), da BSA de $3,60 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{min}$ (LU, 2004) e da lisozima de $6,66 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{min}$ (TYN e GUSEK, 1990).

A velocidade intersticial é calculada pela Equação 4.15.

$$u_{int} = \frac{FL_c}{V_c \varepsilon_p} \tag{4.15}$$

Onde: V_c é o volume da coluna; F é o fluxo volumétrico da fase móvel; L_c é o comprimento da coluna; ε_p é a porosidade da partícula.

A Tabela 4.5 traz um resumo de todos os parâmetros de entrada do modelo matemático da coluna cromatográfica.

Tabela 4.5 – Parâmetros de entrada do modelo matemático da coluna cromatográfica

Parâmetro		Obtenção do dado
Diâmetro dos poros da partícula adsorvente	d_p	Dado do fabricante da coluna
Volume da coluna	V_c	Dado do fabricante da coluna
Fluxo volumétrico da fase móvel.	F	Parâmetro independente
Comprimento da coluna	L_c	Dado do fabricante da coluna
Porosidade da resina cromatográfica	ε_p	Calculado pela Equação 5.4
Porosidade da coluna	ε_b	Valor típico da literatura
Difusividade molecular	D_m	Valor típico da literatura

A simulação do perfil cromatográfico envolve quatro etapas: equilíbrio da coluna, injeção da amostra, lavagem, eluição. Cada uma dessas etapas possui condições iniciais específicas que devem ser consideradas.

As condições de contorno na entrada da coluna para proteína são apresentadas nas Equações (4.16) e (4.17) e para o sal na Equação (4.18).

$$x = 0, \left. \frac{\partial C_{ptn}}{\partial x} \right|_{x=0} = \frac{v_i}{D_{ax}} (C_{ptn}|_{x=0} - C_{ptn,in}(t)) \quad (4.16)$$

$$C_{ptn,in}(t) = \begin{cases} C_f 0 & t \leq t_{inj} \\ 0 & t > t_{inj} \end{cases} \quad (4.17)$$

$$C_{s,in}(t) = \begin{cases} C_{Tampão}, & t \leq t_{inj} + t_{lav} \\ C_{Tampão} + \frac{(C_{max\ grad} - C_{Tampão})}{t_{elui}} (t - t_{inj} - t_{lav}), & t_{inj} + t_{lav} < t \leq t_{inj} + t_{lav} + t_{elui} \\ C_{max\ grad}, & t > t_{inj} + t_{lav} + t_{elui} \end{cases} \quad (4.18)$$

As condições de contorno na saída da coluna para cada componente i são dadas pela Equação (4.19).

$$\left. \frac{\partial C_i(t = 0, x = Lc)}{\partial x} \right|_{x=Lc} = 0 \quad (4.19)$$

As condições iniciais de proteína e de sal são dadas pelas Equações (4.20)-(4.25).

$$C_{ptn}(t = 0, x) = 0 \quad (4.20) \quad C_{p,ptn}(t = 0, x) = 0 \quad (4.21) \quad Q_{ptn}(t = 0, x) = 0 \quad (4.22)$$

$$C_s(t = 0, x) = C_{Tampão} \quad (4.23) \quad C_{p,s}(t = 0, x) = C_s \quad (4.24) \quad Q_s(t = 0, x) = \Lambda \quad (4.25)$$

4.3.2 Equilíbrio de adsorção

A isoterma de equilíbrio de adsorção empregada para m proteínas é a apresentada no Capítulo 3 (Equação 3.21) modificada para variáveis adimensionais.

$$\frac{Q_{AD,m}}{C_{p,AD,m}} = K_m \left(\frac{\Lambda / C_{f0,m}}{C_{AD,s} Z_s} \right)^{v_m} \frac{\gamma_m}{\gamma_s^{v_m}} \left(1 - \sum_{j=1}^m \frac{Q_j}{Q_j^{max}} \right)^{v_m} \quad (4.26)$$

Os valores de capacidade de saturação de cada proteína m (Q_m^{max}) são calculados pela Equação 4.27.

$$Q_m^{max} = \frac{\Lambda}{z_m + \zeta} / C_{f0,m} \quad (4.27)$$

Os valores de densidade de ligantes (Λ), constante de equilíbrio (K_m), coeficiente estequiométrico (v_m) e fator de impedimento estérico (ζ) são calculados através de estimação de parâmetros.

A Tabela 4.6 traz todos os parâmetros de entrada do modelo matemático do equilíbrio de adsorção.

Tabela 4.6 – Parâmetros do modelo matemático do equilíbrio de adsorção

Parâmetro		Obtenção do dado
Constante de equilíbrio da adsorção	K	Estimação de parâmetros – método inverso
Fator de impedimento estérico	ζ	Estimação de parâmetros – método inverso
Densidade de ligantes	Λ	Dado do fabricante da coluna / Estimação de parâmetros – método inverso
Coefficiente estequiométrico	v	Estimação de parâmetros – método inverso
Coefficiente de atividade da proteína em solução (fase móvel)	γ	Calculado a partir dos modelos termodinâmicos

4.3.3 Modelagem termodinâmica

Para uma adequada modelagem das isotermas de adsorção viu-se que é necessário um modelo de energia livre de Gibbs em Excesso (G^E) capaz de correlacionar e prever dados de soluções salinas de proteínas.

Ao longo da pesquisa para elaboração desta tese foram estudadas modificações nos modelos de G^E com ênfase no modelo UNIQUAC para o cálculo do coeficiente de atividade das proteínas. O Apêndice E traz o detalhamento das avaliações realizadas a fim de alcançar um modelo que apresentasse desvios satisfatórios.

De acordo com o estudo, o modelo que se mostrou mais eficaz e é empregado nesta modelagem foi o modelo UNIQUAC original (ABRAMS e PRAUSNITZ, 1975)

acrescido do termo de longo alcance de Debye-Huckel modificado por Cardoso (1988). A energia livre de Gibbs em excesso, portanto, é modelada como uma composição de três partes aditivas: uma combinatorial, outra residual e uma de longo alcance.

O termo de longo alcance de Debye-Huckel foi considerado apenas no cálculo do coeficiente de atividade do sal, visto que a utilização do termo de longo alcance para as proteínas não se mostrou eficiente nos estudos apresentados no Apêndice E.

A utilização de um modelo para o coeficiente de atividade supõe a adoção de uma referência na fase líquida. O estado de referência mais comum é o da substância pura nas mesmas condições de pressão, temperatura e mesmo estado de agregação, mas qualquer estado de referência pode ser utilizado, desde que a temperatura seja a mesma da mistura.

A chamada convenção simétrica, adotada para os solventes, é aquela em que o estado de referência é a substância pura na mesma temperatura e pressão da mistura, em estado líquido. Dessa forma, quando a fração molar da substância tende a 1 (substância pura) o coeficiente de atividade molar também tende a 1.

Para íons, o usual é utilizar a convenção assimétrica visto que os íons não existem puros, em estado líquido, nas mesmas condições de temperatura e pressão da mistura. O estado de referência é, então, o de diluição infinita, sendo definido de modo que quando a fração molar do solvente tenda a 1 (diluição infinita) o coeficiente de atividade dos íons tenderão a 1.

Em termos de fração molar, as proteínas encontram-se extremamente diluídas em uma mistura a ser eluída em uma coluna cromatográfica de troca iônica. Devido a isso, é mais conveniente a adoção de um estado de referência onde o coeficiente de atividade da proteína tende a 1 quando a fração molar da proteína tende a zero (independente da fração molar de sal na solução).

Pinho (2000) apresenta uma detalhada descrição da termodinâmica de sistemas eletrolíticos, enfocando as diferenças entre unidades empregadas (molar, molal, concentração) e as conversões entre as unidades e os estados de referências.

O termo combinatorial do modelo UNIQUAC nas escalas simétrica e assimétrica ficam da forma das Equações 4.28 e 4.29.

$$\ln \gamma_i^C = \ln \left(\frac{\phi_i}{x_i} \right) + 1 - \frac{\phi_i}{x_i} - \frac{z_i}{2} q_i \left[\ln \left(\frac{\phi_i}{\theta_i} \right) + 1 - \frac{\phi_i}{\theta_i} \right] \quad (4.28)$$

$$\ln \gamma_i^{*C} = \left[\ln \left(\frac{\phi_i}{x_i} \right) - \frac{\phi_i}{x_i} - \ln \left(\frac{r_i}{r_{agua}} \right) + \frac{r_i}{r_{agua}} \right] - \frac{z_i}{2} q_i \left[\ln \left(\frac{\phi_i}{\theta_i} \right) - \frac{\phi_i}{\theta_i} - \ln \left(\frac{r_i}{r_{agua}} \frac{q_{agua}}{q_i} \right) + \frac{r_i}{r_{agua}} \frac{q_{agua}}{q_i} \right] \quad (4.29)$$

Onde: z é o número de coordenação; ϕ_i é a fração de volume da espécie i calculada pela Equação 4.30, θ_i é a fração de área superficial da espécie i calculada pela Equação 4.31.

$$\phi_i = \frac{x_i r_i}{\sum_{k=1}^{nspec} x_k r_k} \quad (4.30)$$

$$\theta_i = \frac{x_i q_i}{\sum_{k=1}^{nspec} x_k q_k} \quad (4.31)$$

Onde: $nspec$ é o número das diferentes espécies presentes na solução; r_i é o volume de cada espécie i ; q_i é a área superficial de cada espécie i ; x_i é a fração molar da espécie i .

O termo residual do modelo UNIQUAC nas convenções simétrica e assimétrica são apresentados nas Equações 4.32 e 4.33.

$$\ln \gamma_i^R = q_i \left[1 - \ln \left(\sum_{j=1}^{nspec} \theta_j \psi_{ji} \right) - \sum_{j=1}^{nspec} \frac{\theta_j \psi_{ij}}{\sum_{k=1}^{nspec} \theta_k \psi_{kj}} \right] \quad (4.32)$$

$$\ln \gamma_i^R = q_i \left[-\ln \left(\sum_{k=1}^{nspec} \theta_k \psi_{ik} \right) - \sum_{k=1}^{nspec} \theta_k \frac{\psi_{ik}}{\sum_{k=1}^{nspec} \theta_k \psi_{ik}} + \ln(\psi_{i,agua}^\infty) + \psi_{i,agua}^\infty \right] \quad (4.33)$$

Onde: ψ_{ik} é calculado pela Equação 4.34 com $a_{ik} = u_{ik} - u_{kk}$; u_{ik} e u_{kk} são os parâmetros de energia de interação binária independentes da temperatura e da concentração, tal que $a_{ik} \neq a_{ki}$, e $u_{ik} = u_{ki}$.

$$\psi_{ik} = \exp\left(-\frac{a_{ik}}{T}\right) \quad (4.34)$$

O termo de longo alcance segue a formulação apresentada por Cardoso e O'Connell (1987) e é da forma da Equação 4.35 para o solvente e Equação 4.36 para as espécies químicas na escala assimétrica.

$$\ln(\gamma_n^{DH}) = \frac{2A}{B^3} MM_n \frac{\rho_s}{\rho_n} g_1(BI^{1/2}) \quad (4.35)$$

$$\ln(\gamma_i^*)^{DH} = -z_i^2 A \frac{\sqrt{I}}{1+B\sqrt{I}} \quad (4.36)$$

Onde: n representa o solvente, i representa as espécies iônicas; s representa a mistura de solventes; MM_i é a massa molar da espécie química i ; z_i é a valência da espécie iônica; I é a força iônica dada pela Equação 4.37 da espécie iônica; os termos g , A , B são dados respectivamente pelas Equações 4.39, 4.40 e 4.41; n_i é o número de mols da espécie química i ; NI é o número de íons; NS é o número de solventes.

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{NI} m_i z_i^2 \quad (4.37)$$

$$m_i = \frac{n_i}{\sum_{j=1}^{NS} n_j MM_j} \quad (4.38)$$

$$g_1(x) = 1 + x - \frac{1}{1+x} - 2\ln(1+x) \quad (4.39)$$

$$A = \frac{1,327757 * 10^5 (\rho_s)^{1/2}}{(\epsilon T)^{3/2}} \quad (4.40)$$

$$B = \frac{6,359696 (\rho_s)^{1/2}}{(\epsilon T)^{1/2}} \quad (4.41)$$

É importante ressaltar que as equações apresentadas referem-se aos coeficientes de atividade molares definidos pela Equação 4.42.

$$a = \gamma^m x \quad (4.42)$$

Onde: a é a atividade do componente; γ^m é o coeficiente de atividade na escala de fração molar; x é a fração molar do componente.

O coeficiente de atividade molar se relaciona com os coeficientes de atividades molal e concentração através de equações bem estabelecidas que podem ser encontradas em Pinho (2000). Faz-se esta ressalva visto que a modelagem do equilíbrio de adsorção da Equação 4.26 é realizada empregando o coeficiente de atividade na escala de concentração molar. Dessa forma, foi necessário realizar conversões de unidades durante a implementação computacional das rotinas.

4.3.4 Metodologia para estimação de parâmetros dos modelos termodinâmicos

Foram estudados dados experimentais disponíveis na literatura de pressão osmótica de BSA e Lisozima em soluções salinas de NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os dados dos sistemas empregados nos estudos desta seção estão sumarizados na Tabela 4.7 podendo ser encontrados com mais detalhes nos Apêndices D e E.

Conforme as metodologias presentes em Coutinho e Pessoa (2004) e Avena e colaboradores (1997) foi aplicada uma expansão do virial para relacionar a pressão osmótica com o coeficiente virial de tal forma que fosse obtido o coeficiente de atividade “pseudo-experimental”.

Os sistemas foram considerados quaternários formados por proteína/ânion/cátion/pseudossolvente.

Na Tabela 4.8 encontram-se os valores de propriedades e parâmetros utilizados. Para os pseudossolventes foram adotadas as propriedades da água pura. Os parâmetros de forma e volume (r , q) do modelo UNIQUAC dos ânions e cátions foram retirados da literatura. Já os parâmetros de forma e volume das proteínas precisam ser estimados simultaneamente à estimação dos parâmetros de interação energética dentro da rotina computacional desenvolvida. O número de coordenação do modelo UNIQUAC foi constante e igual a 10.

Tabela 4.7 – Sistemas de interesse para esta pesquisa

Sistema	Proteína	Temp (°C)	Faixa de concentração (g/L)	pH	Sal, tampão
E.C.1 ¹	BSA	25	15 – 150	7,4	NaCl, 1 M / 3M / 5M
E.C.2 ¹	BSA	25	12 – 62	4,5	NaCl, 1M
E.C.3 ¹	BSA	25	30 – 123	5,4	NaCl, 3 M / 5M
E.C.4 ³	BSA	25	8 – 59	4,5	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,15M / 0,5M / 1M / 1,5M
E.C.5 ³	BSA	25	8 – 56	4,8	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,15M / 0,5M / 1M / 1,5M
E.C.6 ³	BSA	25	8 – 61	5,4	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,15M / 0,5M / 1M / 1,5M
E.C.7 ³	BSA	25	8 – 67	7,4	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,15M / 0,5M / 1M / 1,5M
E.C.8 ²	Lisozima	25	4 – 21	4,0	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1M / 3M
E.C.9 ²	Lisozima	25	4 – 21	7,0	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1M / 3M
E.C.10 ²	Lisozima	25	4 – 22	8,0	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1M / 3M

Fonte: ¹(WU e PRAUSNITZ, 1999)²(MOON *et al.*, 2000b); ³(LU *et al.*, 2009)

Tabela 4.8 – Propriedades e parâmetros do modelo termodinâmico

Componente	MM (g/mol)	Parâmetros do modelo UNIQUAC	
		q	r
Pseudossolventes ¹	18,015	1,40	0,92
BSA	66500 ²	-	-
Lisozima	17000 ³	-	-
Na ⁺	22,990	1,1998 ⁴	1,4038 ⁴
Cl ⁻	35,450	10,1978 ⁴	10,3868 ⁴
NH ₄ ⁺	18,038	4,6039 ⁵	4,8159 ⁵
SO ₄ ²⁻	96,063	12,4449 ⁵	12,7949 ⁵

Fonte: ¹Dados da água pura. ²(BOWEN *et al.*, 1998).³(MOON *et al.*, 2000b). ⁴(THOMSEN *et al.*, 1996). ⁵(THOMSEN e RASMUSSEN, 1999)

Os parâmetros para o cálculo da densidade e da constante dielétrica da água são apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Coeficientes das correlações de densidade (A, B, C, D) e constante dielétrica (E, F).

Água	A	B	C	D	E	F
	4,6137	0,26214	0,064729	0,23072	1,946	-2,044*10 ⁻³

Fonte: Zemaitis *et. al.* (1986)

O Quadro 4.1 apresenta os valores dos parâmetros u_{ij} (parâmetros de interação energética do modelo UNIQUAC) dos eletrólitos obtidos da literatura.

Quadro 4.1 – Parâmetros U_{ij} utilizados

	H ₂ O	Na	NH ₄	SO ₄	Cl
H ₂ O	0,000 ¹	733,286 ¹	540,297 ²	752,879 ²	1523,390 ¹
Na	-	0,000 ¹	375,977 ²	845,135 ²	1443,230 ¹
NH ₄	-	-	0,000 ²	677,178 ²	1385,310 ²
SO ₄	-	-	-	1265,830 ²	2036,060 ²
Cl	-	-	-	-	2214,810 ¹

Fonte: ¹(THOMSEN *et al.*, 1996); ²(THOMSEN e RASMUSSEN, 1999)

4.3.5 Implementação Computacional

Os modelos matemáticos derivados do balanço de massa global e por componentes da coluna cromatográfica correspondem a um conjunto de equações diferenciais parciais de segunda ordem acopladas a equações algébricas.

Barreto Jr. (2005) apresenta uma vasta revisão bibliográfica sobre os métodos empregados para a resolução de modelos matemáticos de sistemas cromatográficos. A solução numérica consiste da utilização do método de aproximações parabólicas em elementos finitos para a discretização das equações diferenciais parciais na direção axial (BISCAIA JR, 1992). O conjunto de equações resultantes foi integrado no tempo utilizando a subrotina DASSL (PETZOLD, 1989).

O problema de otimização procura a minimização da diferença entre os dados simulados e os dados experimentais (concentração de proteína na saída da coluna no

caso da curva de eluição, e coeficiente de atividade “pseudo-experimental” no caso do modelo termodinâmico).

A estimação dos parâmetros foi realizada através da minimização da função objetivo da Equação 4.42.

$$F_{obj} = \sum_{NDP} \sum_{NDT} \left(\frac{D_{exp} - D_{calc}}{D_{exp}} \right)^2 \quad (4.42)$$

Onde: D é o valor experimental; NDP e NDT são os números de pontos experimentais e conjuntos de dados; os subscritos exp e $calc$ referem-se aos dados experimentais e aos calculados por meio do modelo, respectivamente.

Foi utilizado como método de otimização o Enxame de Partículas (KENNEDY e EBERHART, 1995) acoplado ao método de Nelder-Mead (PRESS *et al.*, 1986). O número de partículas utilizados foi 200. A tolerância dos métodos foi de 10^{-8} . O número máximo de iterações dos métodos foi de 10000.

O desvio dos modelos apresentado ao longo da tese é o valor do RMSD (raiz quadrada do desvio quadrático médio - em inglês *root mean square deviation*) dado pela Equação 4.43.

$$RMSD = \sqrt{\frac{F_{obj}}{NDP}} \quad (4.43)$$

As rotinas computacionais foram desenvolvida em FORTRAN e foi utilizado um processador Intel® Core™ i7-2630QM com 2,00 GHz.

CAPÍTULO 5

Resultados Experimentais

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos com os experimentos do planejamento apresentado na Tabela 4.3. Trata-se, portanto, das curvas de eluição cromatográfica de gradiente salino linear das amostras estudadas obtidos através da injeção de diferentes soluções de proteína em um cromatógrafo comercial ‘AKTA Purifier’ (GE Healthcare). A modelagem dos resultados será objeto de estudo do Capítulo 6.

As curvas de calibração da BSA e da lisozima encontram-se no Apêndice A.

Os resultados dos experimentos para determinação da porosidade total e porosidade das resinas cromatográfica encontram-se no Apêndice B.

5.1 Curvas de eluição experimentais

A seguir são apresentados os perfis cromatográficos obtidos a fim de exemplificação dos resultados. Uma análise mais detalhada será realizada posteriormente.

A primeira sequencia de figuras (Figura 5.1, Figura 5.2 e Figura 5.3) reflete a variação da curva de eluição com o tipo de coluna.

Pode-se observar que o pico de absorbância de BSA é maior na coluna HiTrapTM CaptoTM Q em comparação com a coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE, entretanto o volume de retenção é bastante similar.

Na Figura 5.3, como esperado, a BSA é eluída durante a lavagem da coluna uma vez que a coluna empregada HiTrapTM SP FF é uma coluna de troca catiônica e em pH

7,0 a BSA apresenta carga líquida negativa.

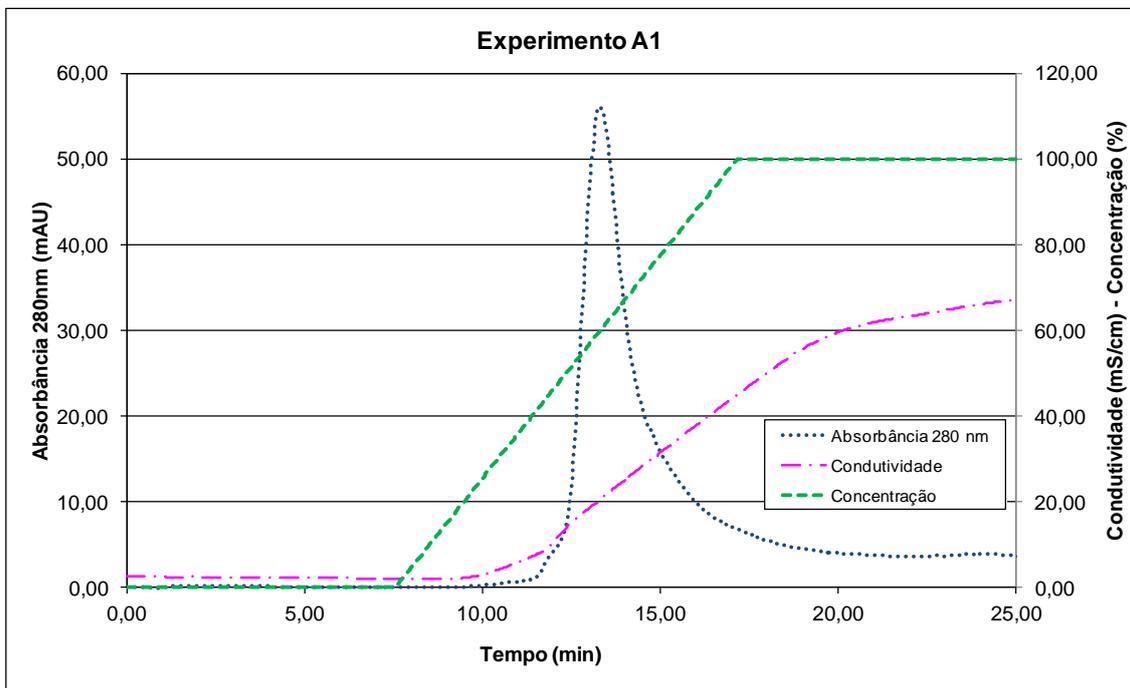


Figura 5.1 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,015mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV

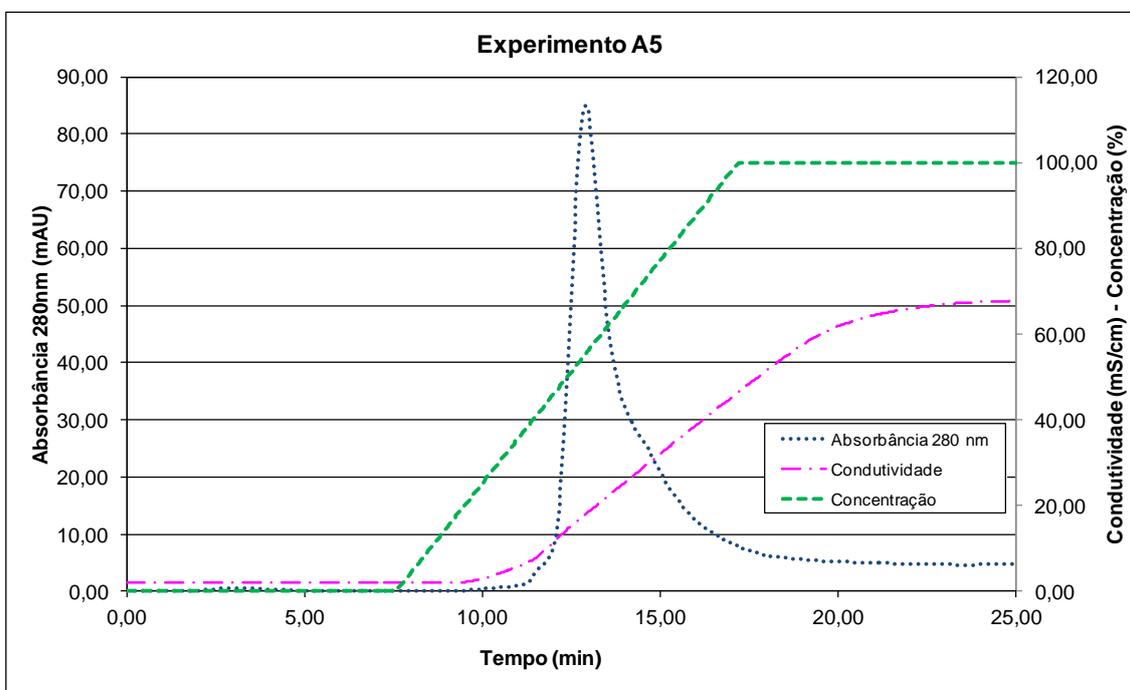


Figura 5.2 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,015mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV

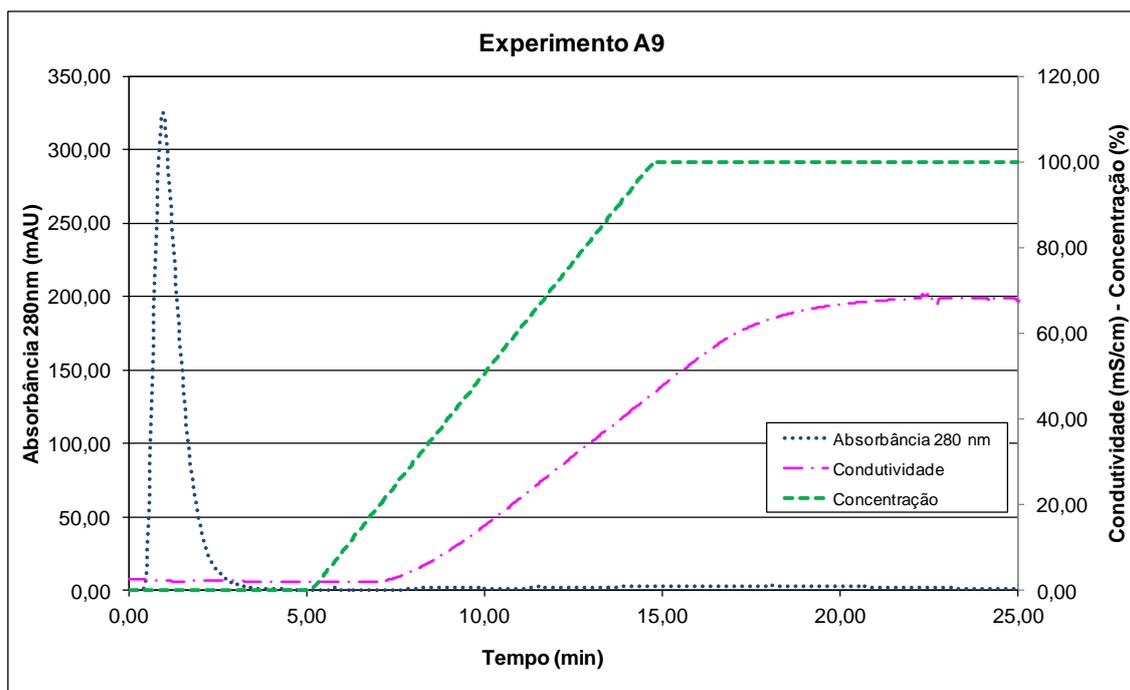


Figura 5.3 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV

As Figuras 5.4, 5.5 e 5.6 são resultados de experimentos com lisozima.

Neste caso, a lisozima em pH 7,0 possui carga líquida positiva, sendo eluída durante a lavagem nas colunas HiTrapTM CactoTM DEAE e HiTrapTM CactoTM Q. Novamente percebe-se uma variação no pico de absorbância. Visto que em ambas as colunas não há adsorção da lisozima, pode-se afirmar que a diferença nos perfis de eluição se dá devido às diferenças de porosidade das partículas das resinas, assim como uma possível diferença de porosidade do leito. Dessa forma, a retenção da lisozima em cada resina é distinta.

Na curva de eluição apresentada na Figura 5.6, verifica-se que o pico de eluição da lisozima na coluna HiTrapTM SP FF é praticamente simétrico e não apresenta a dispersão da parte final (formação de cauda) como verificado na eluição da BSA (Figuras 5.1 e 5.2). A eluição da lisozima nas resinas aniônicas apresenta uma ligeira formação da cauda, bem pouco acentuada (Figuras 5.4 e 5.5).

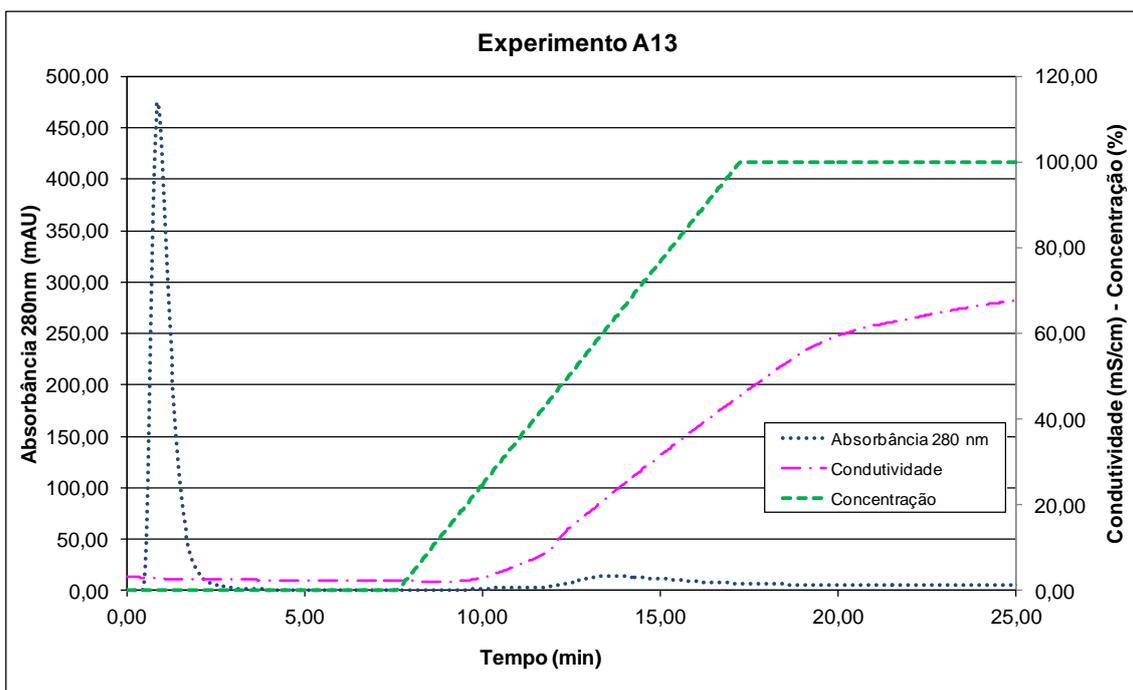


Figura 5.4 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), proteína lisozima, concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV

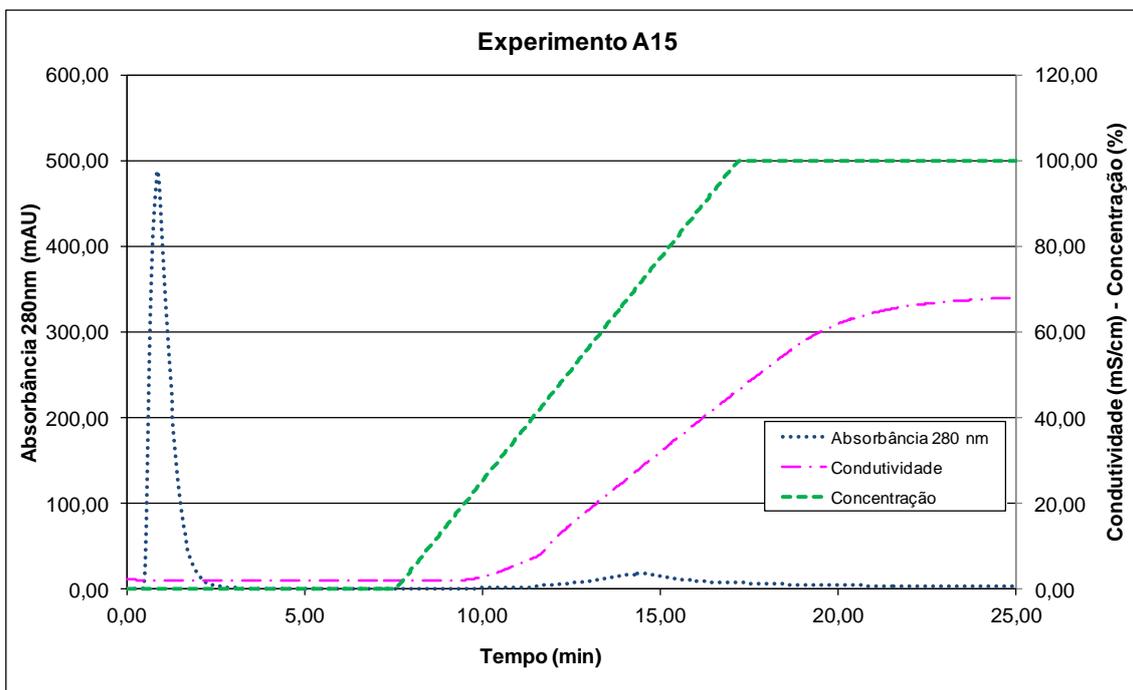


Figura 5.5 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), proteína lisozima, concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV

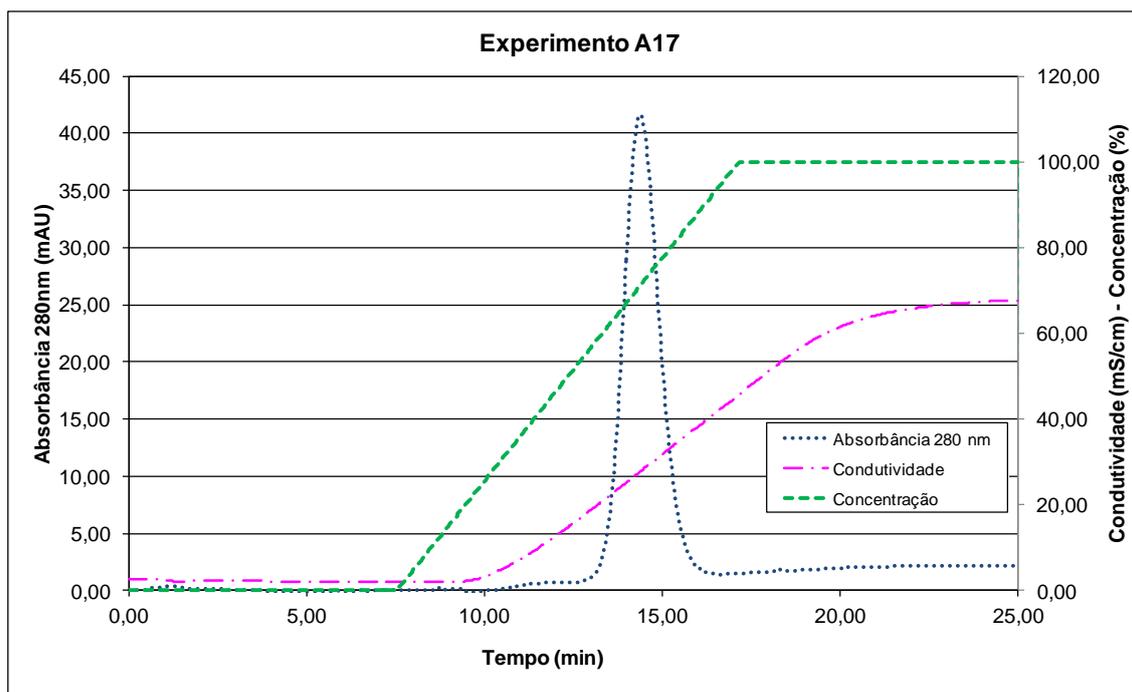


Figura 5.6 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), proteína lisozima, concentração inicial de proteína 0,015mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV

A Figura 5.7 traz o resultado do perfil cromatográfico de uma mistura equimolar de BSA e lisozima. O resultado está dentro do esperado onde a eluição da mistura pode ser vista como um somatório da eluição individual das proteínas.

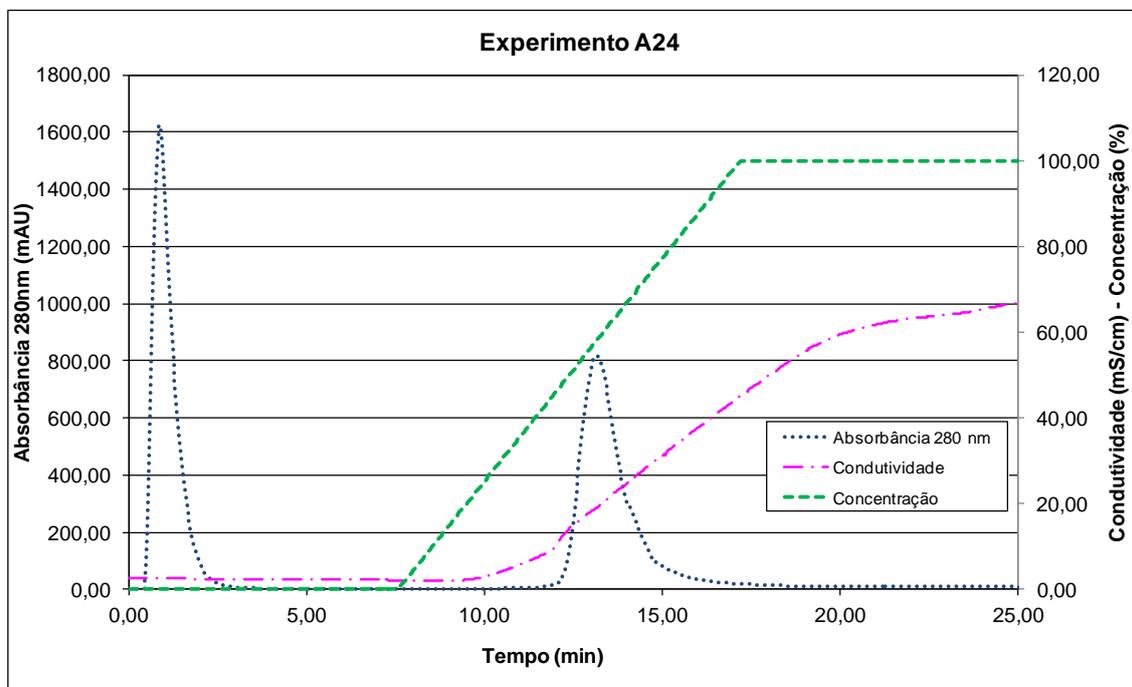


Figura 5.7 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), proteínas BSA e lisozima, concentração inicial de ambas proteínas 0,301 mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV

A Figura 5.8 apresenta o perfil cromatográfico de BSA na coluna HiScreen™ Capto™ DEAE. Percebe-se que o perfil é qualitativamente similar ao perfil da coluna HiTrap™ Capto™ DEAE.

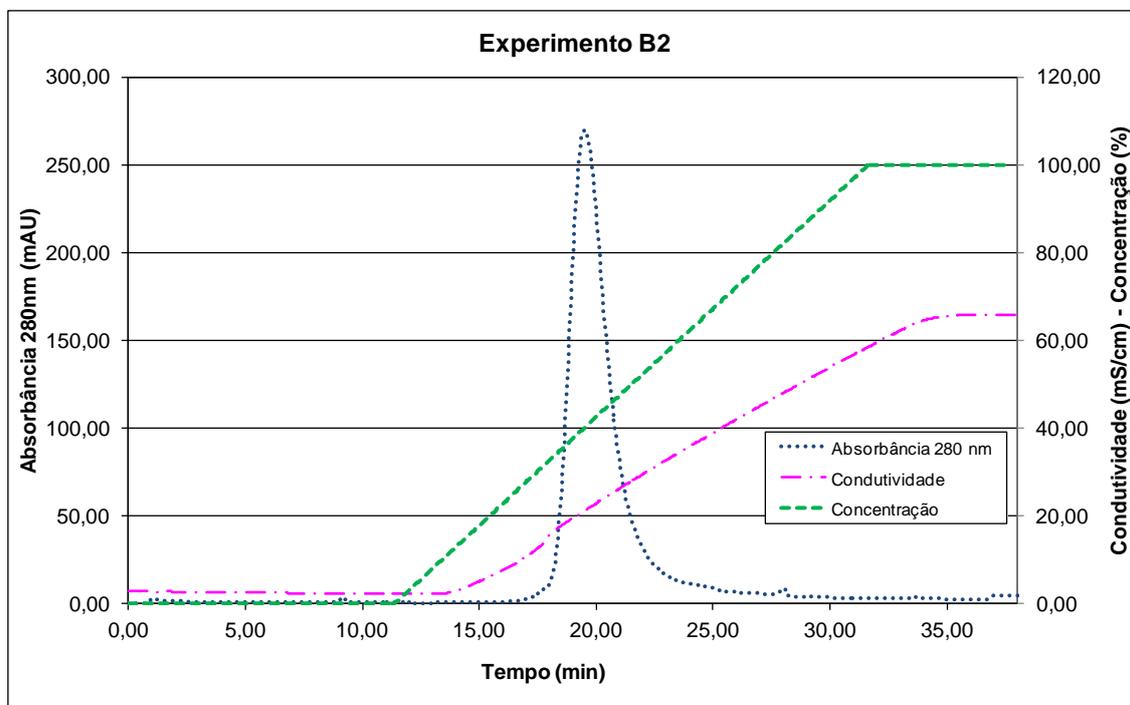


Figura 5.8 – Perfil cromatográfico – Coluna HiScreen™ Capto™ DEAE (4,7 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV

As Figuras 5.9 a 5.12 trazem os resultados da variação do tampão.

Nota-se na Figura 5.9 que quando a concentração salina do tampão é muito elevada (tampão fosfato 0,2M) parte da proteína não é adsorvida na coluna sendo eluída na lavagem. O mesmo comportamento é observado na adsorção da BSA em resina Capto™ Q (Figura 5.10). Já na adsorção de lisozima em resina SP FF (Figural 5.11), toda a proteína é eluída durante a lavagem da coluna.

A variação de pH para pH 8,0 gerou uma leve alteração na curva de eluição da BSA na coluna HiTrap™ Capto DEAE (Figura 5.12).

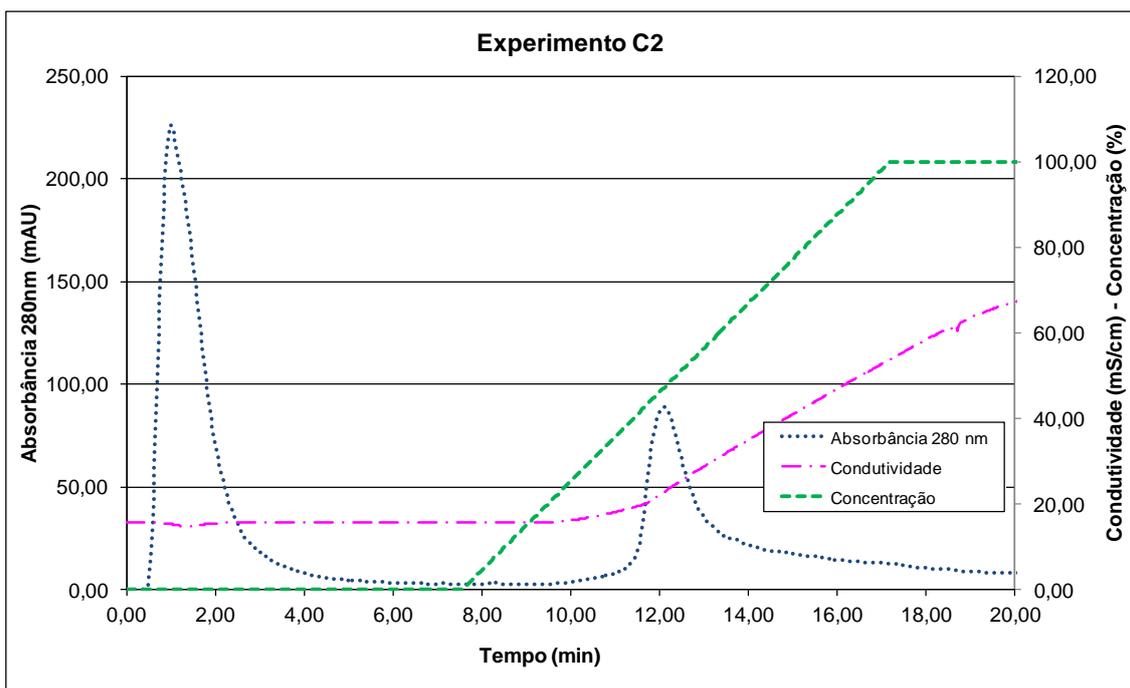


Figura 5.9 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,075 mM, tampão fosfato 0,2M, pH 7,0, gradiente de 10 CV

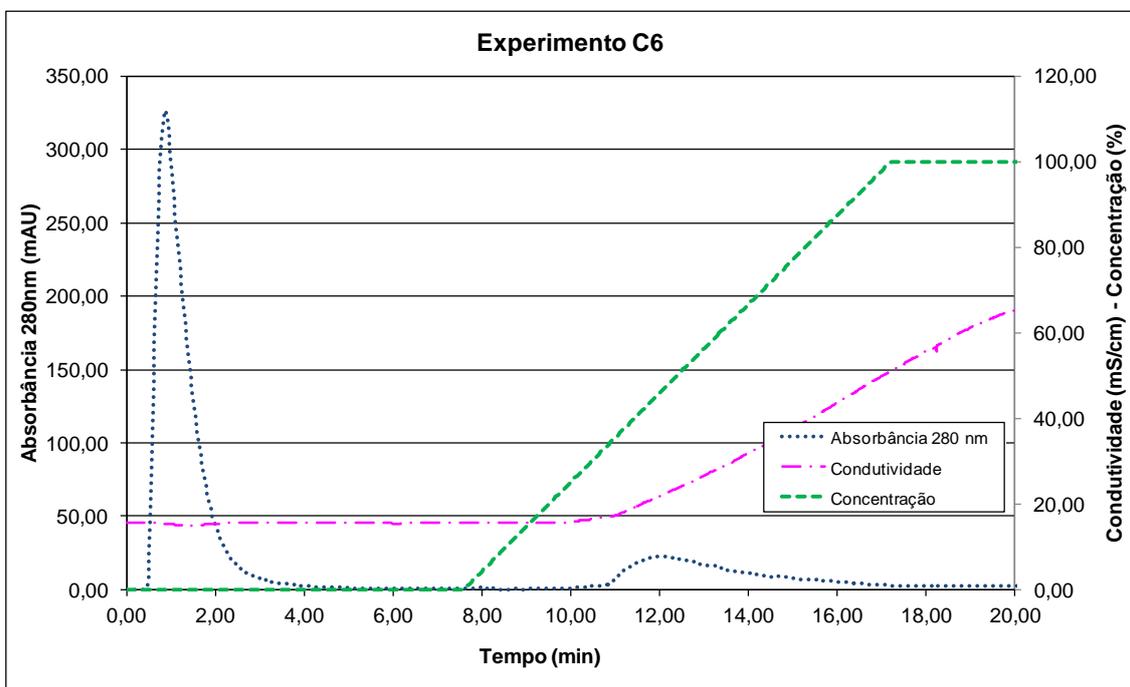


Figura 5.10 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,075 mM, tampão fosfato 0,2M, pH 7,0, gradiente de 10 CV

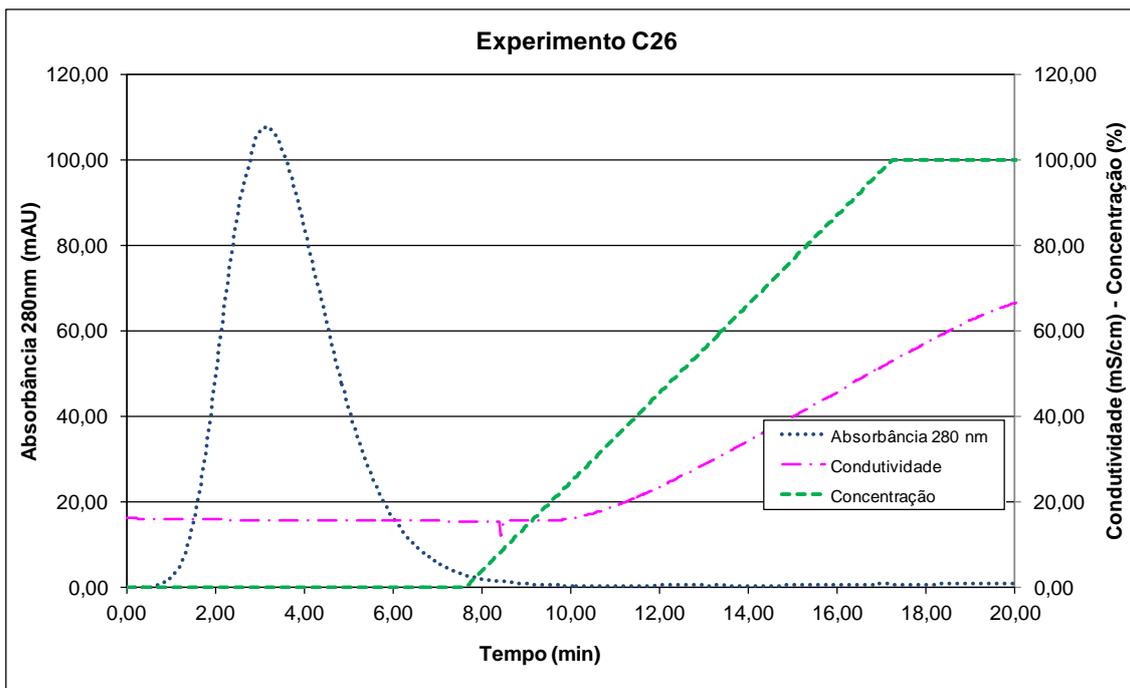


Figura 5.11 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), proteína lisozima, concentração inicial de proteína 0,075 mM, tampão fosfato 0,2M, pH 7,0, gradiente de 10 CV

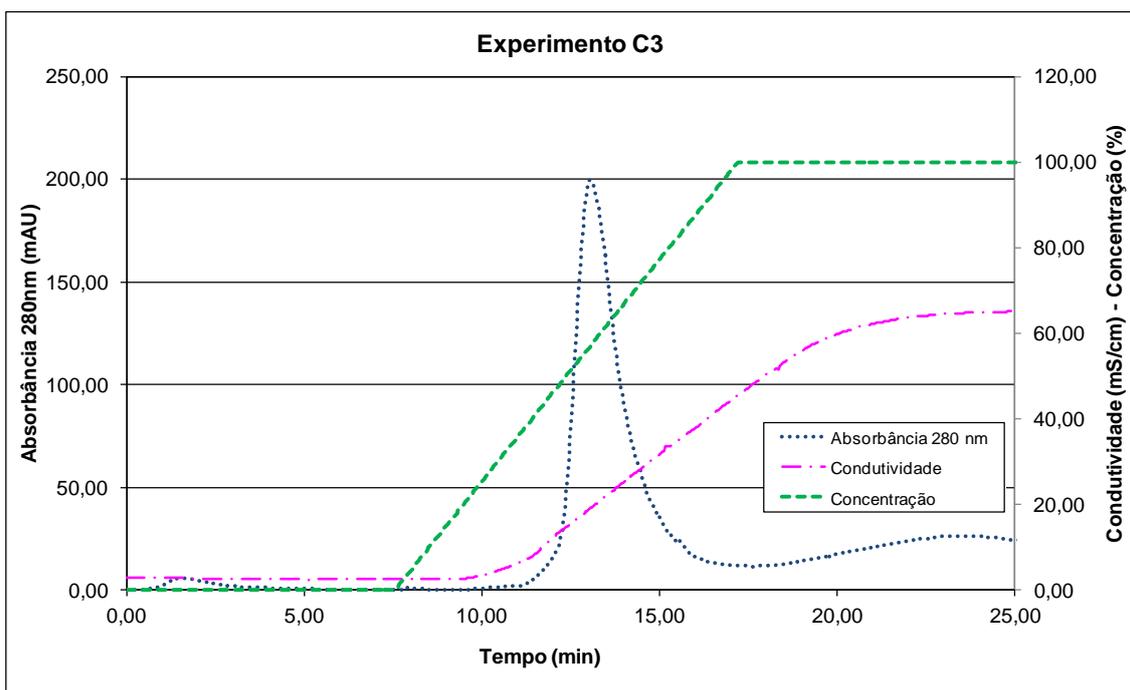


Figura 5.12 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,075 mM, tampão fosfato 0,02M, pH 8,0, gradiente de 10 CV

Por fim, a Figura 5.13 apresenta o perfil cromatográfico de BSA na coluna HiScreen™ Capto™ DEAE quando o gradiente é de 5 CV. É possível perceber nos experimentos de variação do tamanho do gradiente que esta variável influencia

significativamente o tempo de retenção da proteína.

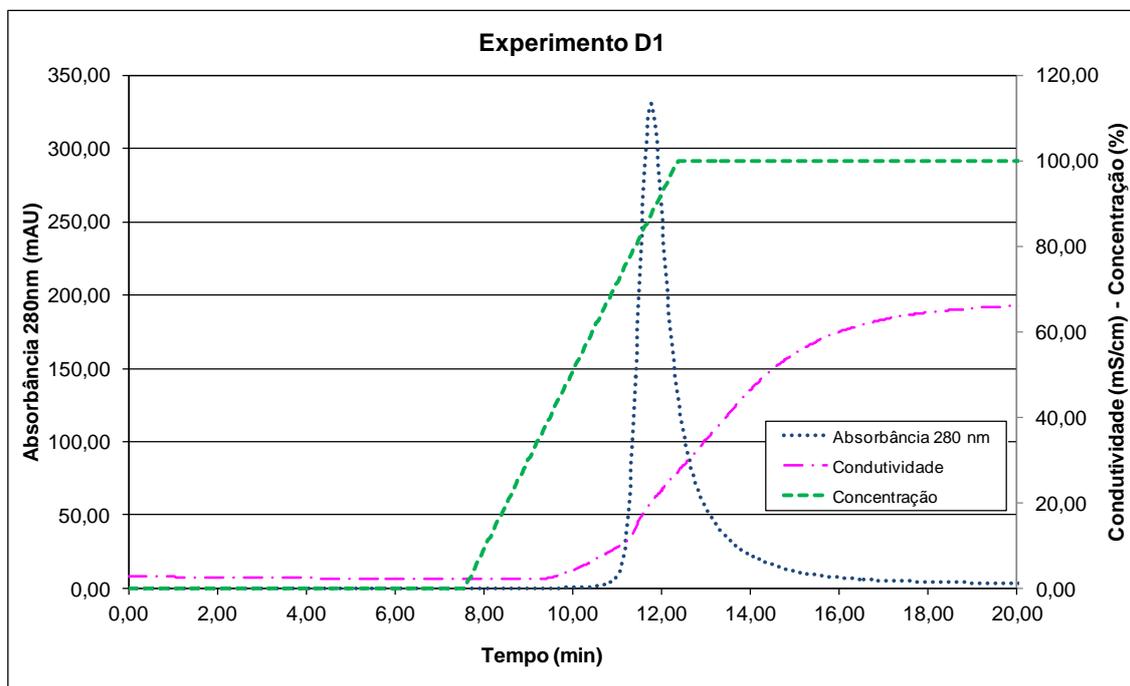


Figura 5.13 – Perfil cromatográfico – Coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), proteína BSA, concentração inicial de proteína 0,075 mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 5 CV

5.2 Avaliação dos volumes de retenção experimentais

Os volumes de retenção experimentais são apresentados nas Tabelas 5.1 a 5.4 para todos os experimentos realizados. São apresentados dois valores de volume de retenção. O primeiro V_R^{max} foi determinado como o volume no ponto máximo do pico de eluição, enquanto o segundo V_R^{EMG} foi determinado pelo primeiro momento da curva gaussiana exponencialmente modificada (EMG - *exponentially modified Gaussian model*).

O modelo EMG é uma curva gaussiana acoplada a uma função de decaimento exponencial capaz de representar picos de eluição simétricos e assimétricos e, por isso, bastante utilizada na representação de picos cromatográficos reais (JEANSONNE e FOLEY, 1991). A função é descrita na Equação 5.1.

$$f(t) = \frac{A\sigma}{\tau\sqrt{2}} \exp\left[\left(\frac{\sigma}{\tau}\right)^2 \frac{1}{2} - \frac{t-\mu}{\tau}\right] \int_{-\infty}^Z \exp(-x^2 dx) + E \quad (5.1)$$

$$Z = \frac{1}{\sqrt{2}} \left(\frac{t-\mu}{\sigma} - \frac{\sigma}{\tau} \right)$$

Onde: t é o tempo; A é um fator de escala; μ é a média da gaussiana; σ é o desvio padrão da gaussiana; τ é a constante de decaimento exponencial; E é o nível da linha de base do pico.

O ajuste à curva EMG foi realizada com o auxílio do programa TableCurve2D da SystatSoftware (San Jose, CA, USA).

O primeiro momento (M_1) da curva é determinado pela Equação 5.2.

$$M_1 = \mu + \tau = \frac{V_R^{EMG}}{F} \quad (5.2)$$

A variância é calculada pela Equação 5.3.

$$\sigma_{V_R}^2 = \sigma_{\mu}^2 + \sigma_{\tau}^2 \quad (5.3)$$

A Tabela 5.1 apresenta os resultados da série de experimentos do tipo "A" onde buscou-se a avaliação da influência da concentração inicial de proteína no volume de retenção.

Verifica-se que os valores de V_R^{max} e V_R^{EMG} diferenciam-se menos que 1% na adsorção da lisozima em resina SP FF. Já a adsorção de BSA nas resinas aniônicas apresentam diferença na ordem de 2,5%, com excessão dos experimentos A1 e A5 que apresentam diferenças de 7%. Por outro lado, quando as proteínas não adsorvem nas resinas, a diferença no volume de retenção calculado como sendo o máximo do pico ou o calculado pelo primeiro momento chega a 30%. Esse resultado indica que o pico de eluição da lisozima possui um comportamento quase simétrico.

Pode-se verificar que o volume de retenção da BSA diminui com o aumento da concentração de injeção da proteína para todos os tipos de resinas analisadas. Já o volume de retenção da lisozima tem a tendência de aumentar com o aumento da concentração de injeção da proteína (experimentos A17-A20). Uma análise desse

comportamento é apresentada na seção 6.3.4.

Tabela 5.1 – Volumes de retenção experimentais obtidos - série de experimentos A para verificação da influência da concentração de injeção das proteínas

Exp	Coluna	Proteína	Concentração inicial (mM)	Tampão	Tamanho do gradiente	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	σ_{VR}^2
A1	HiTrap™	BSA	0,015	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	13,15	14,16	0,02616
A2	Capto™		0,075			13,27	13,59	0,00859
A3	DEAE		0,150			13,25	13,56	0,00579
A4	1 mL		0,301			13,12	13,45	0,00562
A5	HiTrap™	BSA	0,015	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	12,90	13,82	0,02477
A6	Capto™ Q		0,075			12,81	13,10	0,01020
A7	1 mL		0,150			12,77	13,10	0,00676
A8			0,301			12,64	12,98	0,00498
A9	HiTrap™	BSA	0,075	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	0,96	1,25	0,00372
A10	SP FF 1 mL		0,301			0,96	1,24	0,00324
A13	HiTrap™	Lisozima	0,075	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	0,87	1,08	0,00454
A14	Capto™ DEAE 1 mL		0,301			0,91	1,08	0,00420
A15	HiTrap™	Lisozima	0,075	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	0,87	1,06	0,00568
A16	Capto™ Q 1 mL		0,301			0,88	1,04	0,00468
A17	HiTrap™	Lisozima	0,015	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	14,37	14,48	0,01940
A18	SP FF		0,075			14,40	14,52	0,00305
A19	1 mL		0,150			14,48	14,60	0,00250
A20			0,301			14,64	14,75	0,00210
A24	HiTrap™	BSA	0,301	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	13,17	13,03	0,00508
	Capto™ DEAE 1 mL							
A25	HiTrap™	BSA	0,15	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	13,22	13,52	0,00743
	Capto™ DEAE 1 mL							

Tabela 5.1 – Continuação

Exp	Coluna	Proteína	Concentração inicial (mM)	Tampão	Gradiente	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	σ_{VR}^2	
A26	HiTrap TM Capto TM DEAE 1 mL	BSA	0,301	Fosfato	0,02M / pH 7	10 CV	13,20	13,52	0,00743
		Lisozima	0,15				0,85	1,06	0,00710
A27	HiTrap TM Capto TM DEAE 1 mL	BSA	0,015	Fosfato	0,02M / pH 7	10 CV	13,28	13,93	0,03197
		Lisozima	0,075				0,88	1,05	0,01112
A28	HiTrap TM Capto TM DEAE 1 mL	BSA	0,075	Fosfato	0,02M / pH 7	10 CV	13,29	13,64	0,02782
		Lisozima	0,015				0,93	1,22	0,00458
A30	HiTrap TM Capto TM Q 1 mL	BSA	0,3	Fosfato	0,02M / pH 7	10 CV	12,72	13,03	0,00508
		Lisozima	0,3				0,87	1,02	0,00980
A31	HiTrap TM Capto TM Q 1 mL	BSA	0,15	Fosfato	0,02M / pH 7	10 CV	12,80	13,14	0,00763
		Lisozima	0,301				0,85	0,99	0,01854
A32	HiTrap TM Capto TM Q 1 mL	BSA	0,301	Fosfato	0,02M / pH 7	10 CV	12,75	13,07	0,00499
		Lisozima	0,15				0,88	1,05	0,00653
A33	HiTrap TM Capto TM Q 1 mL	BSA	0,015	Fosfato	0,02M / pH 7	10 CV	12,97	13,81	0,02774
		Lisozima	0,075				0,87	1,013	0,01056
A34	HiTrap TM Capto TM Q 1 mL	BSA	0,075	Fosfato	0,02M / pH 7	10 CV	12,77	13,16	0,03102
		Lisozima	0,015				0,85	1,09	0,00388
A36	HiTrap TM SP FF 1 mL	BSA	0,301	Fosfato	0,02M / pH 7	10 CV	0,98	1,28	0,00737
		Lisozima	0,301				14,55	14,58	0,00405
A37	HiTrap TM SP FF 1 mL	BSA	0,15	Fosfato	0,02M / pH 7	10 CV	0,98	1,30	0,00533
		Lisozima	0,301				14,54	14,59	0,00332
A38	HiTrap TM SP FF 1 mL	BSA	0,301	Fosfato	0,02M / pH 7	10 CV	0,99	1,24	0,03535
		Lisozima	0,15				14,51	14,57	0,00411

Tabela 5.1 – Continuação

Exp	Coluna	Proteína	Concentração inicial (mM)	Tampão	Gradiente	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	$\sigma_{V_R}^2$
A39	HiTrap™	BSA	0,015	Fosfato	10 CV	0,96	1,335	0,00428
	SP FF 1 mL	Lisozima	0,075	0,02M / pH 7		14,51	14,57	0,04552
A40	HiTrap™	BSA	0,075	Fosfato	10 CV	0,96	1,23	0,01240
	SP FF 1 mL	Lisozima	0,015	0,02M / pH 7		14,43	14,49	0,01614

O volume de retenção quando as proteínas não adsorvem na resina é praticamente independente da concentração inicial de proteína, porém depende da porosidade total (diferença de valores entre os experimentos A13-A14 e A15-A16).

Nos experimentos em que há duas proteínas o volume de retenção não se mantém igual ao encontrado para as proteínas individuais, porém a ordem de grandeza é similar. Isso pode ser devido ao erro experimental ou devido à influência da presença de outra proteína na mistura.

As Figuras 5.14 e 5.15 ilustram os resultados obtidos.

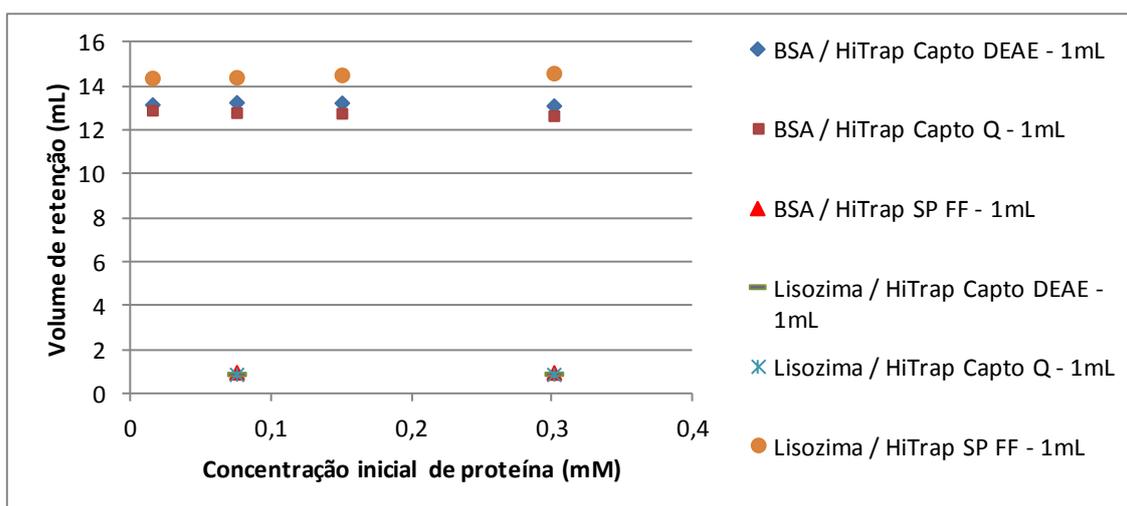


Figura 5.14 – Resultados de V_R^{max} dos experimentos A1 - A20.

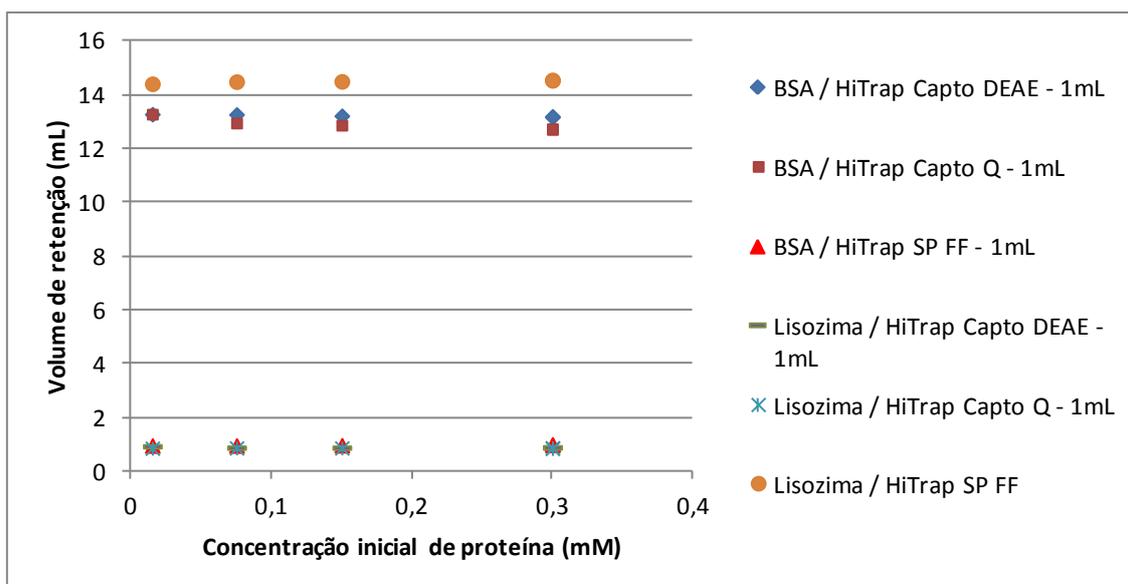


Figura 5.15 – Resultados de V_R^{max} dos experimentos A24 - A40.

A Tabela 5.2 apresenta os resultados da série de experimentos do tipo "B" onde se buscou a avaliação da influência do volume da coluna.

Os valores de volume de retenção entre as resinas Capto™ DEAE e Capto™ Q são bastante similares entre si. Tal comportamento é o mesmo do observado anteriormente na série de experimentos do tipo "A" com colunas de 1mL. O comportamento do pico de eluição é mais simétrico nas colunas HiScreen™ de modo que a diferença entre os valores de V_R^{max} e V_R^{EMG} são menores que 1,2mL.

Tabela 5.2 – Volumes de retenção experimentais obtidos - série de experimentos B para verificação da influência do volume da coluna

Exp	Coluna	Proteína	Concentração inicial (mM)	Tampão	Gradiente	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	σ_{VR}^2
B2	HiScreen™ Capto™ DEAE 4,7 mL					44,80	45,98	0,00802
B4	HiScreen™ Capto™ Q 4,7 mL	BSA	0,301	Fosfato 0,02M / pH 7	10 CV	42,85	43,97	0,01035
B6	HiScreen™ SP FF 4,7 mL					2,62	3,28	0,00275

Tabela 5.2 – Continuação

Exp	Coluna	Proteína	Concentração inicial (mM)	Tampão	Gradiente	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	σ_{VR}^2
B8	HiScreen™ Capto™ DEAE 4,7 mL					2,12	2,23	0,00105
				Fosfato				
B10	HiScreen™ Capto™ Q 4,7 mL	Lisozima	0,301	0,02M / pH 7	10 CV	2,30	2,46	0,00137
B12	HiScreen™ SP FF 4,7 mL					48,46	49,11	0,01647
B13	HiScreen™ Capto™ DEAE 4,7 mL	BSA	0,301	Fosfato	10 CV	44,62	45,95	0,01497
		Lisozima	0,301	pH 7		2,40	2,51	0,01367
B14	HiScreen™ Capto™ Q 4,7 mL	BSA	0,301	Fosfato	10 CV	42,94	43,92	0,02582
		Lisozima	0,301	pH 7		2,21	2,32	0,01315
B15	HiScreen™ SP FF 4,7 mL	BSA	0,301	Fosfato	10 CV	2,67	3,38	0,01111
		Lisozima	0,301	pH 7		50,05	50,28	0,01560

A Figura 5.16 ilustra os resultados obtidos.

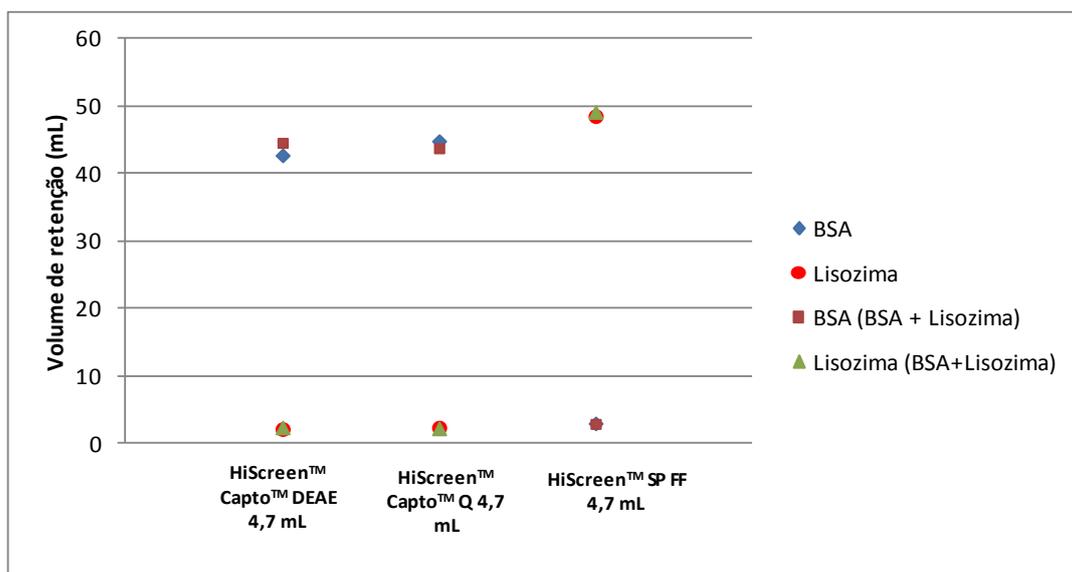


Figura 5.16 – Resultados de V_R^{max} de acordo com o tamanho da coluna.

A Tabela 5.3 apresenta os resultados da série de experimentos do tipo "C" onde buscou-se a avaliação da influência da concentração e do pH do tampão.

Verifica-se que em tampão fosfato 0,2M nenhuma das proteínas adsorve nas resinas, de tal forma que elas são eluídas durante a lavagem da coluna e os volumes de retenção são da ordem do volume da coluna. Não foi possível perceber variação no volume de retenção com o pH do tampão. Apesar de terem sido obtidos valores ligeiramente distintos, é possível atribuir a variação ao erro experimental.

Tabela 5.3 – Volumes de retenção experimentais obtidos - série de experimentos C para verificação da influência da concentração e pH do tampão

Exp	Resina	Proteína	Concentração do tampão (M)	pH	Gradiente	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	σ_{VR}^2
C2	Capto™	BSA	0,2	7	10 CV	0,98	1,427	0,03622
C3	DEAE	0,075 mM	0,02	8		13,01	13,57	0,03051
C6	Capto™	BSA	0,2	7	10 CV	0,89	1,22	0,00872
C7	Q	0,075 mM	0,02	8		13,11	13,57	0,00709
C10	SP FF	BSA	0,2	7	10 CV	1,07	1,34	0,00403
C11		0,075 mM	0,02	8		0,96	1,25	0,00512
C18	Capto™	Lisozima	0,2	7	10 CV	1,00	1,23	0,00414
C19	DEAE	0,075 mM	0,02	8		0,91	1,10	0,00631
C22	Capto™	Lisozima	0,2	7	10 CV	0,91	1,16	0,00899
C23	Q	0,075 mM	0,02	8		0,89	1,13	0,00544
C26	SP FF	Lisozima	0,2	7	10 CV	3,13	3,70	0,01239
C27		0,075 mM	0,02	8		13,91	14,10	0,00577

A Figura 5.17 ilustra os resultados obtidos.

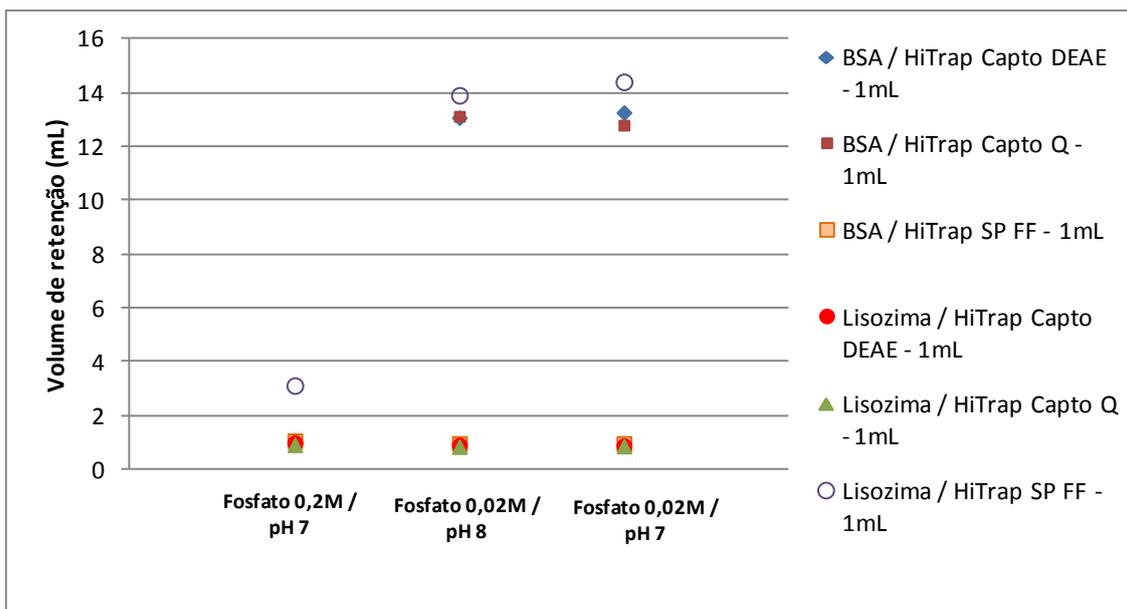


Figura 5.17 – Resultados de V_R^{max} de acordo com a concentração e pH do tampão fosfato.

A Tabela 5.4 apresenta os resultados da série de experimentos do tipo "D" onde buscou-se a avaliação da influência do tamanho do gradiente. A Figura 5.18 ilustra os resultados obtidos. Verifica-se que na adsorção de lisozima o aumento do tamanho do gradiente provoca um aumento praticamente linear do volume de retenção, mas o mesmo não ocorre para a adsorção de BSA.

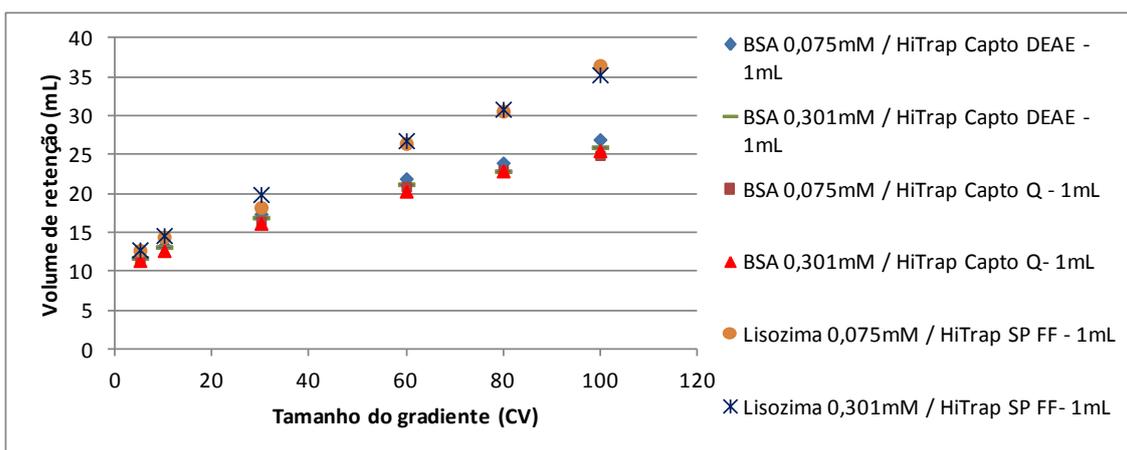


Figura 5.18 – Resultados de volume de retenção dos experimentos de acordo com o tamanho do gradiente.

Tabela 5.4 – Volumes de retenção experimentais obtidos - série de experimentos D para verificação da influência do tamanho do gradiente

Experimento	Resina	Proteína	Tampão	Gradiente (CV)	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	σ_{VR}^2
D1				5	11,76	12,12	0,00671
D3	Capto™ DEAE	BSA 0,075 mM	Fosfato	30	17,31	18,01	0,02130
D4			0,02M / pH	60	21,92	23,40	0,04281
D5			7	80	23,95	27,02	0,05368
D6				100	27,00	30,53	0,08653
D8				5	11,73	12,03	0,00416
D10	Capto™ DEAE	BSA 0,301 mM	Fosfato	30	16,89	17,86	0,02221
D11			0,02M / pH	60	21,19	22,74	0,02318
D12			7	80	22,90	25,84	0,03186
D13				100	25,92	29,64	0,05078
D15				5	11,50	11,88	0,00852
D17	Capto™ Q	BSA 0,075 mM	Fosfato	30	16,43	17,14	0,02567
D18			0,02M / pH	60	20,88	22,44	0,06038
D19			7	80	23,70	25,77	0,07106
D20				100	26,16	29,12	0,09513
D22				5	11,36	11,69	0,00431
D24	Capto™ Q	BSA 0,301 mM	Fosfato	30	16,15	16,80	0,01214
D25			0,02M / pH	60	20,24	21,87	0,02430
D26			7	80	22,87	24,79	0,02124
D27				100	25,32	28,39	0,03520
D29				5	12,69	12,81	0,00233
D31	SP FF	Lisozima 0,075 mM	Fosfato	30	19,73	19,88	0,00949
D32			0,02M / pH	60	26,48	26,36	0,02258
D33			7	80	30,51	30,57	13,6933
D34				100	34,53	34,48	7,29590
D36				5	12,76	12,84	0,00128
D38	SP FF	Lisozima 0,301 mM	Fosfato	30	19,84	19,84	0,16538
D39			0,02M / pH	60	26,80	26,70	0,01145
D40			7	80	30,80	30,72	0,03553
D41				100	35,28	35,04	0,01530

Nesta série a diferença nos valores de V_R^{max} e V_R^{EMG} , na adsorção de BSA nas resinas aniônicas, cresce de 3 a 14% com o aumento do tamanho do gradiente, chegando a diferenças de quase 4mL. Já para adsorção de lisozima em resina SP FF a diferença entre os valores fica menor que 1%. Esse comportamento novamente indica

que as curvas de eluição da lisozima são bastante simétricas, de forma que o volume de retenção calculado no ponto máximo da curva é bastante próximo do volume de retenção calculado pelo primeiro momento da curva. Por outro lado, na adsorção de BSA o aumento do gradiente provoca uma distorção da curva de eluição.

5.3 Avaliação do comportamento da curva de eluição

Nesta seção é feita uma avaliação do comportamento da curva de eluição experimental. Todas as figuras apresentam a concentração de proteína (g/L) já convertida através da curva de calibração e não mais a absorbância obtida a 280nm. Essa apresentação facilitará a comparação posterior com os resultados da modelagem teórica.

Os experimentos da série "A" ilustrados nas Figuras 5.19, 5.20 e 5.21 buscaram verificar a influência da concentração inicial de proteína na curva de eluição.

Nas Figuras 5.19 e 5.20 é possível perceber claramente o comportamento disperso da parte final do pico de eluição da BSA. Este comportamento acontece tanto na adsorção na resina Capto™ DEAE (Figura 5.19) quanto na resina Capto™ Q (Figura 5.20) e ocorre em todas as concentrações iniciais de BSA analisadas. O comportamento dos picos da Figura 5.21 é muito mais simétrico.

Pode-se observar, também, que enquanto os volumes de retenção da BSA tendem a manterem-se constantes, os volumes de retenção da lisozima em resina SP FF tendem a aumentar ligeiramente com o aumento da concentração inicial da proteína.

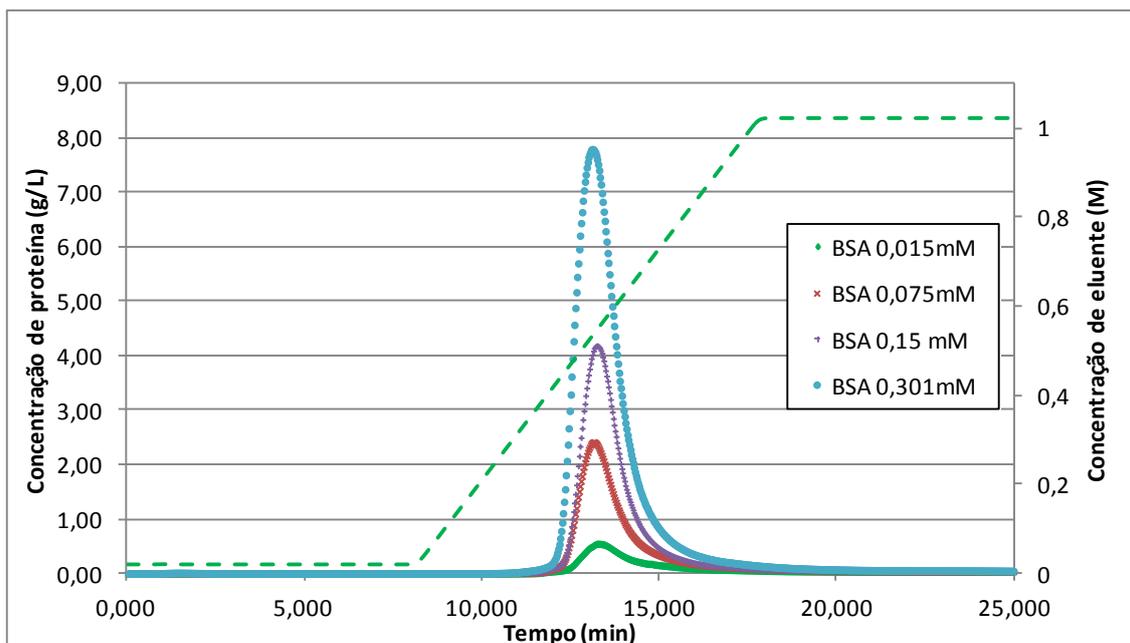


Figura 5.19 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes concentrações iniciais de proteína – Coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), proteína BSA, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente 10 CV

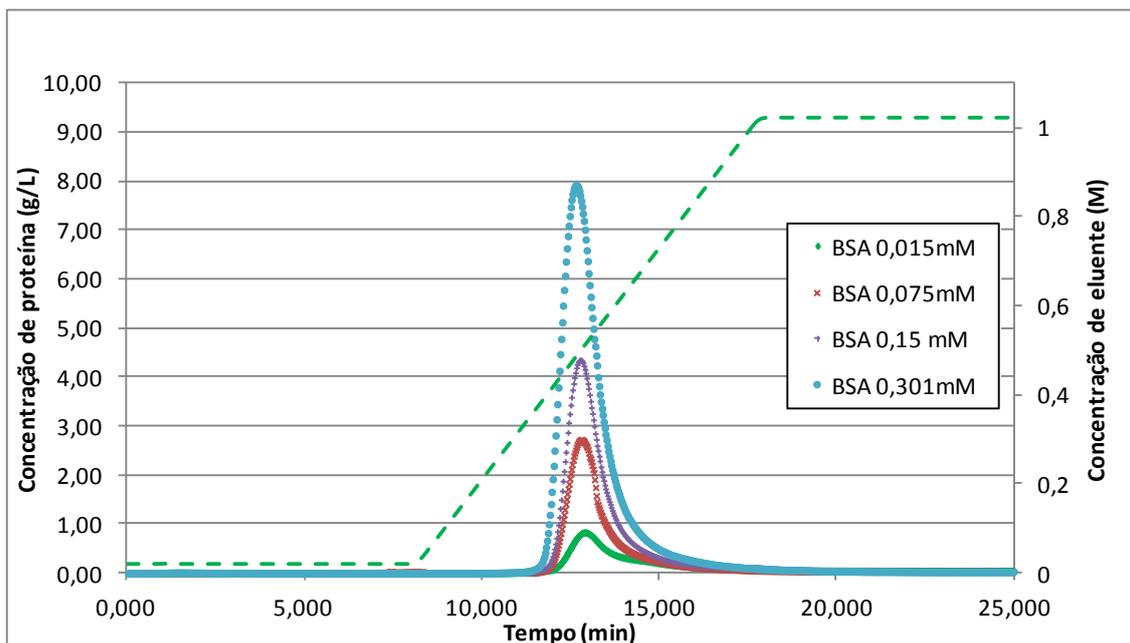


Figura 5.20 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes concentrações iniciais de proteína – Coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), proteína BSA, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente 10 CV

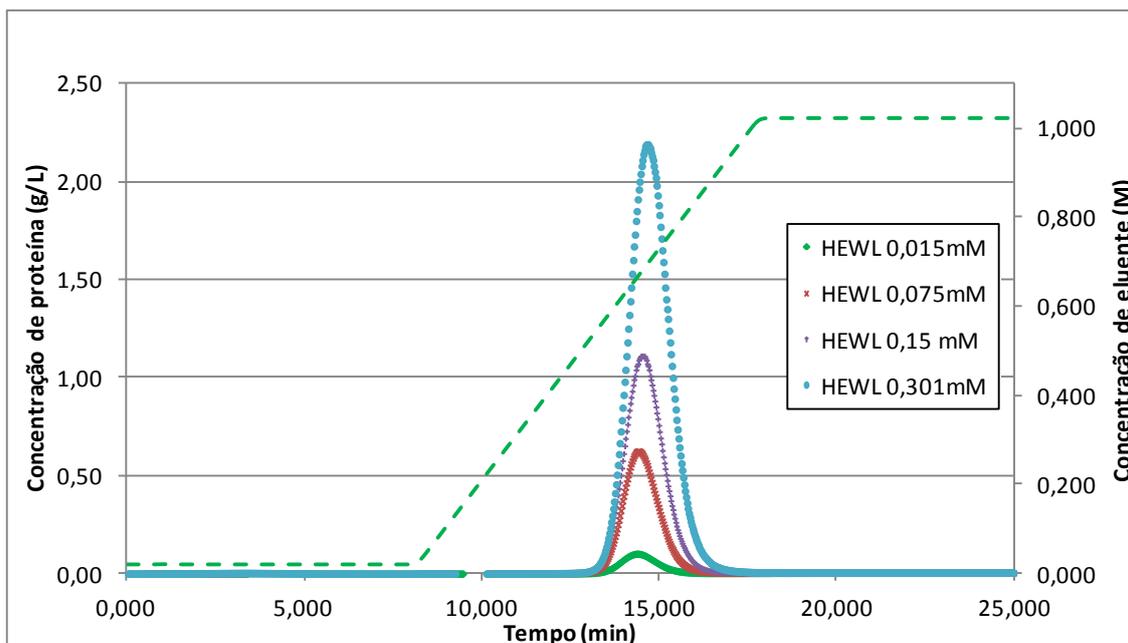


Figura 5.21 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes concentrações iniciais de proteína – Coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), proteína lisozima, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente 10 CV

Nos experimentos em que há duas proteínas (Figuras 5.22, 5.23 e 5.24) a diferença de comportamento da adsorção de cada proteína fica muito mais evidente. A Figura 5.24, por exemplo, possui picos simétricos para a lisozima e com uma cauda acentuada para a BSA.

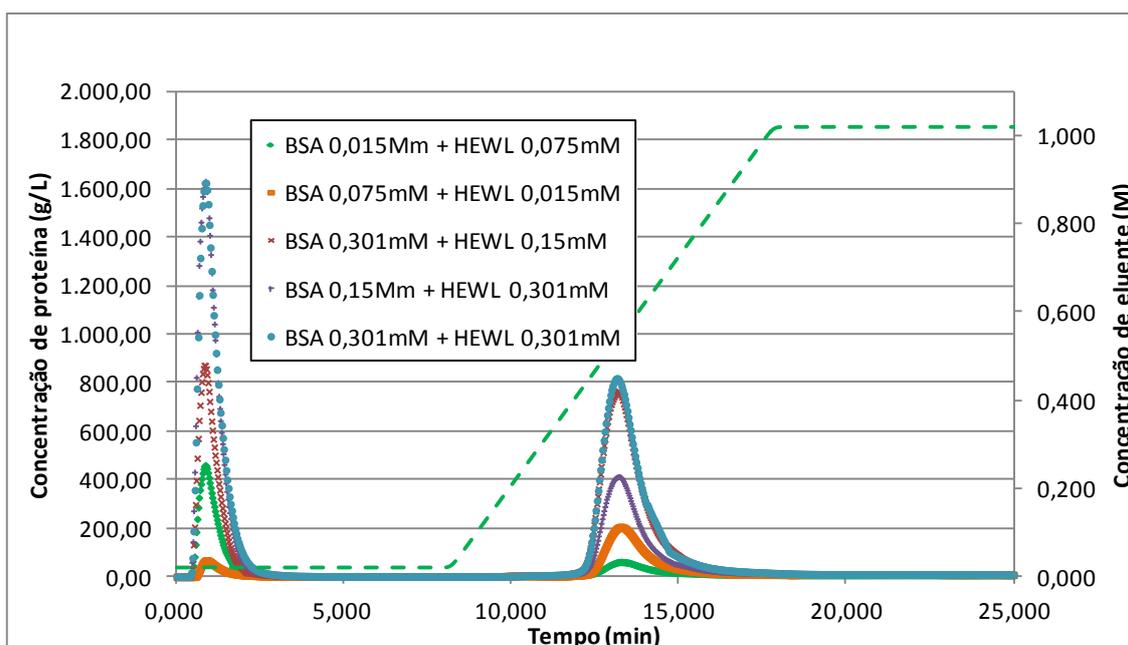


Figura 5.22 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes concentrações iniciais da mistura de proteínas – Coluna HiTrap™ Cpto™ DEAE (1 mL) tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente 10 CV

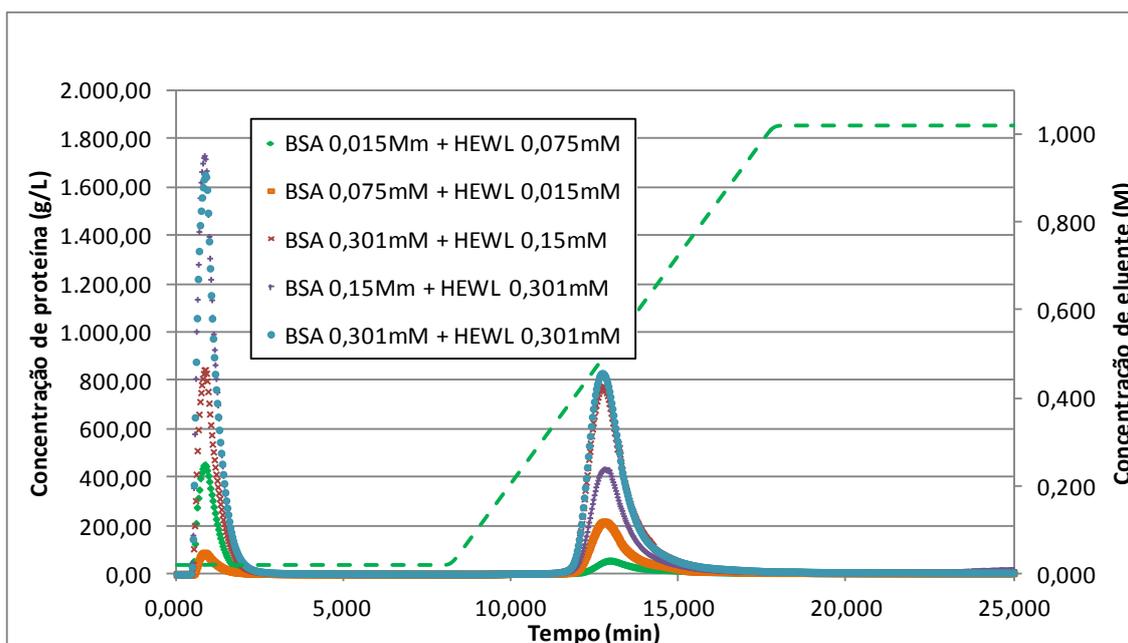


Figura 5.23 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes concentrações iniciais da mistura de proteínas – Coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL) tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente 10 CV

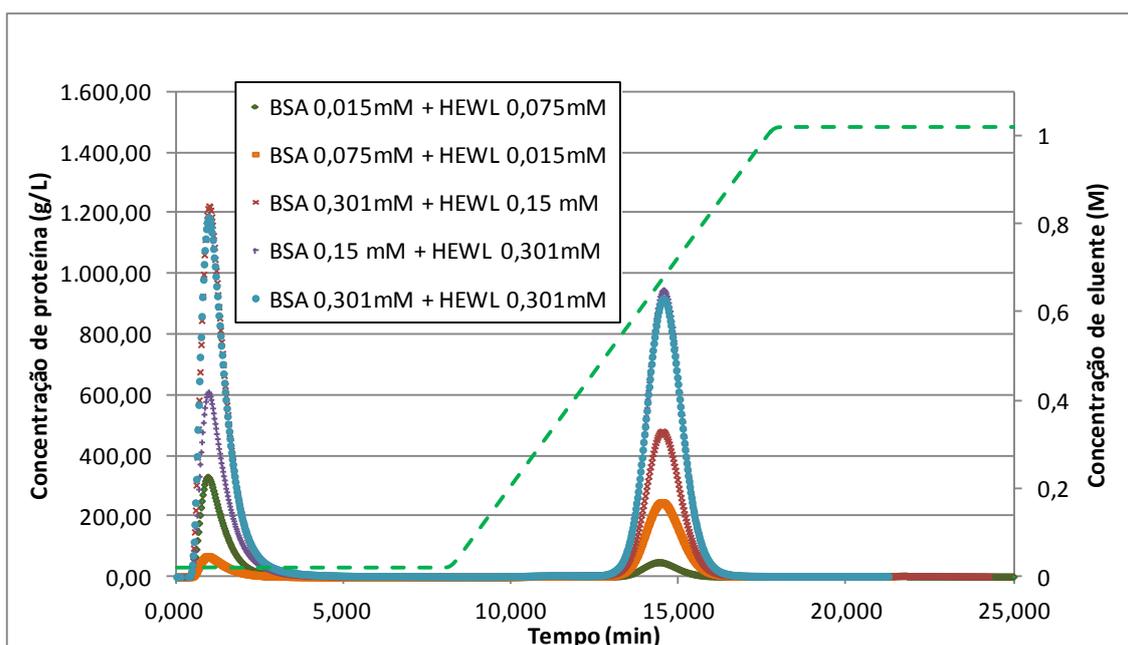


Figura 5.24 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes concentrações iniciais da mistura de proteínas – Coluna HiTrap™ SP FF (1 mL) tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente 10 CV

As Figuras 5.25, 5.26 e 5.27 apresentam a comparação dos resultados da série de experimentos do tipo "C" para verificação da influência da variação da concentração e do pH do tampão.

Verifica-se que o volume de retenção da BSA na resina Capto™ DEAE não é muito influenciada pela variação do pH, diferentemente da adsorção da mesma proteína em resina Capto™ Q (Figura 5.26) e da adsorção da lisozima em resina SP FF (Figura 5.27).

O aumento do pH desloca o volume de retenção da BSA na resina Capto™ Q para direita no gráfico da Figura 5.26, o que significa uma maior adsorção da BSA nessa resina com o aumento do pH do tampão. Esse comportamento é esperado visto que a carga líquida da BSA aumenta com o aumento do pH. Por outro lado na Figura 5.27 vemos que a o volume de retenção da lisozima em resina SP FF diminui com o aumento do pH do tampão. Esse comportamento se dá porque esta proteína tem sua carga líquida reduzida com o aumento do pH do meio.

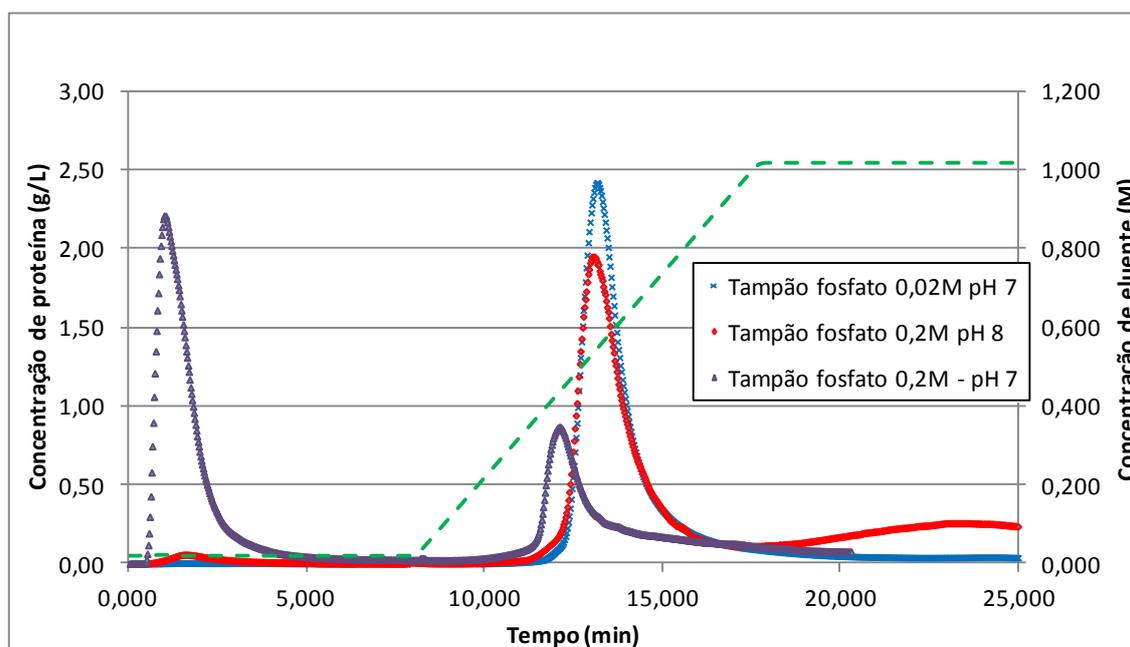


Figura 5.25 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes condições do tampão – Coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), proteína BSA, gradiente 10 CV

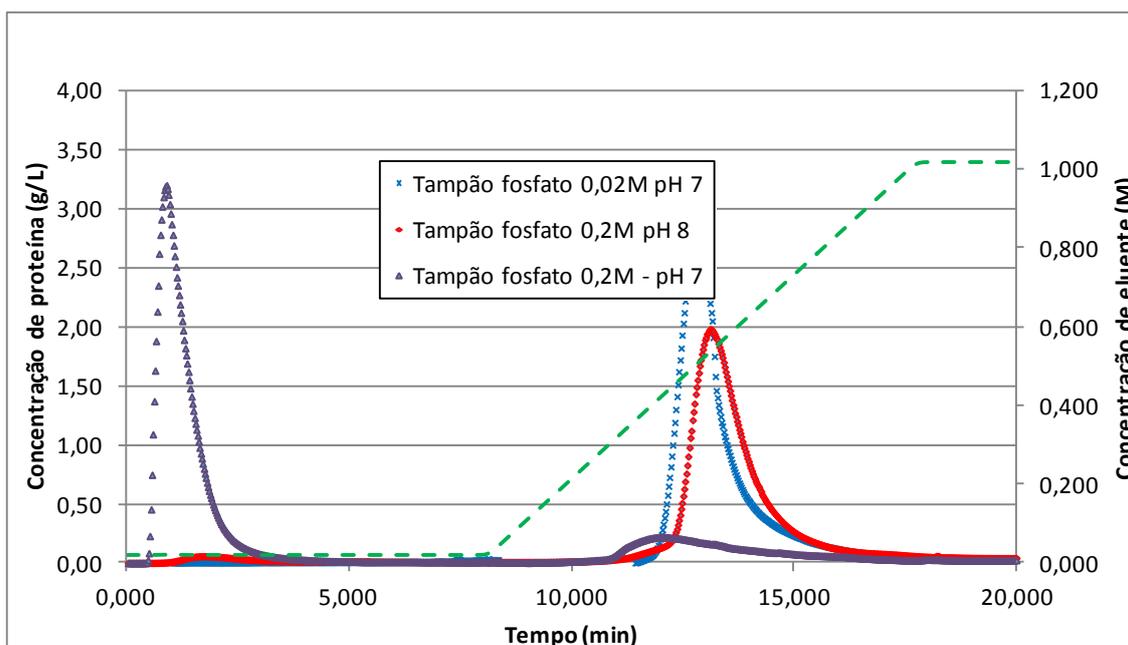


Figura 5.26 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes condições do tampão – Coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), proteína BSA, gradiente 10 CV

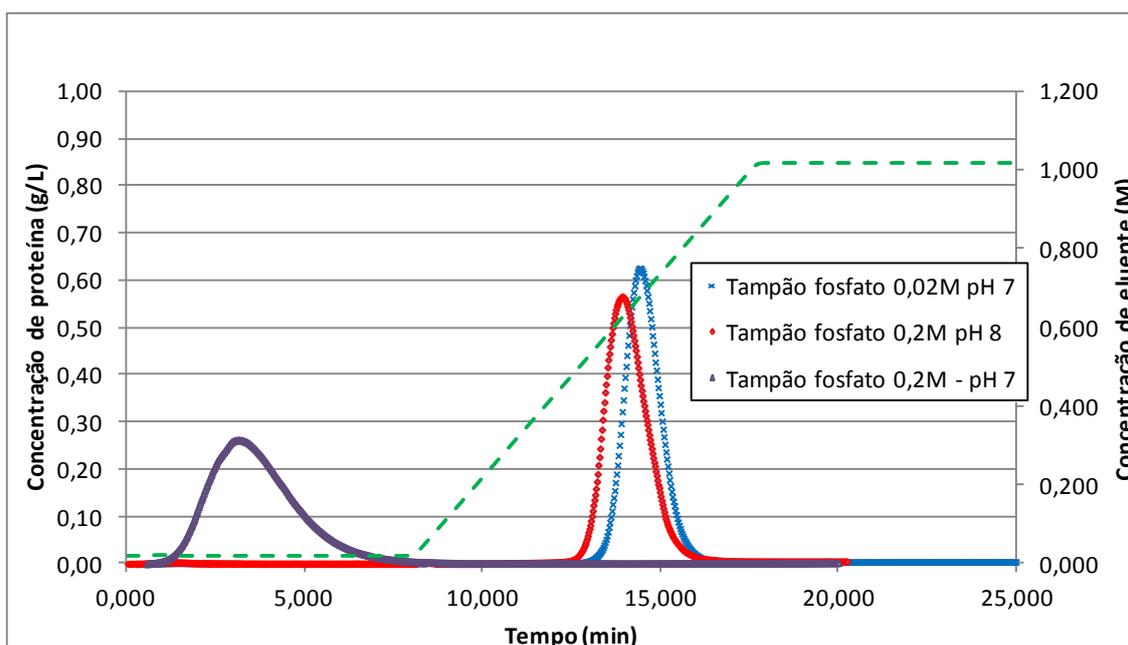


Figura 5.27 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes condições do tampão – Coluna HiTrapTM SP FF (1 mL), proteína lisozima, gradiente 10 CV

As Figuras 5.28, 5.29, 5.30, 5.31, 5.32 e 5.33 apresentam a comparação dos resultados da série de experimentos do tipo "D" para verificação da influência do tamanho do gradiente.

Os gráficos da eluição de lisozima na coluna HiTrapTM SP FF (Figuras 5.32 e 533) deixam evidente como o comportamento da adsorção dessa proteína nesta resina é simétrico, mais próximo do ideal e, conseqüentemente, bastante diferente da adsorção da BSA.

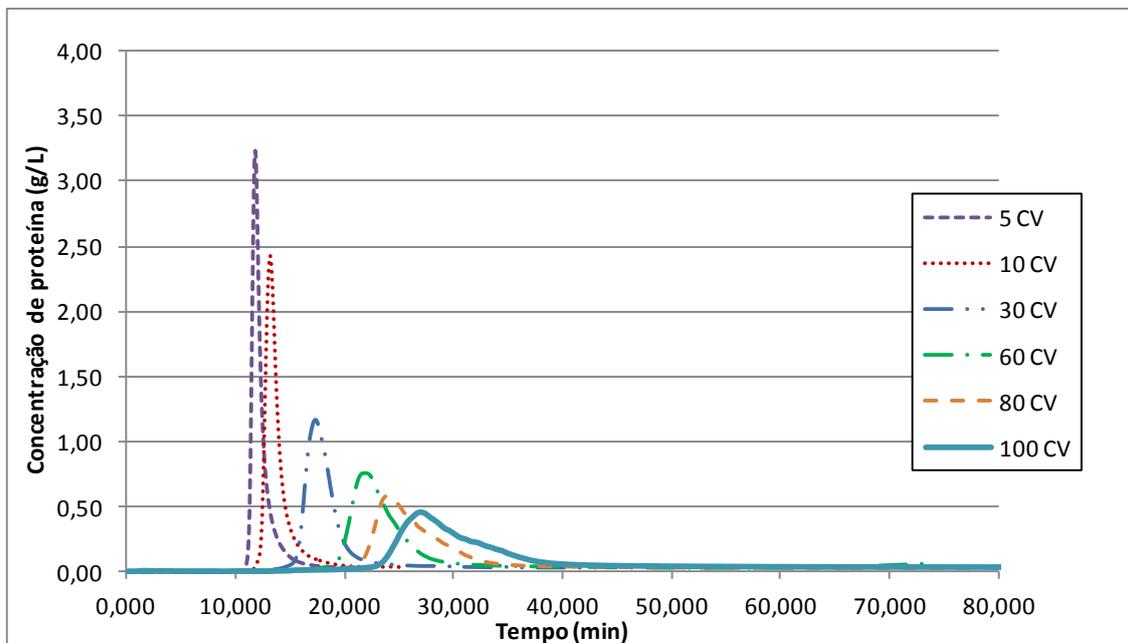


Figura 5.28 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes gradientes – Coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), proteína BSA (0,075mM), tampão fosfato 0,02M, pH 7

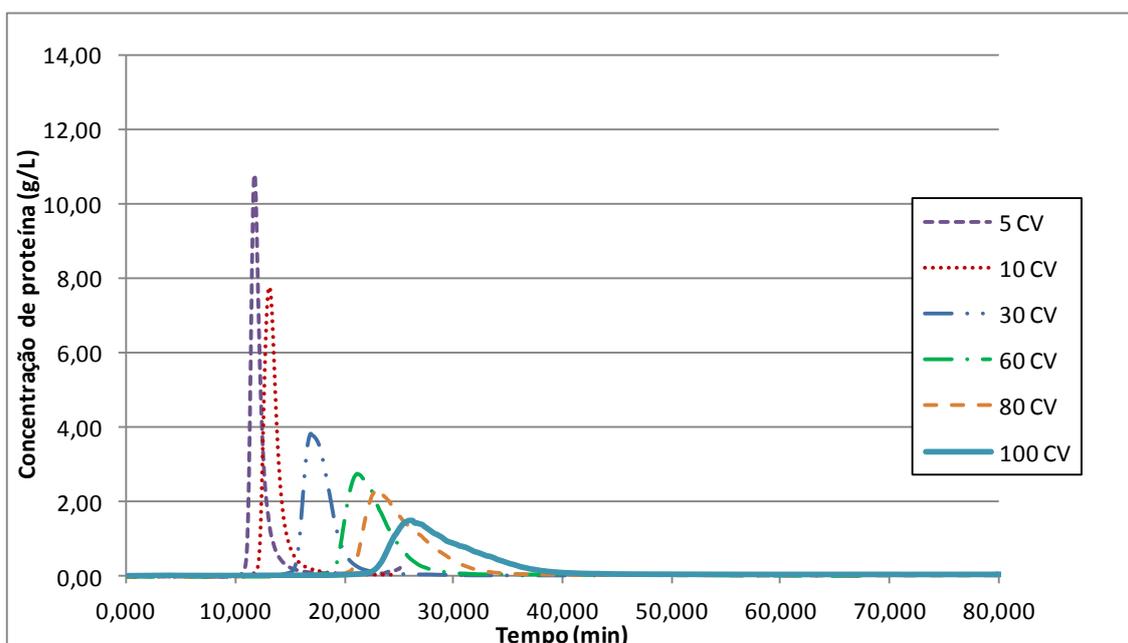


Figura 5.29 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes gradientes – Coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), proteína BSA (0,301mM), tampão fosfato 0,02M, pH 7

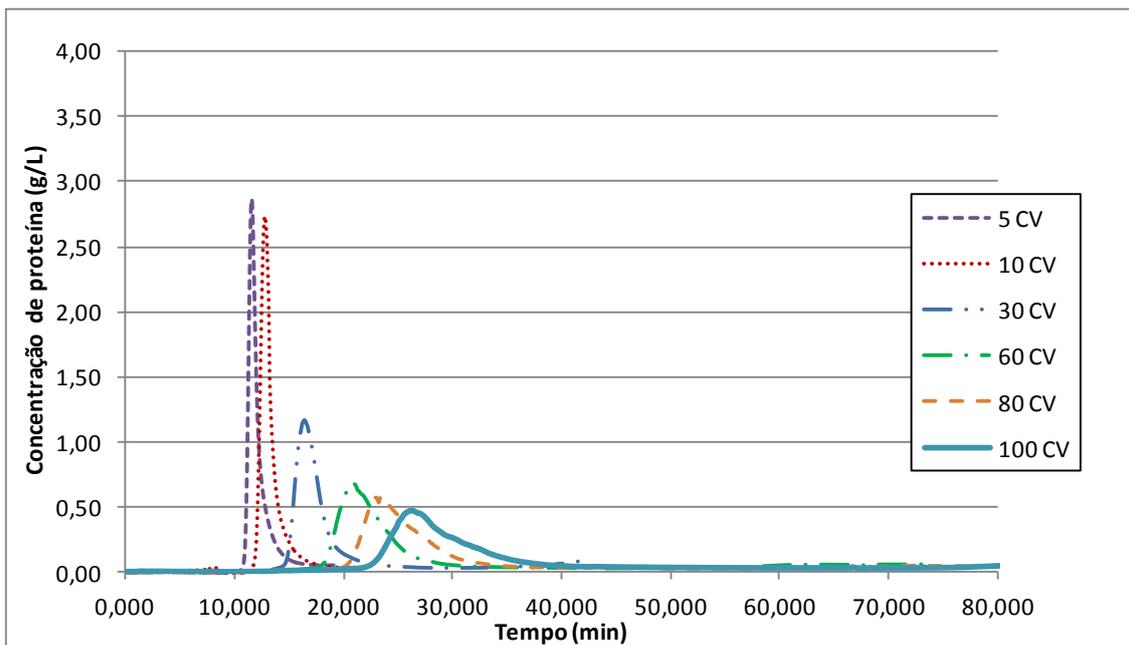


Figura 5.30 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes gradientes – Coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), proteína BSA (0,075mM), tampão fosfato 0,02M, pH 7

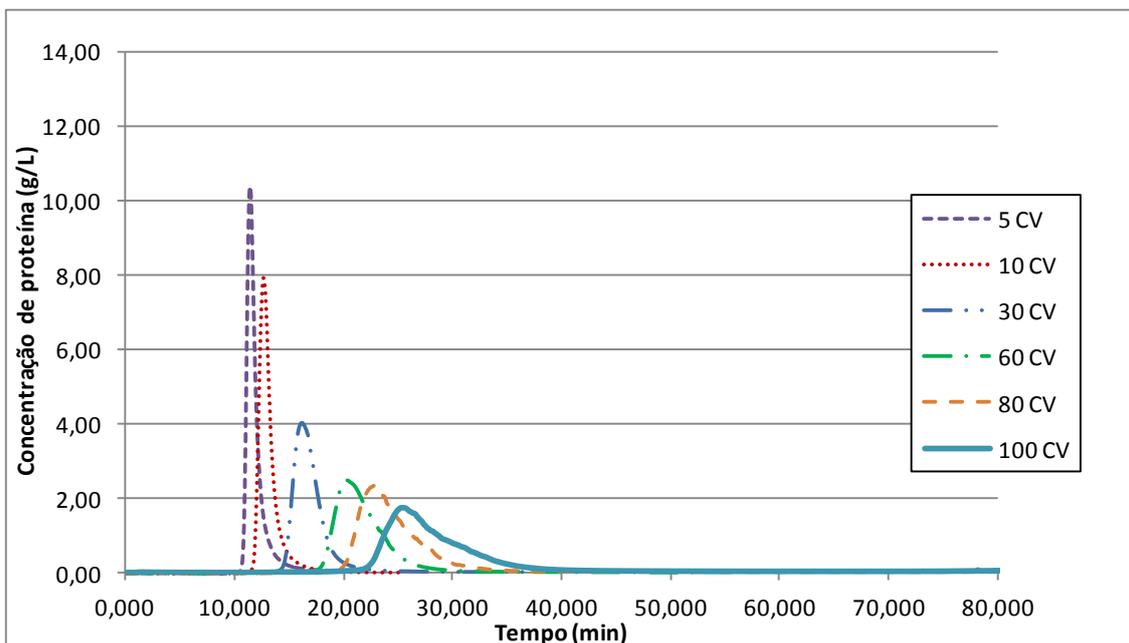


Figura 5.31 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes gradientes – Coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), proteína BSA (0,301mM), tampão fosfato 0,02M, pH 7

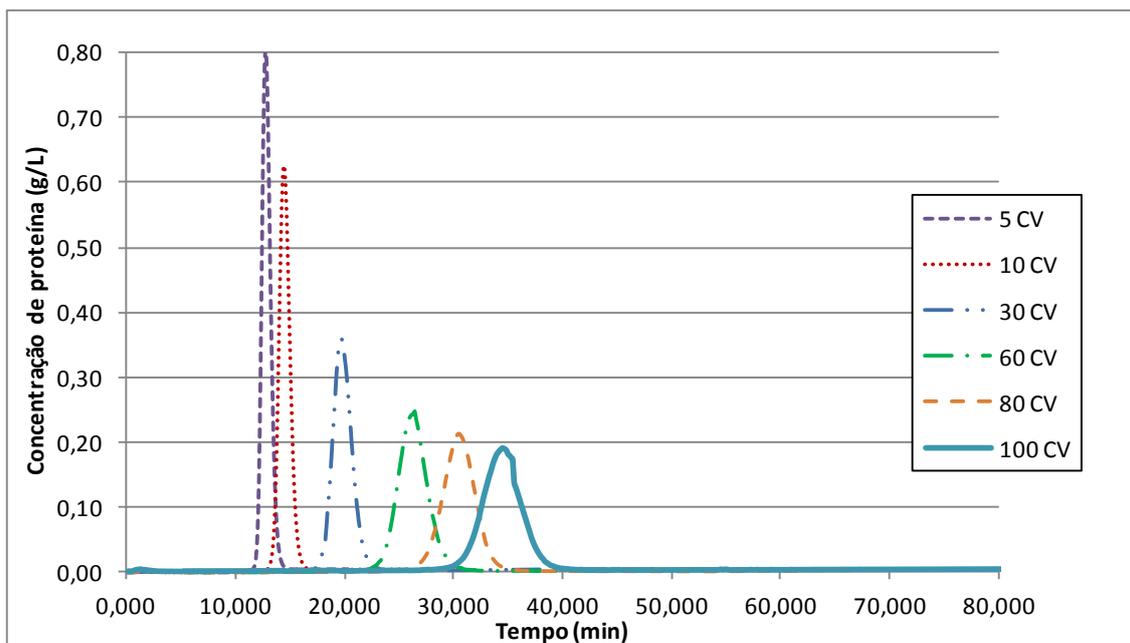


Figura 5.32 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes gradientes – Coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), proteína lisozima (0,075mM), tampão fosfato 0,02M, pH 7

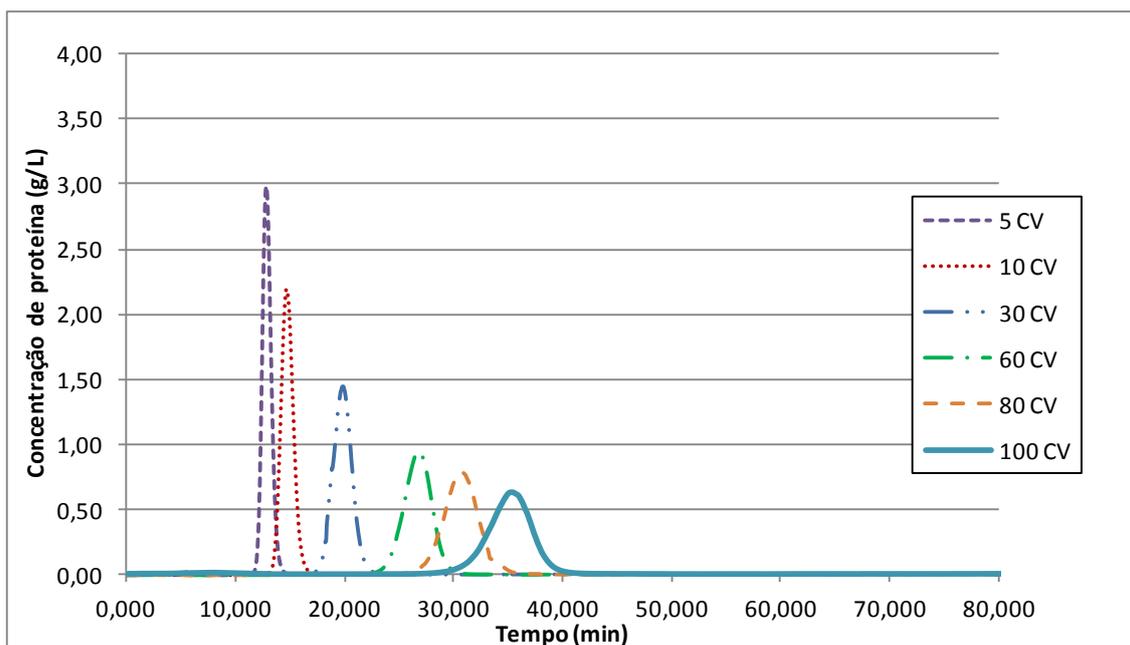


Figura 5.33 – Variação do perfil cromatográfico com diferentes gradientes – Coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), proteína lisozima (0,301mM), tampão fosfato 0,02M, pH 7

5.4 Verificação do erro experimental

A fim de verificar a repetitividade dos resultados obtidos, o experimento D36 foi repetido três vezes. Para esta repetição, foi utilizada a mesma solução de proteína e os mesmos tampões, sendo realizada no mesmo dia.

Trata-se da solução de lisozima em tampão fosfato 0,02M, pH7 com concentração de injeção de 0,301mM, coluna HiTrapTM SP FF com volume de 1 mL e gradiente de 5CV.

A Tabela 5.5 apresenta os volumes de retenção obtidos. Verifica-se excelente repetitividade dos resultados. O volume de retenção V_R^{EMG} calculado nos três experimentos é idêntico, de modo que é possível negligenciar o erro estatístico proveniente do cromatógrafo comercial (detector de UV, misturador, injetor de amostra). Erros sistemáticos não foram avaliados nesta análise.

Tabela 5.5 – Verificação da reprodutibilidade dos resultados

Experimento	Coluna	Proteína	Tampão	Gradiente (CV)	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	$\sigma_{V_R}^2$	
D36 / 1	HiTrap TM SP FF / 1 mL	Lisozima 0,301 mM	Fosfato	5	12,76	12,84	0,00128	
D36 / 2			0,02M /		12,76			0,00131
D36 / 3			pH 7		12,75			0,00119

A fim de verificar a reprodutibilidade alguns experimentos foram realizados em dias diferentes e com soluções diferentes. A Tabela 5.6 apresenta os resultados obtidos. O desvio padrão experimental varia entre 0,03 a 0,8, podendo-se assumir o valor máximo do desvio padrão dos experimentos como sendo 0,8mL.

Tabela 5.6 – Verificação do erro experimental

Experimento	Coluna	Proteína	Tampão	Gradiente (CV)	V_R^{max} (mL)	$\sigma_{V_R}^{2,max}$	V_R^{EMG} (mL)	$\sigma_{V_R}^{2,EMG}$
A7 / 1	HiTrap TM	BSA	Fosfato	10	12,88	0,08	13,44	0,2
A7 / 2	Capto TM Q - 1mL	0,150 mM	0,02M / pH 7		12,77		13,10	

Tabela 5.6 – Continuação

Experimento	Coluna	Proteína	Tampão	Gradiente (CV)	V_R^{max} (mL)	$\sigma_{V_R^{max}}$	V_R^{EMG} (mL)	$\sigma_{V_R^{EMG}}$
A19/1	HiTrap™ SP	Lisozima	Fosfato	10	14,00	0,4	14,64	0,03
A19/2	FF - 1mL	0,301 mM	0,02M / pH 7		14,52		14,60	
B2/1	HiScreen™	BSA	Fosfato	10	44,70	0,09	45,98	0,8
B2/2	Capto™ Q - 4,7mL		0,301mM		0,02M / pH 7		44,83	

5.5 Conclusões Parciais

Os resultados experimentais encontram-se dentro do esperado teoricamente. A correlação dos resultados com os modelos propostos será objeto do próximo capítulo.

Pode-se verificar que a eluição da lisozima apresenta picos simétricos, enquanto a eluição da BSA nas resinas estudadas apresenta picos assimétricos com formação de uma cauda. Esse comportamento é frequentemente observado na literatura (SCHULTE e EPPING, 2005).

O pH do tampão não influenciou de forma significativa a adsorção da BSA em resina Capto™ DEAE, mas deslocou o volume de retenção da BSA na coluna HiTrap™ Capto™ Q e da lisozima na coluna HiTrap™ SP FF. Já o aumento da concentração do tampão de 0,02M para 0,2M fez com que as proteínas adsorvessem apenas parcialmente, sendo a maior parte eluída durante a lavagem das colunas.

O aumento do volume da coluna apresentou comportamento dentro do esperado, de forma que o pico de eluição das proteínas teve comportamento qualitativamente similar tanto nas colunas de 1mL (HiTrap™) quanto nas colunas de 4,7mL (HiScreen™).

CAPÍTULO 6

Resultados da Parte Teórica

Neste capítulo são apresentados os resultados da parte teórica desta pesquisa de tese. A primeira seção traz os resultados do estudo de equilíbrio termodinâmico e determinação dos parâmetros do modelo UNIQUAC para BSA e lisozima. As demais seções apresentam os resultados da modelagem da curva de eluição com a estimação de parâmetros do modelo apresentado no Capítulo 4.

6.1 Modelagem termodinâmica

A validação da rotina computacional para estimação de parâmetros do modelo termodinâmico foi realizada reproduzindo a metodologia e os resultados presentes em Avena e colaboradores (1997). Os resultados de validação encontram-se no Apêndice C.

Foi realizada, para todos os sistemas, a estimação simultânea dos parâmetros do modelo de G^E que não se encontravam disponíveis na literatura. Ou seja, quatro parâmetros de interação energética do termo residual do modelo UNIQUAC ($u_{ps/ptm}$, $u_{ptm/ptm}$, $u_{ptm/a}$, $u_{ptm/c}$) e os parâmetros de forma e volume das proteínas (r_{ptm} , q_{ptm}). Os resultados são apresentados na Tabela 6.1.

Os autores dos trabalhos de onde foram retirados os dados experimentais não reportaram o erro experimental para que fosse possível realizar uma avaliação se os desvios do modelo estão compatíveis com o erro experimental. Haynes e colaboradores (1992) reportam um erro experimental quadrático médio de até 4 mmHg² na pressão osmótica, o que equivale à aceitação de desvios da forma RMSD de até 2% para

soluções salinas de α -quimotripsina. Utilizando-se esse valor como balizador pode-se dizer que de forma geral os desvios encontrados estão dentro do erro experimental médio. Entretanto, alguns resultados apresentam desvios altos que podem ser decorrentes de ótimos locais do método de otimização (especialmente em E.C.5, E.C.6 e E.C.7), decorrentes de erros experimentais mais elevados, e também devido à complexidade e não idealidade dos sistemas com concentrações salinas mais elevadas (E.C.1 e E.C.3).

Ainda assim, desvios do modelo de até 20% são considerados satisfatórios e compatíveis com desvios apresentados na revisão bibliográfica de trabalhos contendo a modelagem de sistemas com biomoléculas, como por exemplo, Lin e colaboradores (2001) que obtiveram desvios de até 20% na modelagem da pressão osmótica de soluções proteicas.

Tabela 6.1 – Parâmetros binários de interação energética e parâmetros de forma e volume estimados para cada sistema

Sistema	$u_{ps/ptn}$ (1/K)	$u_{ptn/ptn}$ (1/K)	$u_{ptn/c}$ (1/K)	$u_{ptn/a}$ (1/K)	r_{ptn}	q_{ptn}	RMSD (%)
E.C.1	599,490	1042,433	3946,657	1593,402	124,393	888,422	9,03
E.C.2	825,329	4999,926	4426,310	2369,445	1806,119	874,677	0,95
E.C.3	768,118	1110,824	732,760	2024,544	600,331	166,577	37,09
E.C.4	931,621	1023,192	4183,699	4992,602	390,130	337,152	0,45
E.C.5	2828,382	3497,704	2492,668	2703,908	100,006	1812,955	3,18
E.C.6	4365,866	4433,379	4530,408	4667,222	300,355	350,110	4,40
E.C.7	2794,454	2959,911	3879,863	3927,950	105,423	288,224	5,26
E.C.8	896,113	872,189	4984,405	769,336	115,096	100,608	1,98
E.C.9	1713,575	1769,459	1227,146	5000,000	173,121	236,817	2,05
E.C.10	1296,175	1296,678	938,126	1344,109	107,128	141,749	1,98

* O sistema selecionado para utilização dos parâmetros estimados foi grifado para facilitar a compreensão da estratégia utilizada.

Os coeficientes de atividade experimentais e calculados de todos os sistemas estudados são apresentados nas Figuras 6.1 a 6.10 que se seguem, onde os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.

Os sistemas de BSA em solução aquosa de NaCl (E.C.1, E.C.2 e E.C.3) podem ser visualizados nas Figuras 6.1, 6.2 e 6.3. Os desvios são elevados, especialmente no

sistema E.C.3. Entretanto, pode-se verificar na Figura 6.3 que o maior desvio ocorre em concentrações altas de proteína, quando o coeficiente de atividade atinge ordem de grandeza acima dos demais. Nesses sistemas os dados modelados chegam a concentrações de proteína de até 150 g/L.

Apesar de Yousef e colaboradores (2001) citarem trabalhos onde foi realizada a extensão do uso da expansão do virial para soluções com altas concentrações (BULL e BREESE, 1972) e na maioria dos trabalhos de modelagem não se fazer qualquer referência à validade dos modelos, Haynes e colaboradores (1992) e Moon e colaboradores (2000b) afirmam que a expansão só é válida para soluções nas quais as forças intermoleculares são suficientemente de curto-alcance para garantir a convergência das integrais presentes na dedução do modelo. Assim, a expansão só seria válida para soluções diluídas de proteínas (até 10 g/L).

O uso apenas de dados de soluções diluídas de BSA acarretaria uma diminuição do desvio do modelo. Entretanto, optou-se por manter os dados completos para ampliar a faixa de aplicação dos parâmetros.

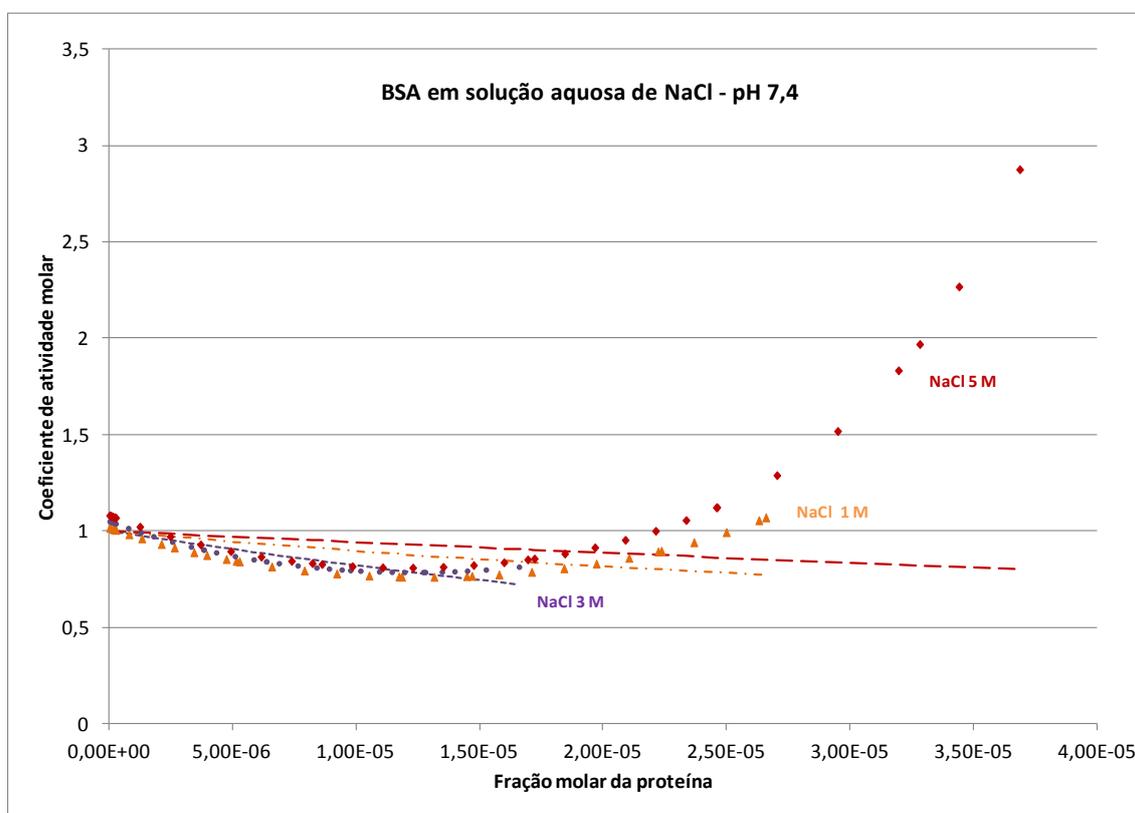


Figura 6.1 – Sistema E.C.1 - Coeficiente de atividade da BSA em solução aquosa de NaCl em pH 7,4. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.

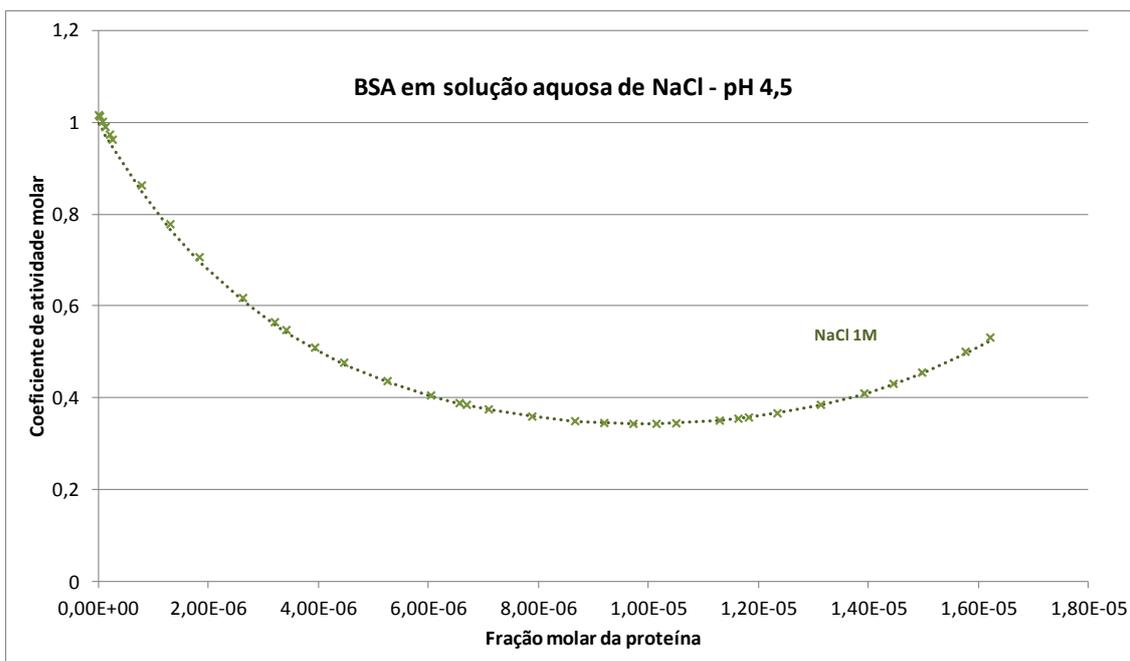


Figura 6.2– Sistema E.C.2 - Coeficiente de atividade da BSA em solução aquosa de NaCl em pH 4,5. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.

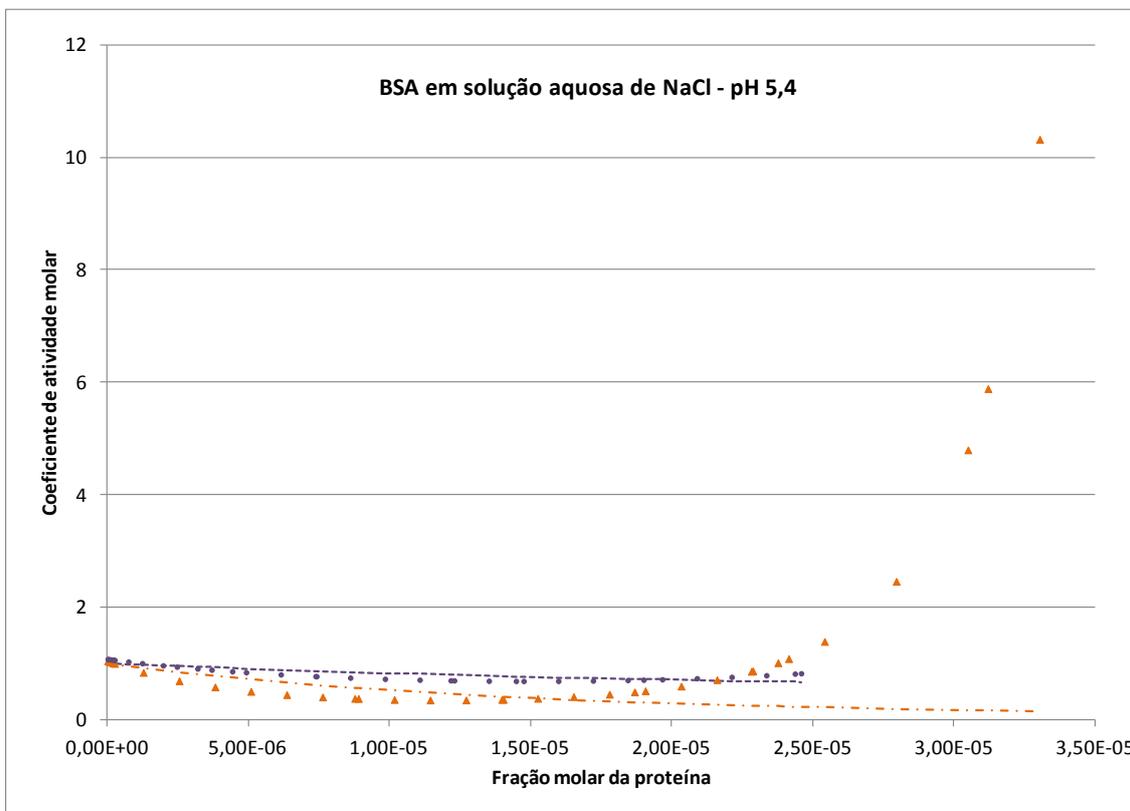


Figura 6.3 – Sistema E.C.3 - Coeficiente de atividade da BSA em solução aquosa de NaCl em pH 5,4. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.

As Figuras 6.4, 6.5, 6.6 e 6.7 apresentam os coeficientes de atividade da BSA em soluções aquosas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A faixa de concentração de proteína de tais sistemas é menor que nos sistemas anteriores.

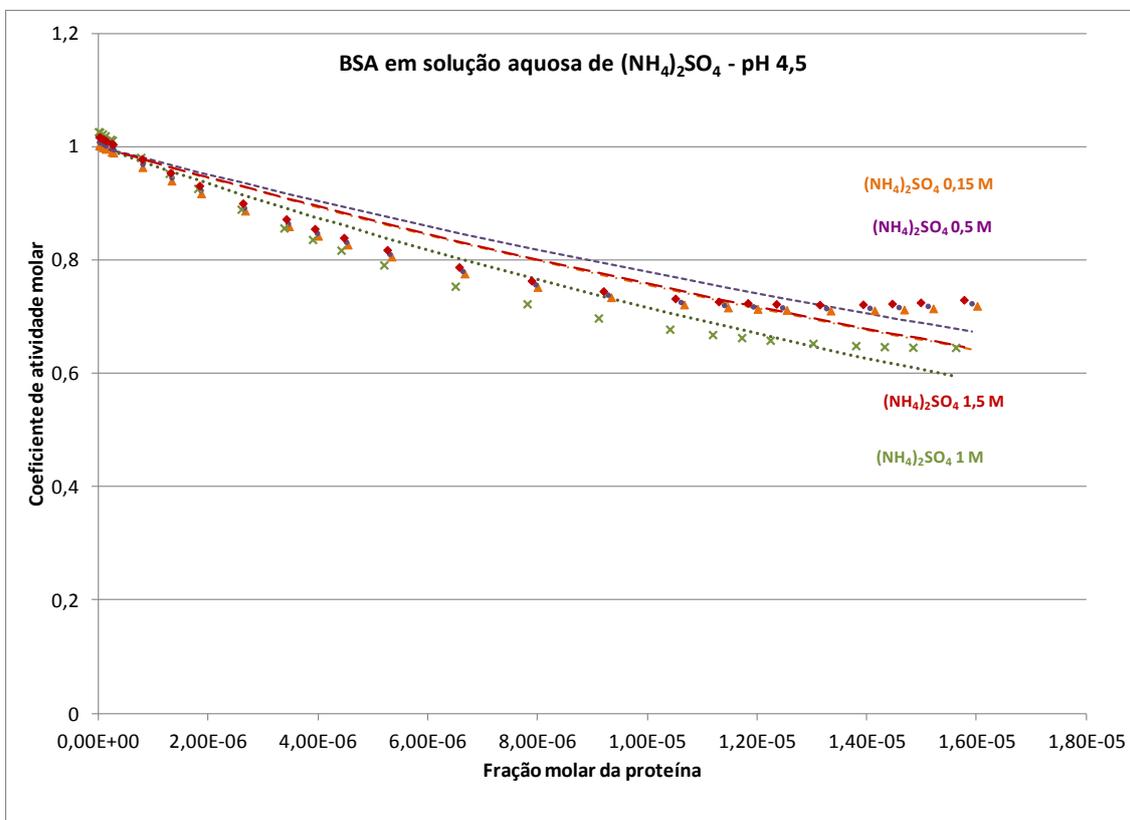


Figura 6.4 – E.C.4 - Coeficiente de atividade molar da BSA em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 4,5. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.

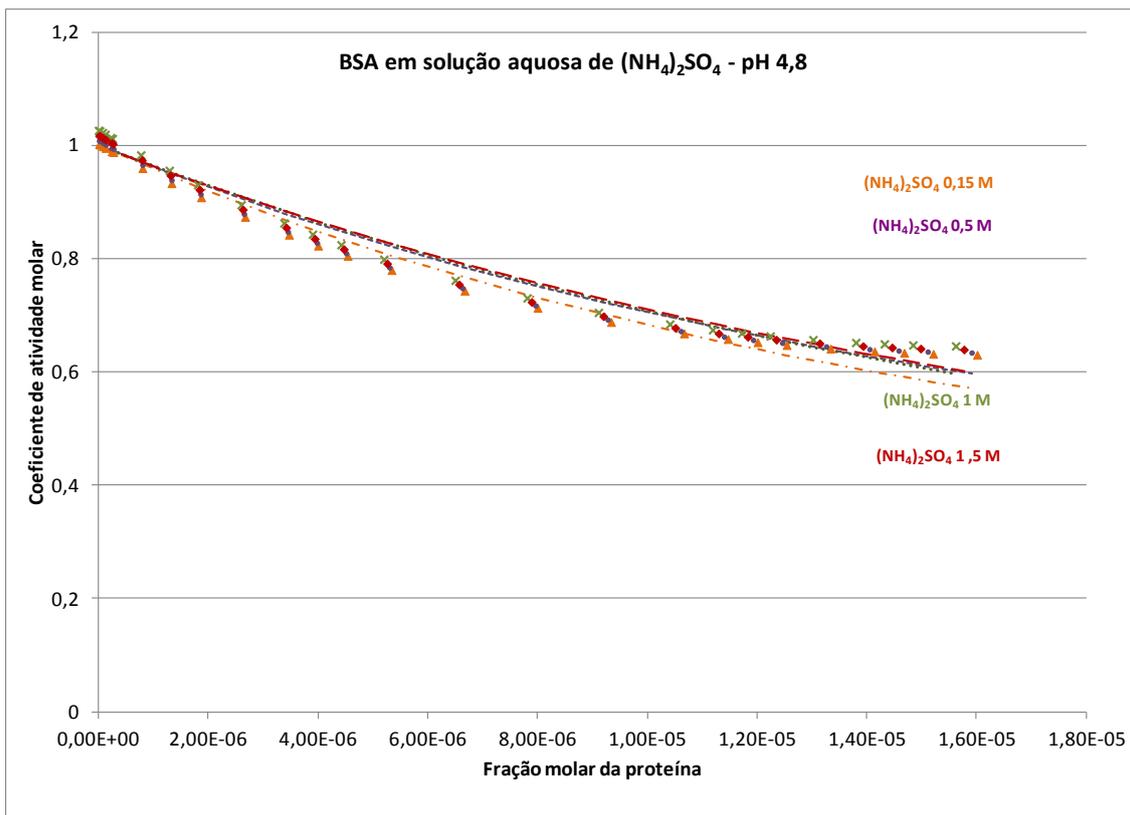


Figura 6.5 – E.C.5 - Coeficiente de atividade molar da BSA em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 4,8. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.

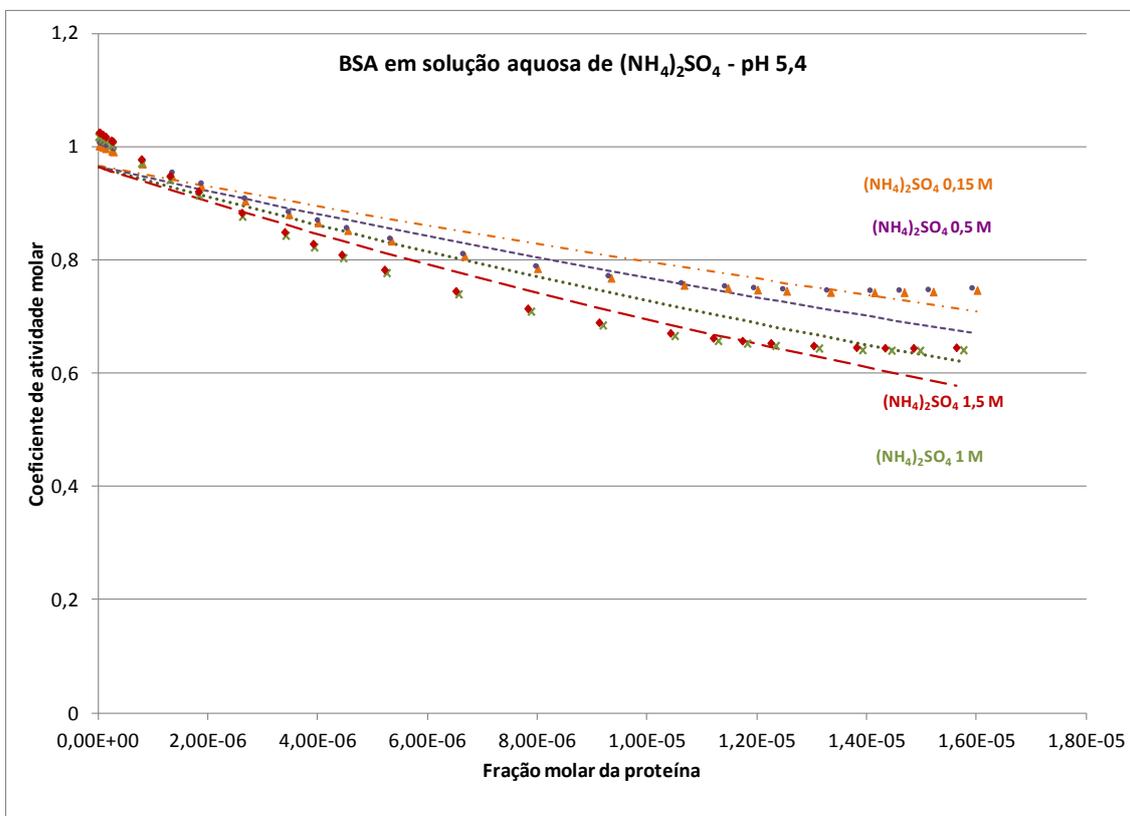


Figura 6.6 – E.C.6 - Coeficiente de atividade molar da BSA em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 5,4. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.

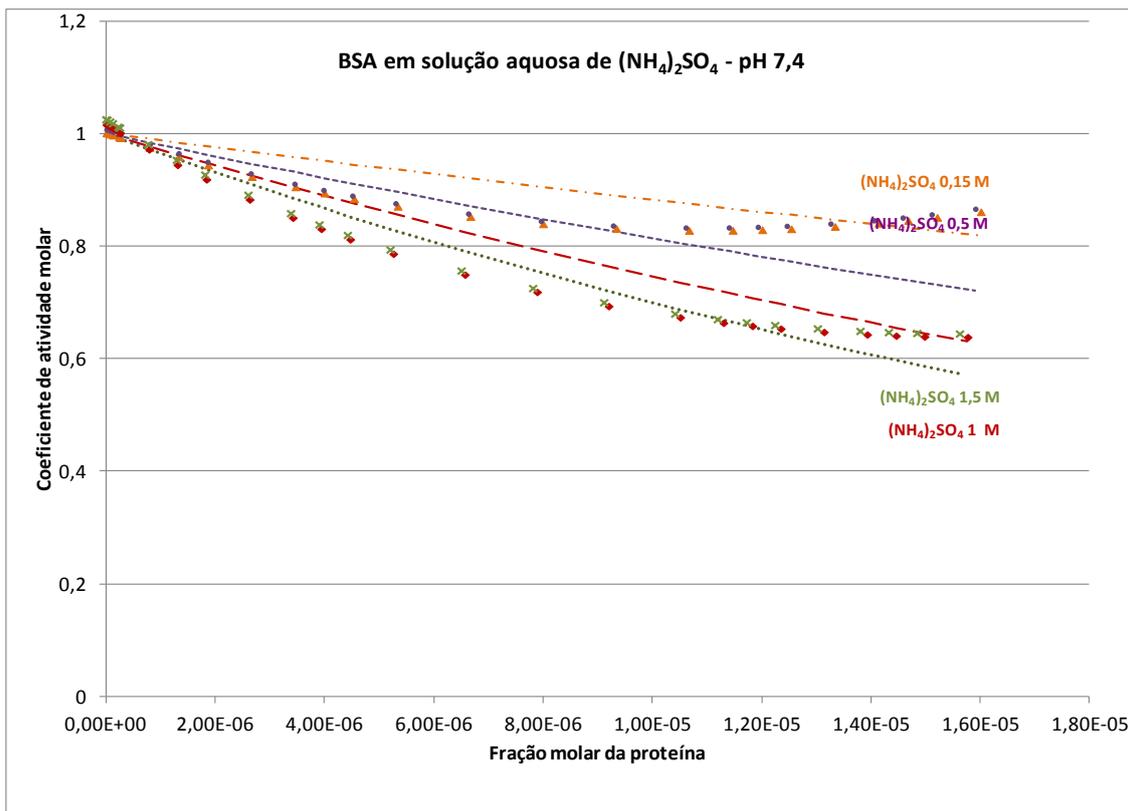


Figura 6.7 – E.C.7 - Coeficiente de atividade molar da BSA em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 7,4. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.

As Figuras 6.8, 6.9 e 6.10 trazem os sistemas formados por lisozima.

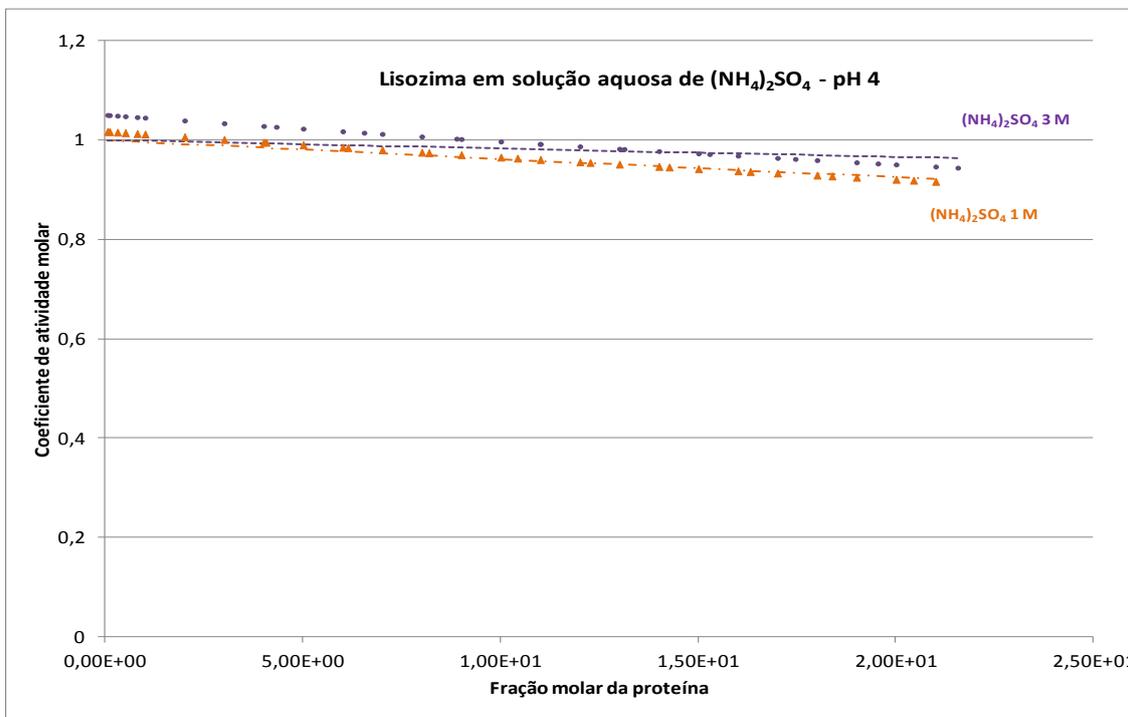


Figura 6.8 – E.C.8 - Coeficiente de atividade molar de Lisozima em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 4,0. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.

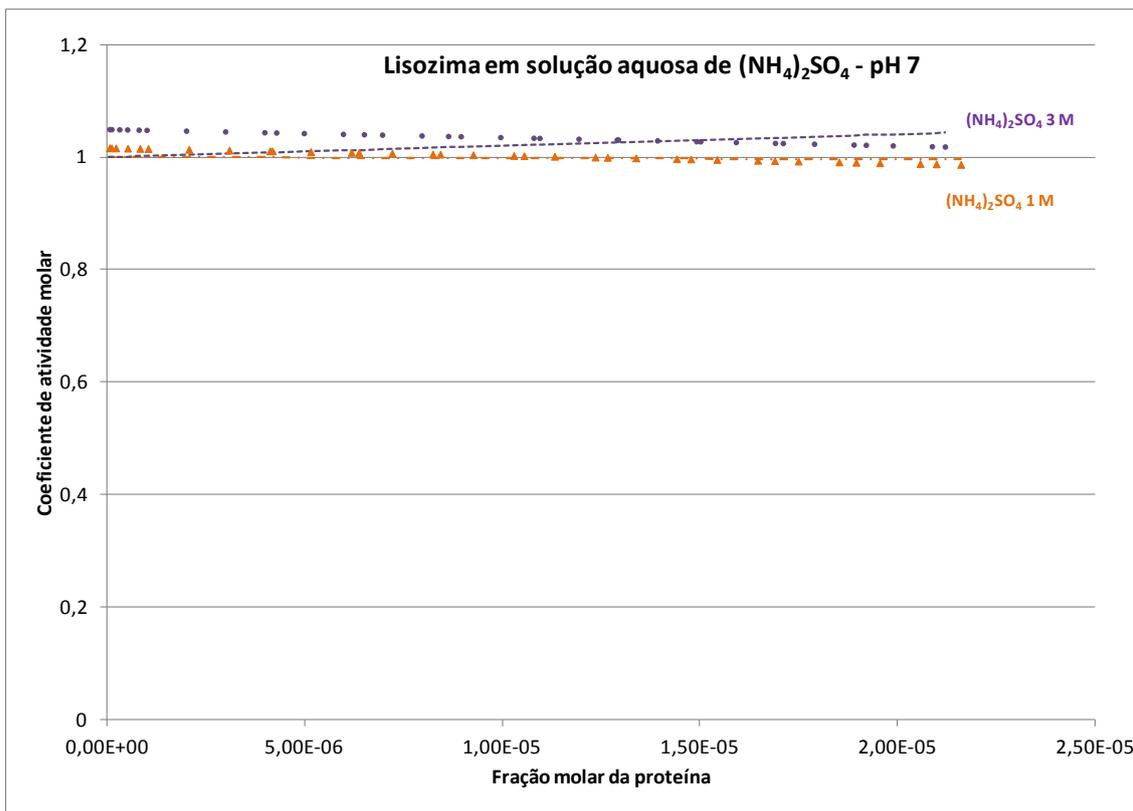


Figura 6.9 – E.C.9 - Coeficiente de atividade molar de Lisozima em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 7,0. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.

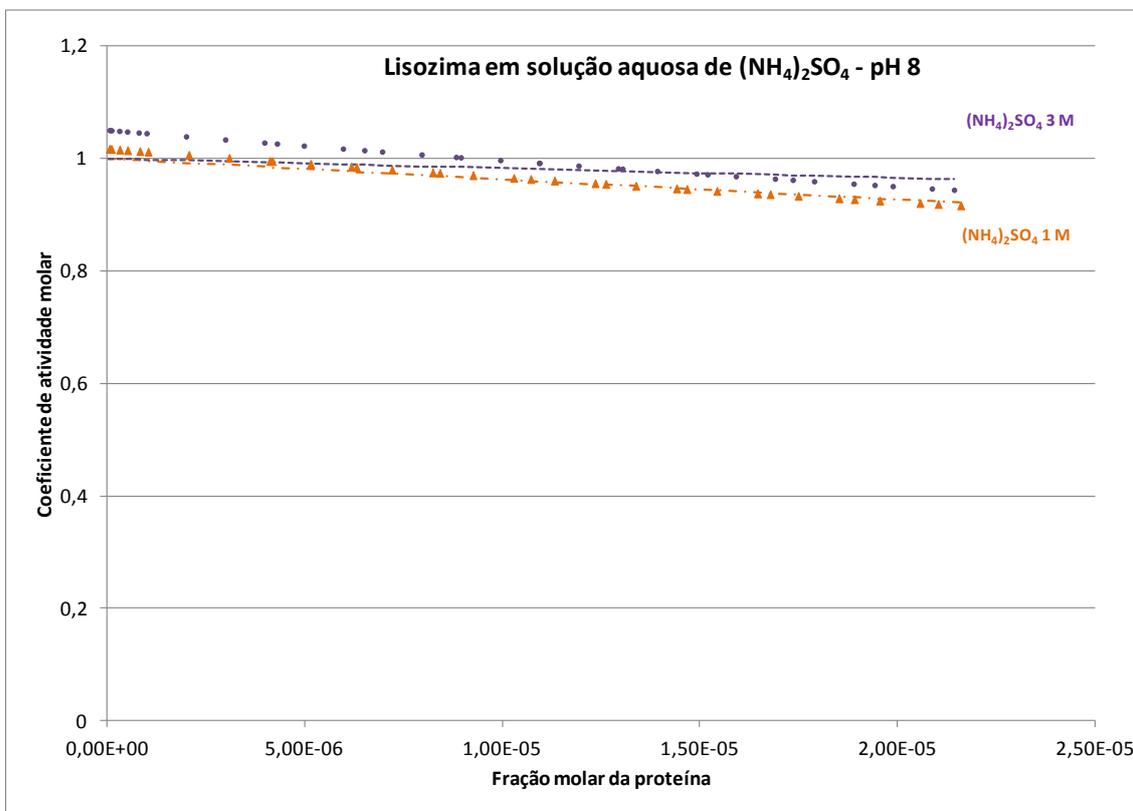


Figura 6.10 – E.C.10 - Coeficiente de atividade molar de Lisozima em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 8,0. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.

A partir dos resultados reportados na Tabela 6.1, buscou-se reduzir o número de parâmetros a serem estimados. Para isso procurou-se manter o mesmo valor de r_{pm} , q_{pm} , $U_{pm/pm}$ e $U_{pm/ps}$ para todos os sistemas de mesma proteína.

Os parâmetros de interação energética deveriam ser independentes do pH, com exceção do parâmetro pseudossolvente/proteína, visto que em diferentes pH o pseudossolvente seria distinto. Contudo, está sendo utilizado para o pseudossolvente os parâmetros da água pura (r_{ps} , q_{ps} , $U_{ps/a}$, $U_{ps/c}$, $U_{ps/ps}$) de tal forma que é razoável utilizar o parâmetro $U_{pms/ps}$ constante e independente do pH.

Quanto aos parâmetros de forma e volume do UNIQUAC, seria possível aceitar valores de r_{pm} e q_{pm} diferentes para cada pH, uma vez que as proteínas sofrem alterações conformacionais com o pH o que gera alterações em sua forma e volume. Em particular para a BSA, já foi reportado que a proteína possui diferentes conformações dependendo do pH (BARBOSA *et al.*, 2010).

Entretanto, para tornar o modelo mais prático e simples justifica-se o uso de parâmetros independentes do pH.

A primeira estratégia utilizada para os parâmetros da BSA foi, então, utilizar os parâmetros estimados em pH 5,4 visto que os dados experimentais são os dados disponíveis em pH mais próximo do ponto isoelétrico desta proteína (segundo Fologea e colaboradores (2007) entre pH 5,1 a 5,5). Dessa forma buscou-se reduzir a influência do pH nos parâmetros.

Empregou-se os valores estimados para o Estudo de Caso 6 que possui dados de um sistema de BSA em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em concentração 0,15M, 0,5M, 1M e 1,5M. Na Tabela 6.1 o sistema selecionado foi grifado com uma coloração mais escura para facilitar a observação. Esse sistema foi escolhido por possuir dados em concentração salina em faixa similar aos sistemas estudados na curva de eluição. Os elevados desvios encontrados na estimação de parâmetros do Estudo de Caso 3 se devem, principalmente, aos efeitos da concentração salina.

A Tabela 6.2 apresenta o resultado do desvio para os estudos E.C.4, E.C.5 e E.C.7 utilizando os parâmetros do E.C.6.

Tabela 6.2 – Desvios encontrados para cada estudo de caso ao empregar os mesmos parâmetros estimados para o E.C.6

Sistema	$U_{ps/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/NH4}$ (1/K)	$U_{BSA/SO4}$ (1/K)	r_{BSA}	q_{BSA}	RMSD (%)
E.C.4	4365,866	4433,379	4530,408	4667,222	300,355	350,110	5,95
E.C.5	4365,866	4433,379	4530,408	4667,222	300,355	350,110	9,95
E.C.6	4365,866	4433,379	4530,408	4667,222	300,355	350,110	4,40
E.C.7	4365,866	4433,379	4530,408	4667,222	300,355	350,110	6,12

* O sistema selecionado para utilização dos parâmetros estimados foi grifado para facilitar a compreensão da estratégia utilizada.

Para os sistemas E.C.1, E.C.2 e E.C.3 os parâmetros $U_{pm/a}$ e $U_{pm/c}$ precisaram ser estimados. Os resultados são apresentados na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 – Desvios encontrados com parâmetros binários de interação energética proteína/íon reestimados para cada sistema BSA/NaCl

Sistema	$U_{ps/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/Na}$ (1/K)	$U_{BSA/Cl}$ (1/K)	r_{BSA}	q_{BSA}	RMSD (%)
E.C.1	4365,866	4433,379	4101,570	4400,698	300,355	350,110	18,20
E.C.2	4365,866	4433,379	5000,000	5000,000	300,355	350,110	81,06
E.C.3	4365,866	4433,379	4954,450	4683,313	300,355	350,110	46,15

* O sistema selecionado para utilização dos parâmetros estimados foi grifado para facilitar a compreensão da estratégia utilizada.

Seguindo a mesma abordagem, foram utilizados os parâmetros estimados em pH 5,4 para simulação dos demais sistemas. Os resultados são apresentados na Tabela 6.4.

Tabela 6.4 – Desvios encontrados com parâmetros binários de interação energética proteína/íon fixo para todos os sistema BSA/NaCl

Sistema	$U_{ps/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/Na}$ (1/K)	$U_{BSA/Cl}$ (1/K)	r_{BSA}	q_{BSA}	RMSD (%)
E.C.1	4365,866	4433,379	4954,450	4683,313	300,355	350,110	33,26
E.C.2	4365,866	4433,379	4954,450	4683,313	300,355	350,110	86,84
E.C.3	4365,866	4433,379	4954,450	4683,313	300,355	350,110	46,15

* O sistema selecionado para utilização dos parâmetros estimados foi grifado para facilitar a compreensão da estratégia utilizada.

Como pode ser visto em uma comparação da Tabela 6.4 com a Tabela 6.1, o desvio aumentou significativamente com a abordagem utilizada. Devido a isso, decidiu-se manter fixos inicialmente os parâmetros encontrados para o pH 4,5 que foram os que apresentaram menores desvios originalmente (Tabela 6.1).

Apesar do valor de carga elétrica líquida da BSA calculada como uma contribuição da carga dos aminoácidos que compõe a proteína seguindo (Tabela 4.9) mais próximo do ponto isoelétrico ser em pH 5,5, alguns autores apontam que o ponto isoelétrico da proteína seria entre 4,5 e 5,0 (VILKER *et al.*, 1981) (RAJE e PINTO, 1998). É importante ressaltar que não existe um consenso na literatura em relação ao ponto isoelétrico da BSA e o valor possivelmente encontra-se entre uma faixa ampla de 4,5 a 5,6 (BARBOSA *et al.*, 2010).

Com nova abordagem, a Tabela 6.5 apresenta o resultado do desvio para os estudos E.C.5, E.C.6 e E.C.7 utilizando os parâmetros do E.C.4. Verifica-se que os desvios aumentaram em relação aos apresentados na Tabela 6.1 entretanto ainda encontram-se dentro da faixa aceitável.

Tabela 6.5 – Desvios encontrados para cada estudo de caso ao empregar os mesmos parâmetros estimados para o E.C.4

Sistema	$U_{ps/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/NH4}$ (1/K)	$U_{BSA/SO4}$ (1/K)	r_{BSA}	q_{BSA}	RMSD (%)
E.C.4	931,621	1023,192	4183,699	4992,602	390,130	337,152	0,45
E.C.5	931,621	1023,192	4183,699	4992,602	390,130	337,152	6,90
E.C.6	931,621	1023,192	4183,699	4992,602	390,130	337,152	5,57
E.C.7	931,621	1023,192	4183,699	4992,602	390,130	337,152	8,17

* O sistema selecionado para utilização dos parâmetros estimados foi grifado para facilitar a compreensão da estratégia utilizada.

Novamente para os sistemas E.C.1, E.C.2 e E.C.3 os parâmetros $U_{ptn/a}$ e $U_{ptn/c}$ foram estimados e os resultados são apresentados na Tabela 6.6.

Tabela 6.6 – Desvios encontrados com parâmetros binários de interação energética proteína/íon reestimados para cada sistema BSA/NaCl

Sistema	$U_{ps/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/Na}$ (1/K)	$U_{BSA/Cl}$ (1/K)	r_{BSA}	q_{BSA}	RMSD (%)
E.C.1	931,621	1023,192	966,751	1602,313	390,130	337,152	18,32
E.C.2	931,621	1023,192	5000,000	5000,000	390,130	337,152	91,78
E.C.3	931,621	1023,192	5000,000	5000,000	390,130	337,152	48,62

* O sistema selecionado para utilização dos parâmetros estimados foi grifado para facilitar a compreensão da estratégia utilizada.

Fixando os parâmetros de E.C.2 (pH 4,5) tem-se o resultado da Tabela 6.7.

Tabela 6.7 – Desvios encontrados para cada estudo de caso ao empregar os mesmos parâmetros estimados para o E.C.2

Sistema	$U_{ps/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/Na}$ (1/K)	$U_{BSA/Cl}$ (1/K)	r_{BSA}	q_{BSA}	RMSD (%)
E.C.1	931,621	1023,192	5000,000	5000,000	390,130	337,152	31,53
E.C.2	931,621	1023,192	5000,000	5000,000	390,130	337,152	91,78
E.C.3	931,621	1023,192	5000,000	5000,000	390,130	337,152	48,62

* O sistema selecionado para utilização dos parâmetros estimados foi grifado para facilitar a compreensão da estratégia utilizada.

Percebe-se que a elevação dos desvios anteriormente encontrada repete-se nessa abordagem. Procurou-se, então, verificar qual das duas abordagens forneceria menor desvio com dados de BSA em solução salina NaCl 1M em pH 7,4 (dados similares aos do estudo de curvas de eluição). Os desvios são apresentados na Tabela 6.8.

Tabela 6.8 – Desvios encontrados para o Estudo de Caso 1 ao empregar os diferentes conjuntos de parâmetros

Sistema	Abordagem	$U_{ps/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/BSA}$ (1/K)	$U_{BSA/Na}$ (1/K)	$U_{BSA/Cl}$ (1/K)	r_{BSA}	q_{BSA}	RMSD (%)
E.C.1	1	4365,866	4433,379	4954,450	4683,313	300,355	350,110	20,48
E.C.1	2	931,621	1023,192	5000,000	5000,000	390,130	337,152	17,81

Uma vez que os desvios obtidos na abordagem 2 foram menores, adotou-se estes parâmetros no decorrer da pesquisa de tese.

Para a lisozima, não foi encontrada na literatura dados experimentais de pressão osmótica em solução aquosa de NaCl. Ainda, o ponto isoelétrico da lisozima é próximo ao pH 11 (KNUBOVETS *et al.*, 1999). Uma vez que os dados disponíveis encontram-se longe desta faixa de pH, no decorrer da tese serão utilizados os mesmos parâmetros encontrados no sistema lisozima/(NH₄)₂SO₄ em pH 7,0 para lisozima/NaCl em pH 7,0.

6.1.1 Conclusões parciais da modelagem termodinâmica

O modelo composto pelos termos combinatorial e residual do UNIQUAC original foi capaz de representar os sistemas quaternários pseudossolvente/proteína/ânion/cátion. Entretanto, em regiões com elevada concentração de proteína o modelo apresentou desvios elevados em relação aos dados experimentais.

Foi possível estimar parâmetros, que não se encontravam disponíveis na literatura, de forma e volume do modelo UNIQUAC independentes do pH para as proteínas BSA e lisozima, assim como parâmetros de interação energética dos pares BSA/Na⁺, BSA/Cl⁻, BSA/NH₄⁺, BSA/SO₄²⁻, Lisozima/NH₄⁺, Lisozima/SO₄²⁻.

Os parâmetros que serão utilizados no decorrer da tese são sumarizados na Tabela 6.9.

Tabela 6.9 – Parâmetros do UNIQUAC utilizados para modelagem das curvas de eluição cromatográficas

	BSA	Lisozima
$U_{ps/ps}$ (1/K)	0,000	0,000
$U_{ps/ptn}$ (1/K)	931,621	1713,575
$U_{ps/Na}$ (1/K)	733,286	733,286
$U_{ps/Cl}$ (1/K)	1523,390	1523,390
$U_{ptn/ptn}$ (1/K)	1023,192	1769,459
$U_{ptn/Na}$ (1/K)	5000,000	1227,146
$U_{ptn/Cl}$ (1/K)	5000,000	5000,000
$U_{Na/Na}$ (1/K)	0,000	0,000
$U_{Na/Cl}$ (1/K)	1443,230	1443,230
$U_{Cl/Cl}$ (1/K)	2214,810	2214,810
r_{ptn}	390,130	173,121
q_{ptn}	337,152	236,817

6.2 Validação da rotina de simulação da coluna cromatográfica

Nesta seção são apresentados os resultados da validação dos modelos implementados para a simulação da coluna cromatográfica.

Buscou-se, inicialmente, verificar os erros de implementação que poderiam representar problemas nos resultados simulados do balanço de massa da coluna. Para isso, a área sob a curva simulada foi integrada para comparação com a massa teórica de proteína na entrada da coluna. Diversos testes foram realizados para a confirmação do balanço de massa e em todos os casos não foram encontrados erros no balanço de massa.

A segunda etapa foi a investigação da convergência do método numérico em relação ao número de elementos finitos.

Esta análise de convergência foi feita considerando solução ideal (coeficientes de atividade de todos os componentes iguais a 1), sem utilizar a rotina de cálculo do coeficiente de atividade. Utilizou-se para o estudo de caso BSA como proteína modelo e coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE, uma densidade de ligantes (A) média entre os valores fornecidos pelo fabricante (0,29 a 0,35 mol/L), e valores de fator estérico, constante de adsorção e coeficiente estequiométrico que forneciam resultados de volume de retenção compatíveis com os resultados encontrados no experimento A1.

A Figura 6.11 mostra os perfis de concentrações na saída da coluna para os diferentes valores de número de elementos finitos empregados.

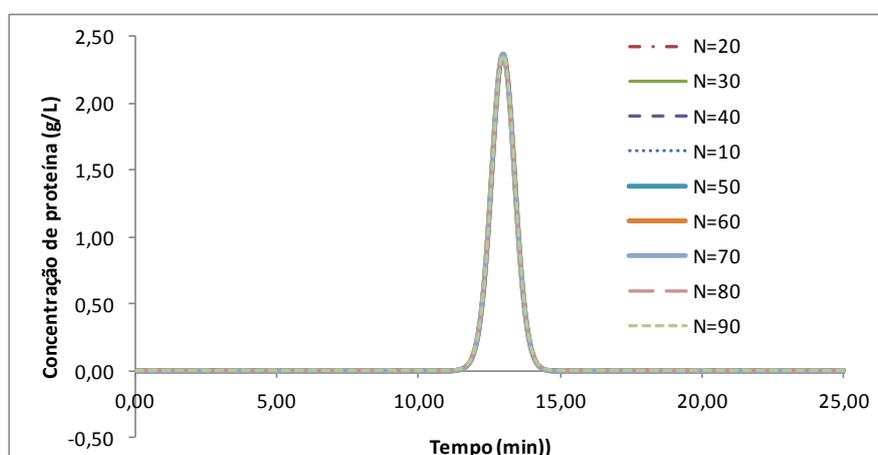


Figura 6.11 – Resultados obtidos de simulação da coluna cromatográfica com o aumento do número de elementos finitos

A Figura 6.12 apresenta os resultados da função objetivo para cada ponto da curva (Equação 6.1) que trata da diferença entre as malhas expressa na forma de uma diferença absoluta entre os resultados obtidos.

$$Fobj = \sqrt{(C_{p/N} - C_{p/90})^2} \tag{6.1}$$

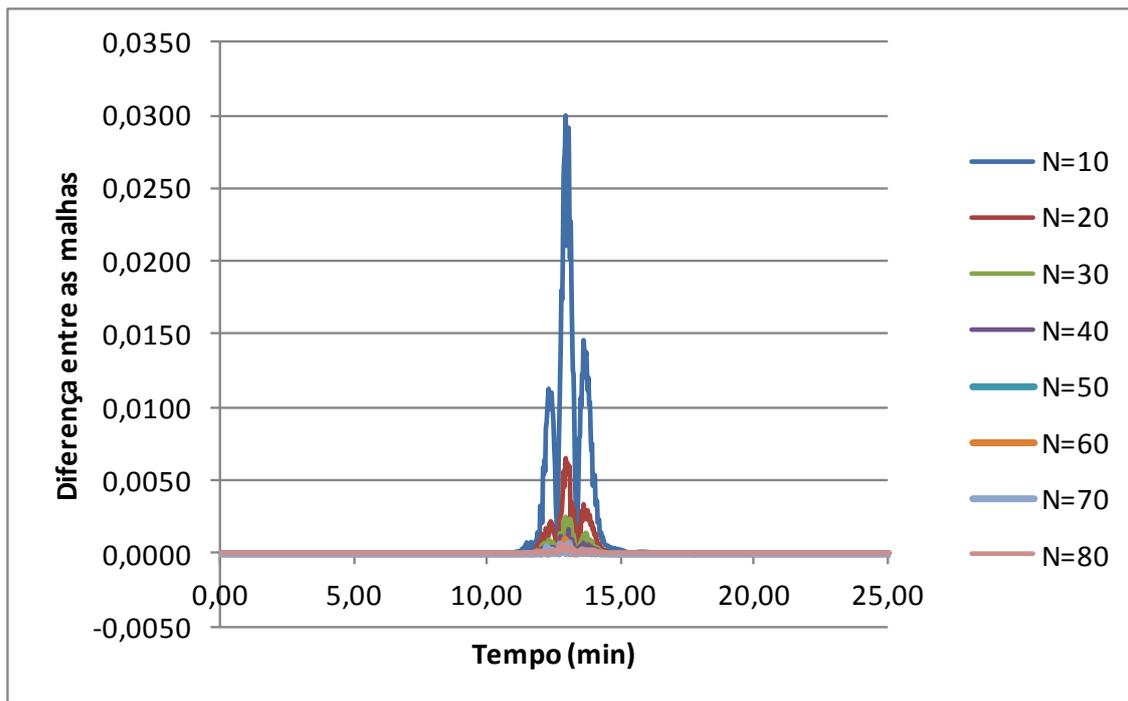


Figura 6.12 – Diferença entre as malhas de convergência (resultados da função objetivo)

O número de elementos finitos e os resultados, incluindo somatório da função objetivo para todos os pontos experimentais e o tempo computacional (CPU time) estão listados na Tabela 6.10.

O critério de convergência adotado foi de um valor 10^{-2} para a diferença entre as malhas. Para o sistema estudado, a convergência ocorreu para um número de elementos finitos de 20.

O número de elementos finitos foi definido como 60 para as análises subsequentes a fim de garantir a convergência para todos os sistemas estudados.

Tabela 6.10 – Convergência do método de resolução do modelo de transporte na coluna cromatográfica

Número de elementos finitos	Parâmetros da simulação								CPU (s)	$\sum^{NDP} F_{obj}$
	$C_{BSA,0}$ (g/L)	$C_{tampão}$ (M)	Gradiente (CV)	V_c (mL)	A (mol/L)	ζ	ν	K		
10	5	0.02	10	1	0,32	10	7	7	0,359	0,9255
20	5	0.02	10	1	0,32	10	7	7	0,858	0,1835
30	5	0.02	10	1	0,32	10	7	7	1,607	0,0698
40	5	0.02	10	1	0,32	10	7	7	2,714	0,0342
50	5	0.02	10	1	0,32	10	7	7	4,586	0,0212
60	5	0.02	10	1	0,32	10	7	7	7,332	0,0137
70	5	0.02	10	1	0,32	10	7	7	9,937	0,0110
80	5	0.02	10	1	0,32	10	7	7	13,400	0,0099
90	5	0.02	10	1	0,32	10	7	7	19,703	0,0000

6.3 Estimação de parâmetros da isoterma de adsorção

Nesta seção são apresentados os resultados da estimação de parâmetros da isoterma de adsorção, assim como da predição do comportamento da coluna em outras condições experimentais.

A constante de equilíbrio (K) e o coeficiente estequiométrico (ν) foram estimados por regressão de três experimentos com diferentes tamanhos de gradiente (10 CV, 60 CV e 100 CV). De acordo com Karkov e colaboradores (2013) quando a concentração de injeção da proteína é baixa comparativamente com a capacidade de saturação da coluna, o fator de impedimento estérico do modelo SMA possui mínima influência na determinação dos demais parâmetros da isoterma. Assim, uma vez que K e ν foram determinados, o fator de impedimento estérico (ζ) foi estimado para ambas as proteínas em condições máximas da concentração de entrada (0,301M) com gradiente de 10 CV e 100 CV. Essa estimação foi efetuada tanto para BSA injetada nas colunas HiTrapTM CaptoTM DEAE e HiTrapTM CaptoTM Q quanto para lisozima injetada na coluna HiTrapTM SP FF.

A densidade de ligantes utilizada para cada resina foi determinada como um valor médio em relação ao valor fornecido pelo fabricante da coluna.

As constantes de equilíbrio da BSA com resina catiônica e da lisozima com resinas aniônicas foram consideradas iguais a zero, já que não ocorre adsorção nesses

casos.

Os resultados dos parâmetros estimados para a adsorção de BSA e lisozima nas resinas Capto™ DEAE, Capto™ Q e SP FF foram sumarizados na Tabela 6.11.

Tabela 6.11 – Parâmetros da isoterma de adsorção estimados para BSA e lisozima nas diferentes resinas

Proteína	Lisozima			BSA		
	Capto™ DEAE	Capto™ Q	SP FF	Capto™ DEAE	Capto™ Q	SP FF
ν	-	-	2,9	12,9	16,9	-
K	0	0	59,5	0,019	71	0
ζ	-	-	0,03	51	1,2	-
Λ [mol/L]	-	-	0,21	0,32	0,19	-

A diferença encontrada entre os valores dos parâmetros para a adsorção de BSA nas resinas aniônicas era esperada. Pedersen (2002) afirma que a carga de ligação da proteína varia tanto com o pH quanto com o meio cromatográfico.

Osbergahaus e colaboradores (2012) indicaram que os parâmetros do modelo SMA publicados na literatura, ainda que determinados nas mesmas condições de pH e mesmo adsorvente, podem desviar entre si de cerca de 4% a cerca de 14%, e os parâmetros determinados por diferentes metodologias experimentais (eluição isocrática *versus* gradiente de eluição) podem apresentar diferenças ainda maiores. Valores de constante de equilíbrio, por exemplo, chegam a variar cerca de dez vezes.

A Tabela 6.12 apresenta uma comparação entre parâmetros do modelo SMA publicados e os parâmetros estimados nesta tese para a adsorção de lisozima em resina SP FF.

Tabela 6.12 – Parâmetros de modelos de isoterma de adsorção de lisozima em resina SP FF publicados na literatura

Proteína	(OSBERGHAUS <i>et al.</i> , 2012)	(LADIWALA <i>et al.</i> , 2005)	Esta pesquisa
ν	4,72	5,6	2,9
K	0,0372	0,0763	59,5
ζ	38,75	17	0,03

A carga líquida da lisozima em pH 7, calculada como uma contribuição da carga dos aminoácidos, é 7,8 (Apêndice E - Tabela E.6). A carga de ligação da proteína é menor que sua carga líquida visto que apenas parte das cargas superficiais podem interagir com o ligante imobilizado (MOLLERUP, 2007). Assim, o único parâmetro da isoterma que poderia ser comparado com propriedades da proteína seria o coeficiente estequiométrico e a única constatação a ser feita é que no caso de eluição com NaCl o valor do coeficiente estequiométrico (ν) deveria ser menor que 7, como pode ser observado em todos os trabalhos da Tabela 6.12.

A grande diferença observada entre os parâmetros da literatura e os encontrados nesta pesquisa é devido a diferenças entre o modelo da isoterma, visto que em ambos os casos (LADIWALA *et al.*, 2005; OSBERGHAUS *et al.*, 2012) a fase móvel foi considerada ideal.

Osbergahaus e colaboradores (2012) afirmaram que apesar de Brooks e Cramer (1992) terem formulado uma explicação física para os parâmetros do modelo SMA, seu melhor uso seria em análises de ranqueamento de afinidade de adsorção entre proteínas, resinas e sais como realizado por Liu e colaboradores (2008). Dessa forma, a fim de comparar os resultados apresentados deveria ser realizado um ranqueamento da afinidade de adsorção das proteínas e resinas.

As seções seguintes, 6.3.1, 6.3.2 e 6.3.3, ilustram os resultados para todos os estudos de caso, tanto aqueles utilizados para estimação de parâmetros quanto os demais a fim de avaliação da capacidade preditiva do modelo.

As linhas vermelhas pontilhadas representam os dados experimentais enquanto as linhas pretas contínuas representam o ajuste do modelo utilizando os parâmetros apresentados na Tabela 6.11. A concentração de eluente é representada pela linha verde tracejada.

6.3.1 Coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE - Avaliação da influência da concentração de injeção

A seguir são apresentados os resultados de modelagem obtidos para a BSA, lisozima e a mistura de BSA e lisozima na coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE. Trata-se de experimentos da série "A", todos realizados com tampão fosfato 0,02M /pH 7,

através dos quais se buscou avaliar a influência da variação da concentração de injeção das proteínas no perfil de eluição.

As Figuras 6.13 a 6.16 trazem os resultados da injeção de BSA, as Figuras 6.17 e 6.18 os resultados da injeção de lisozima e as Figuras 6.19 a 6.23 os resultados da injeção da mistura de proteínas.

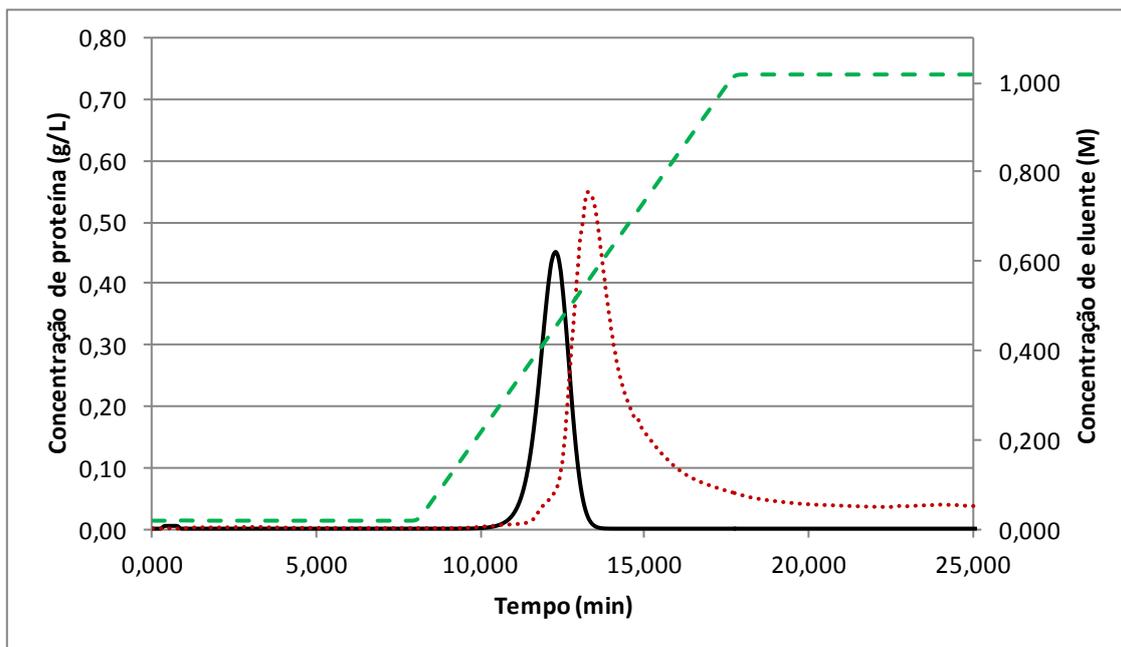


Figura 6.13 – Experimento A1 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), concentração inicial de proteína 0,015mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

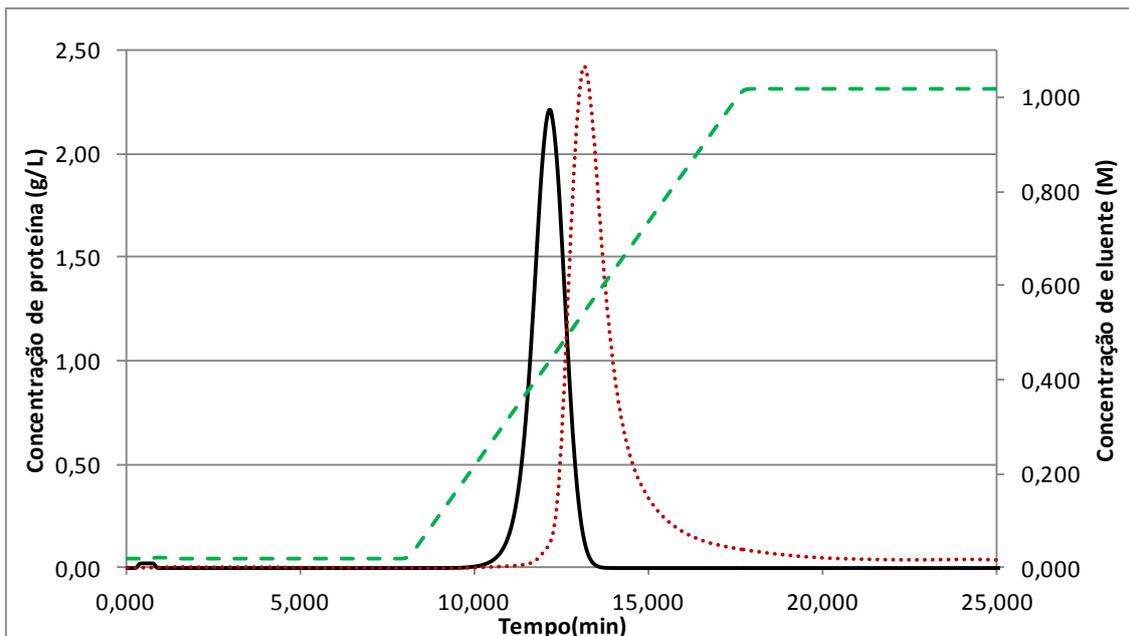


Figura 6.14 – Experimento A2 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

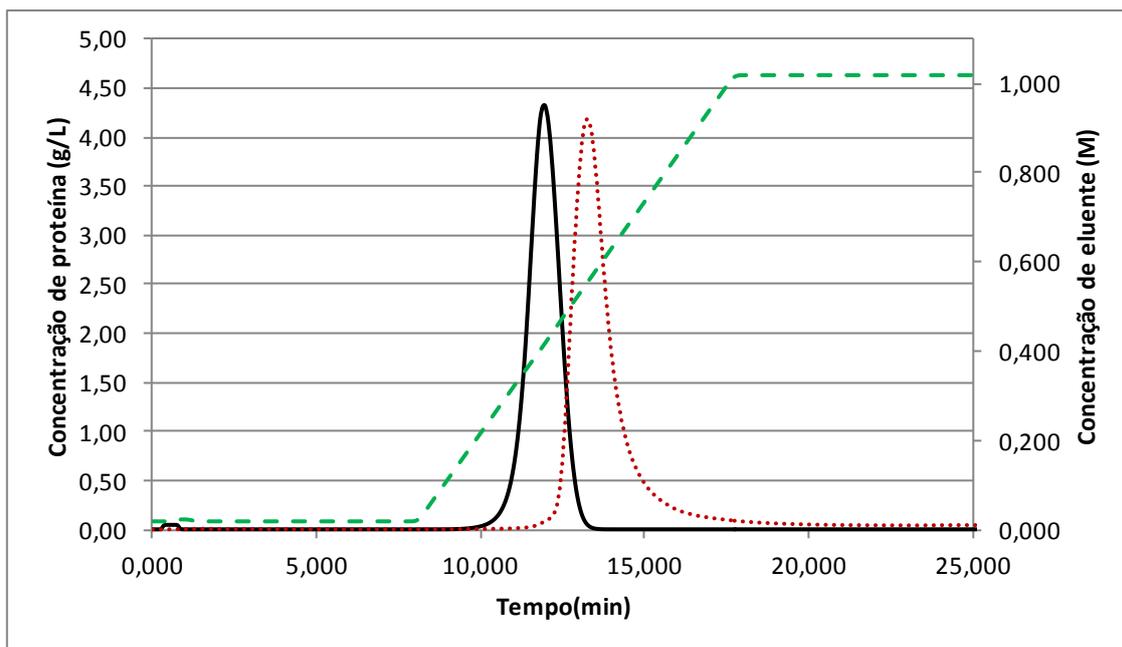


Figura 6.15 – Experimento A3 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), concentração inicial de proteína 0,150mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

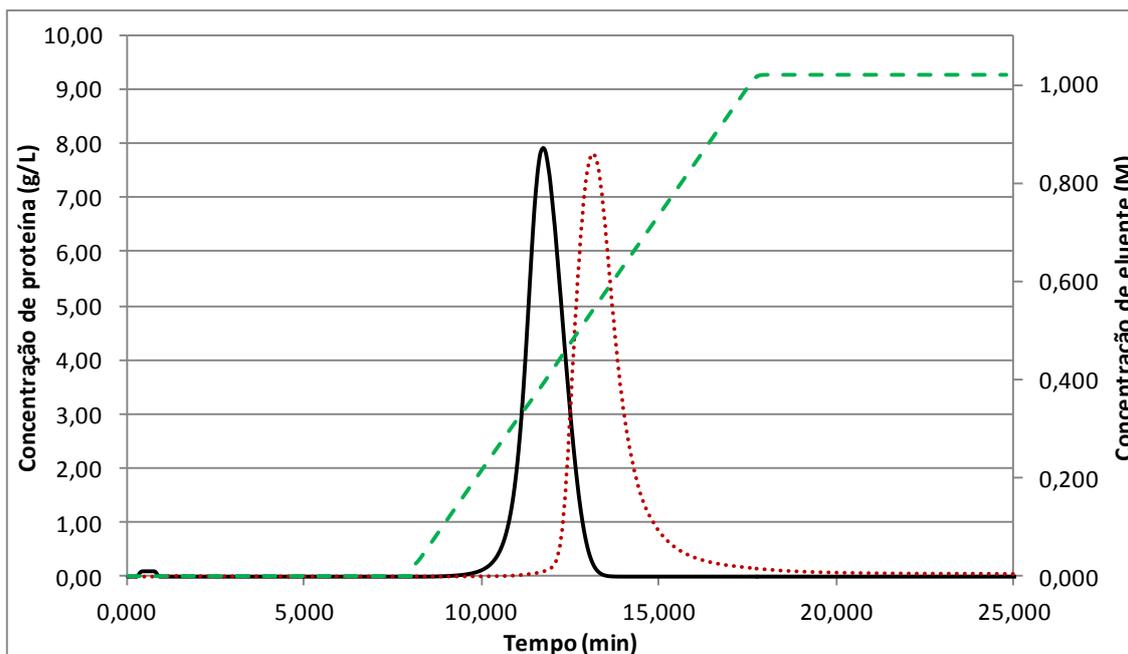


Figura 6.16 – Experimento A4 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

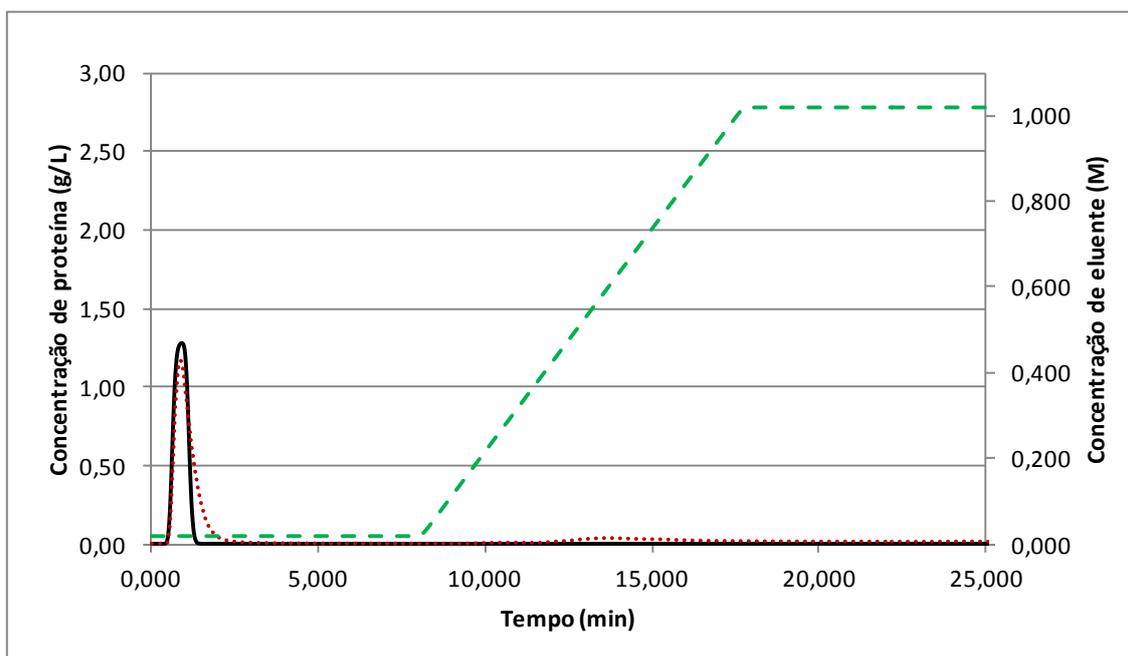


Figura 6.17 – Experimento A13 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

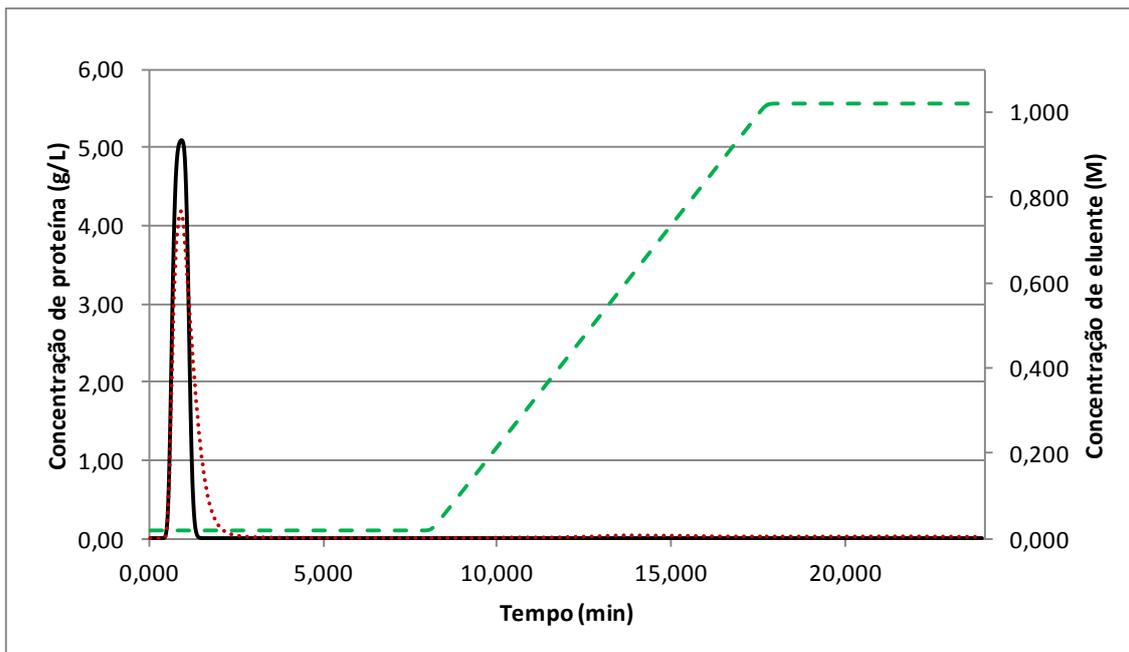


Figura 6.18 – Experimento A14 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

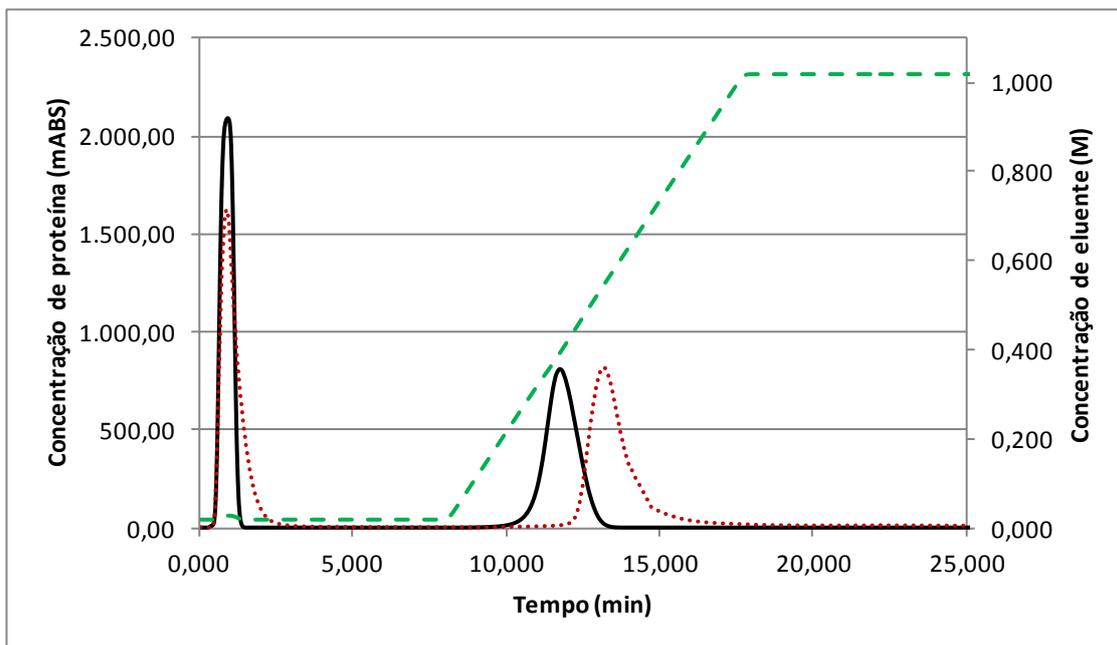


Figura 6.19 – Experimento A24 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301mM + lisozima 0,301 mM) em coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

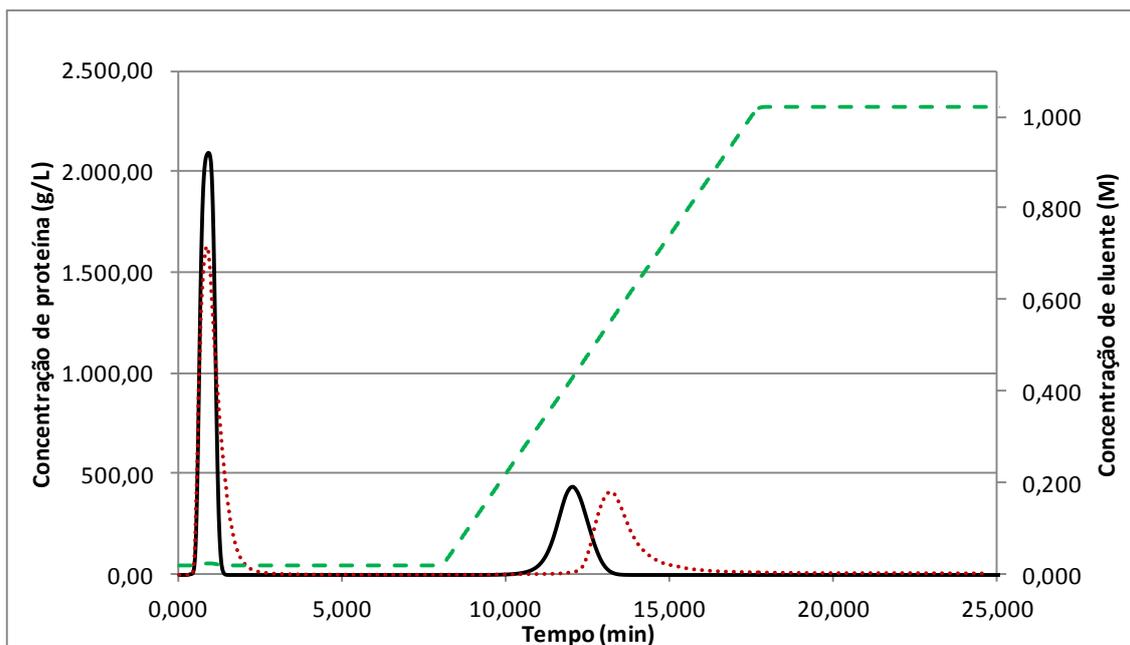


Figura 6.20 – Experimento A25 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,150 mM + lisozima 0,301 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

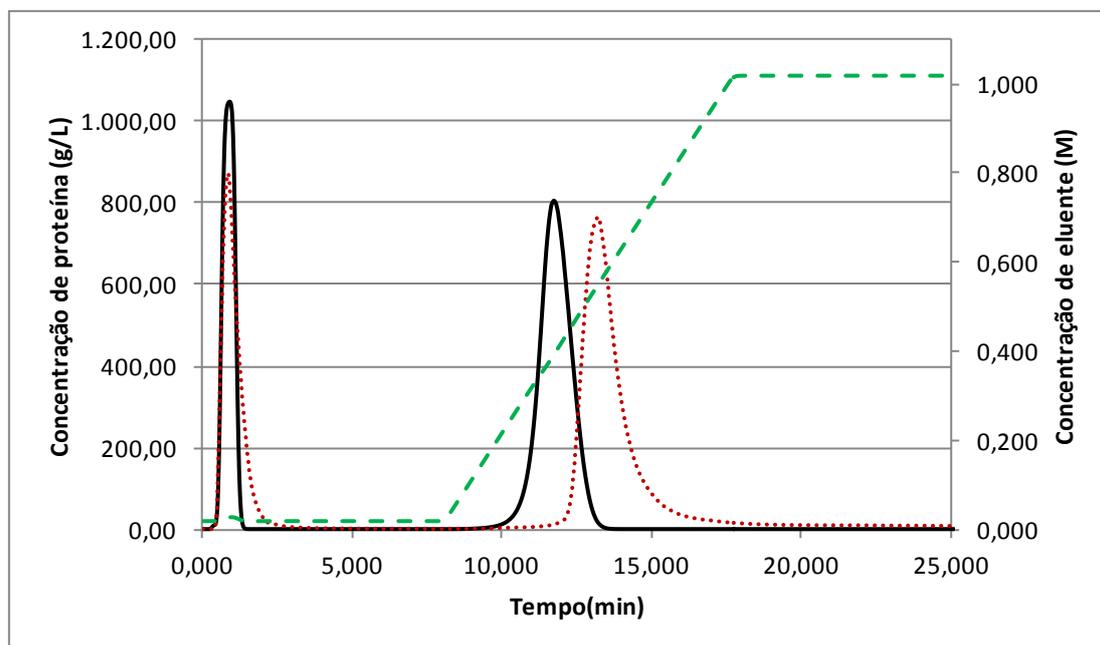


Figura 6.21 – Experimento A26 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301 mM + lisozima 0,150 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

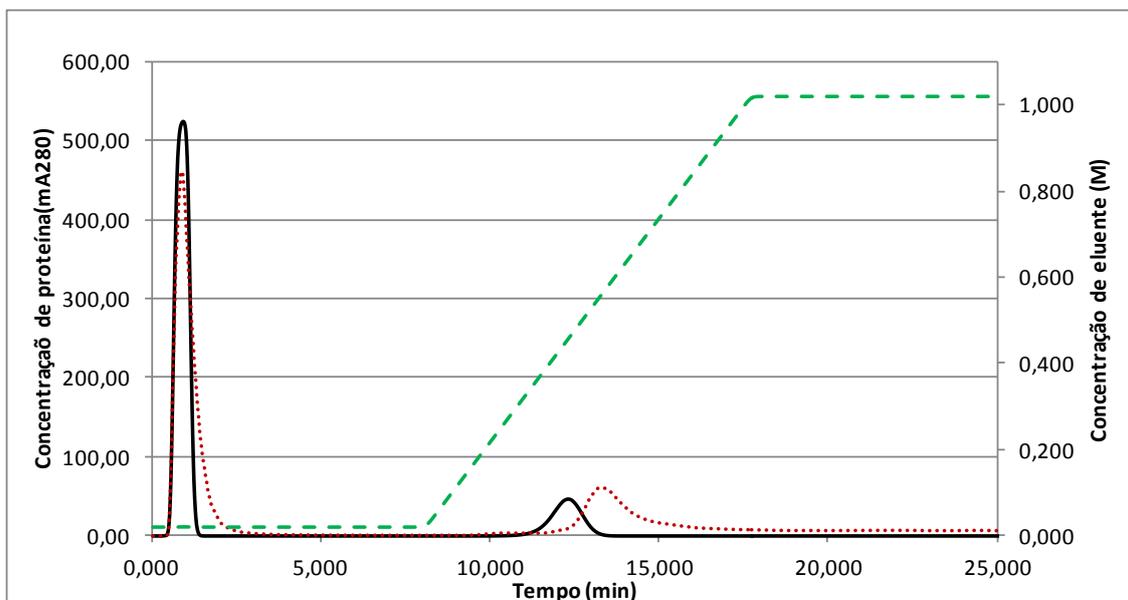


Figura 6.22 – Experimento A27 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,015 mM + lisozima 0,075 mM) em coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

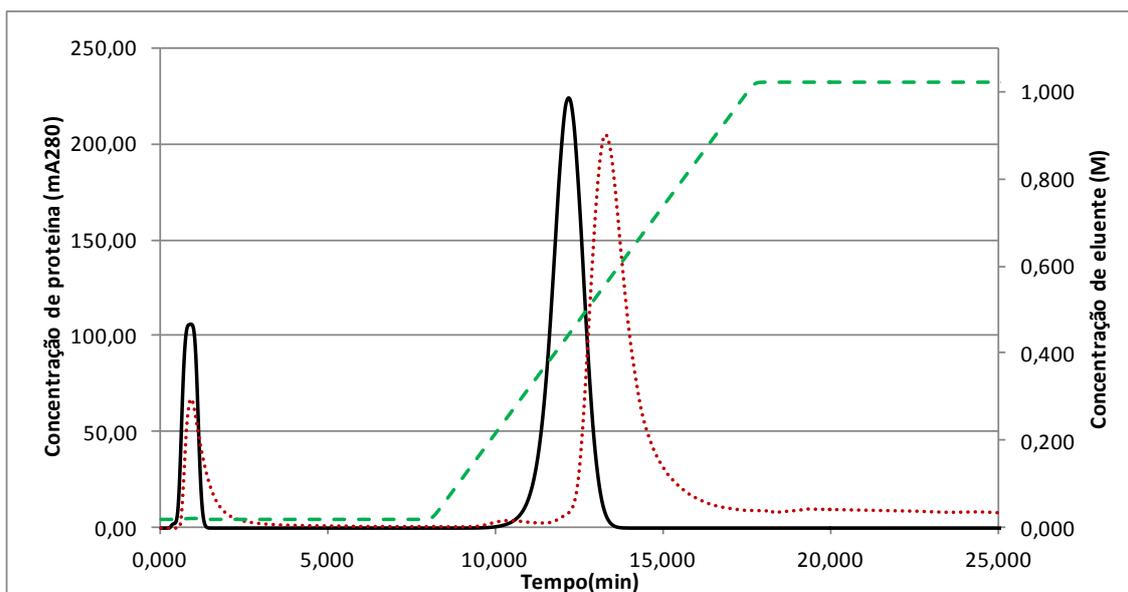


Figura 6.23 – Experimento A28 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,075 mM + lisozima 0,015 mM) em coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

A Tabela 6.13 apresenta para comparação os valores experimentais de volume de retenção (V_R^{max} e V_R^{EMG}) e o valor da simulação calculado no ponto máximo do pico de eluição (V_R^{calc}). Os maiores desvios encontrados entre os valores estão na ordem de 10%.

Tabela 6.13 – Verificação da influência da variação da concentração de injeção de proteína na eluição em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE

Exp	Proteína	Concentração inicial (mM)	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	V_R^{calc} (mL)
A1	BSA	0,015	13,15	14,16	12,29
A2		0,075	13,27	13,59	12,16
A3		0,150	13,25	13,56	11,95
A4		0,301	13,12	13,45	11,73
A13	Lisozima	0,075	0,87	1,08	0,93
A14		0,301	0,91	1,08	0,93
A24	BSA	0,301	13,17	13,03	11,73
	Lisozima	0,301	0,90	1,11	0,93
A25	BSA	0,15	13,22	13,52	12,05
	Lisozima	0,301	0,88	1,04	0,93
A26	BSA	0,301	13,20	13,52	11,73
	Lisozima	0,15	0,87	1,06	0,93
A27	BSA	0,015	13,28	13,93	12,32
	Lisozima	0,075	0,87	1,05	0,93
A28	BSA	0,075	13,29	13,64	12,18
	Lisozima	0,015	0,93	1,22	0,93

Quando a lisozima não adsorve nas resinas (experimentos A13 e A14) o volume de retenção simulado é idêntico independente da concentração de injeção de proteína. Esse comportamento não é observado experimentalmente com o volume de retenção calculado como o máximo do pico de eluição, mas é observado no volume de retenção calculado pelo primeiro momento da curva experimental.

Para a BSA observa-se que os valores simulados indicam uma diminuição do volume de retenção com o aumento da concentração de injeção da proteína. Esse comportamento também foi observado experimentalmente, com exceção do experimento A1.

Os resultados de injeção de ambas proteínas mostram que apenas quando a concentração de BSA foi de 0,301 mM os valores de volume de retenção foram idênticos aos encontrados na eluição individual. Nas demais concentrações os valores são distintos, fenômeno também observado experimentalmente, o que indica que o modelo foi capaz de representar a influência da presença de outra proteína na solução. Já os volumes de retenção de lisozima são sempre os mesmos independente da

concentração de injeção de cada proteína.

6.3.2 Coluna HiTrapTM CaptoTM Q - Avaliação da influência da concentração de injeção

A seguir são apresentados os resultados de modelagem obtidos para a BSA, lisozima e a mistura de BSA e lisozima na coluna HiTrapTM CaptoTM Q. Trata-se ainda de experimentos da série "A", todos realizados com tampão fosfato 0,02M /pH 7.

As Figuras 6.24 a 6.27 trazem os resultados da injeção de BSA, as Figuras 6.28 e 6.29 os resultados da injeção de lisozima e as Figuras 6.30 a 6.34 os resultados da injeção da mistura de proteínas.

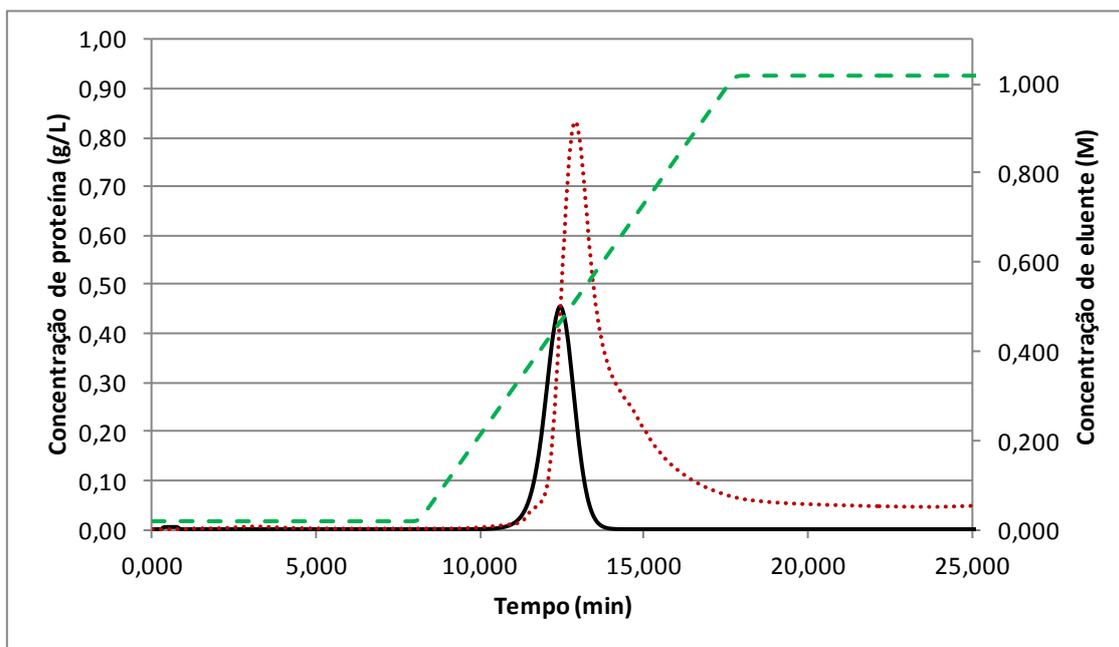


Figura 6.24 – Experimento A5 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha sólida) para BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), concentração inicial de proteína 0,015mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

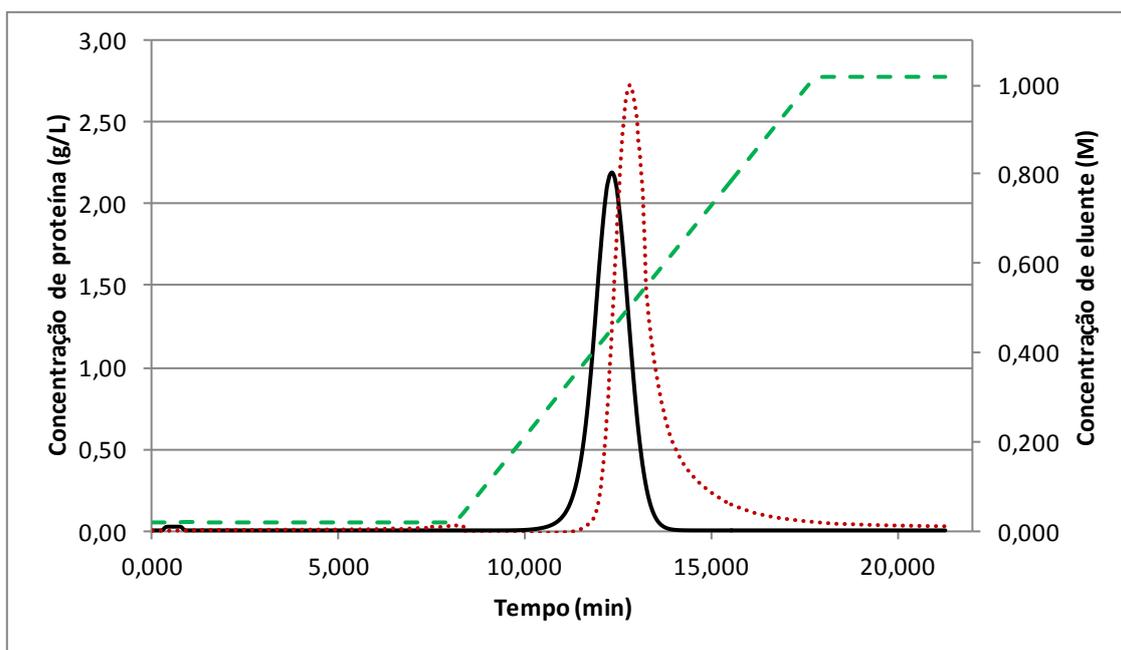


Figura 6.25 – Experimento A6 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha sólida) para BSA em coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

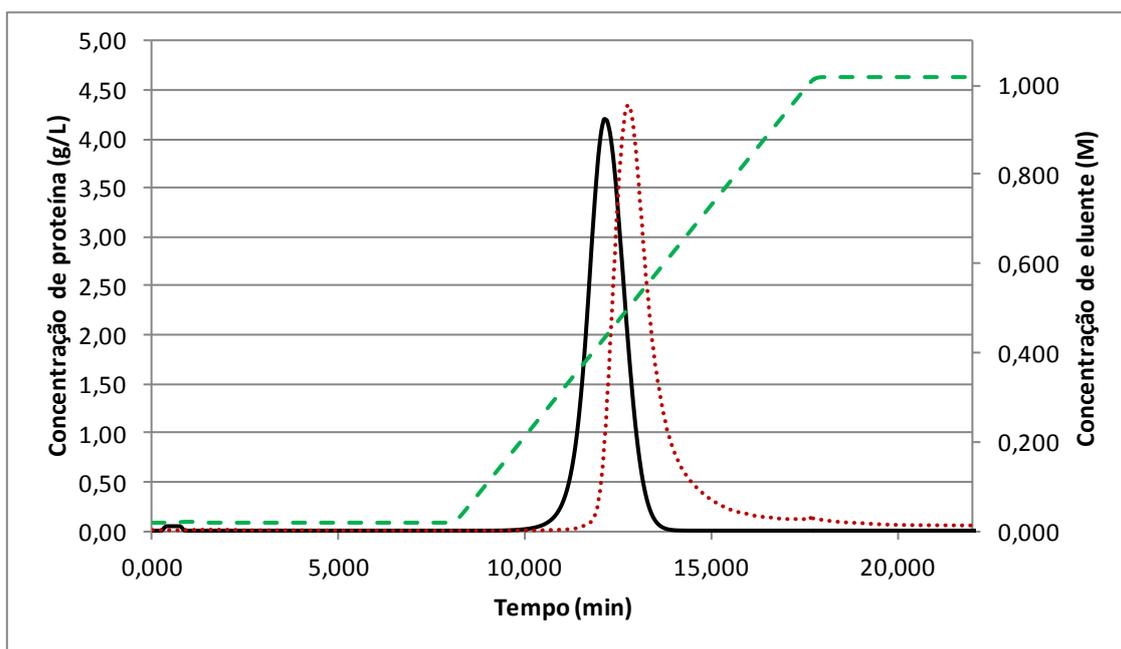


Figura 6.26 – Experimento A7 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), concentração inicial de proteína 0,150mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

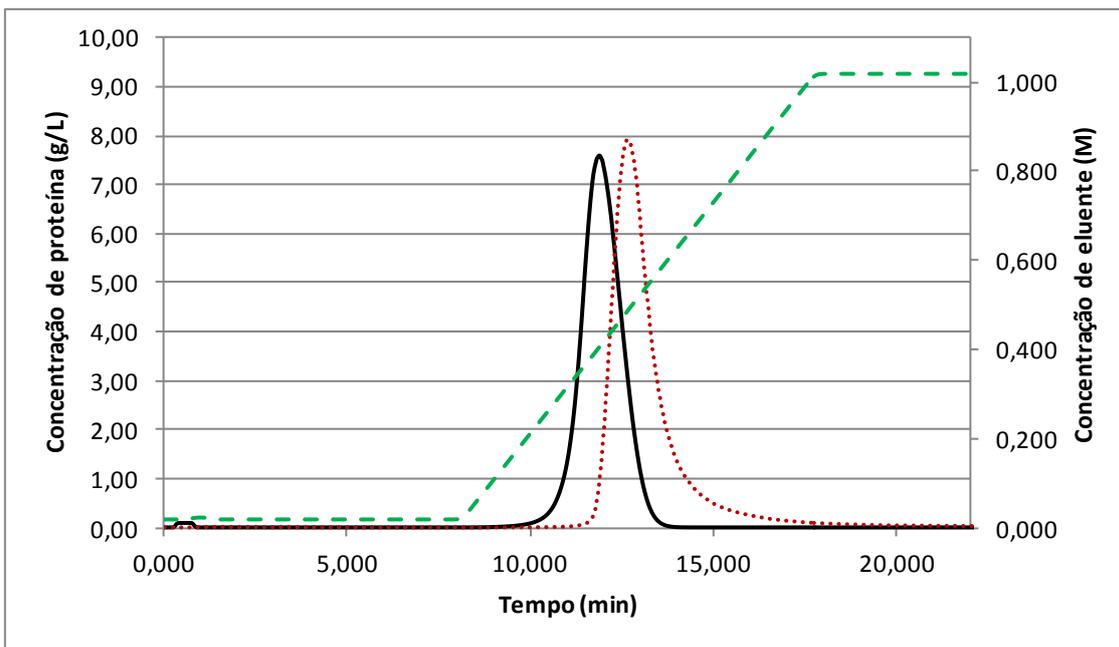


Figura 6.27 – Experimento A8 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

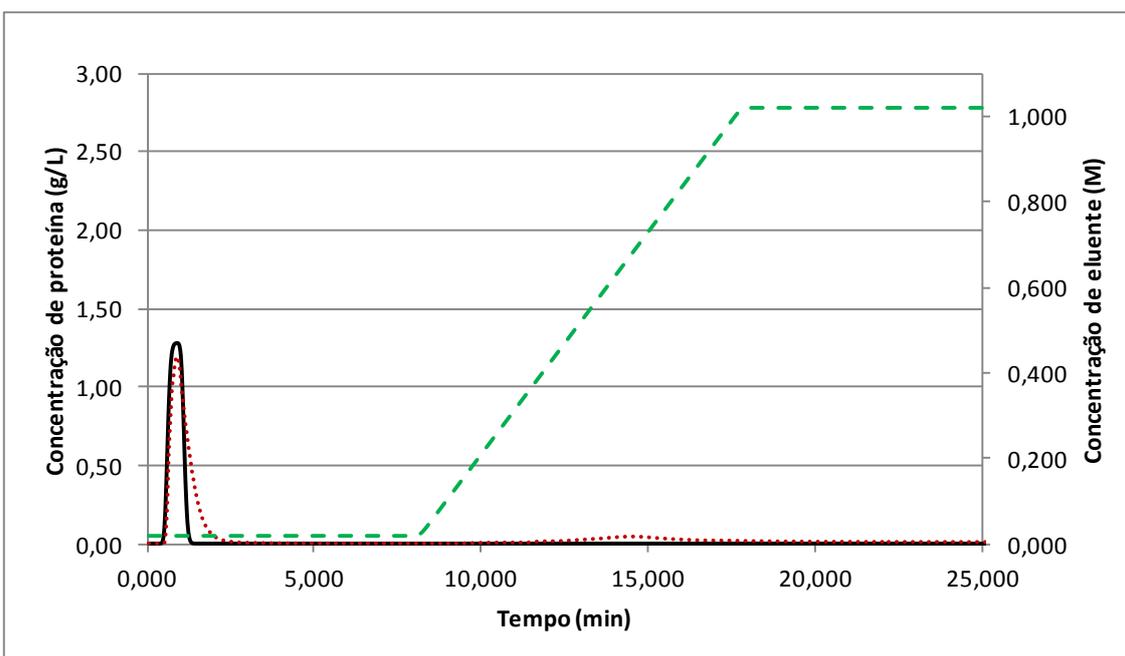


Figura 6.28 – Experimento A15 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

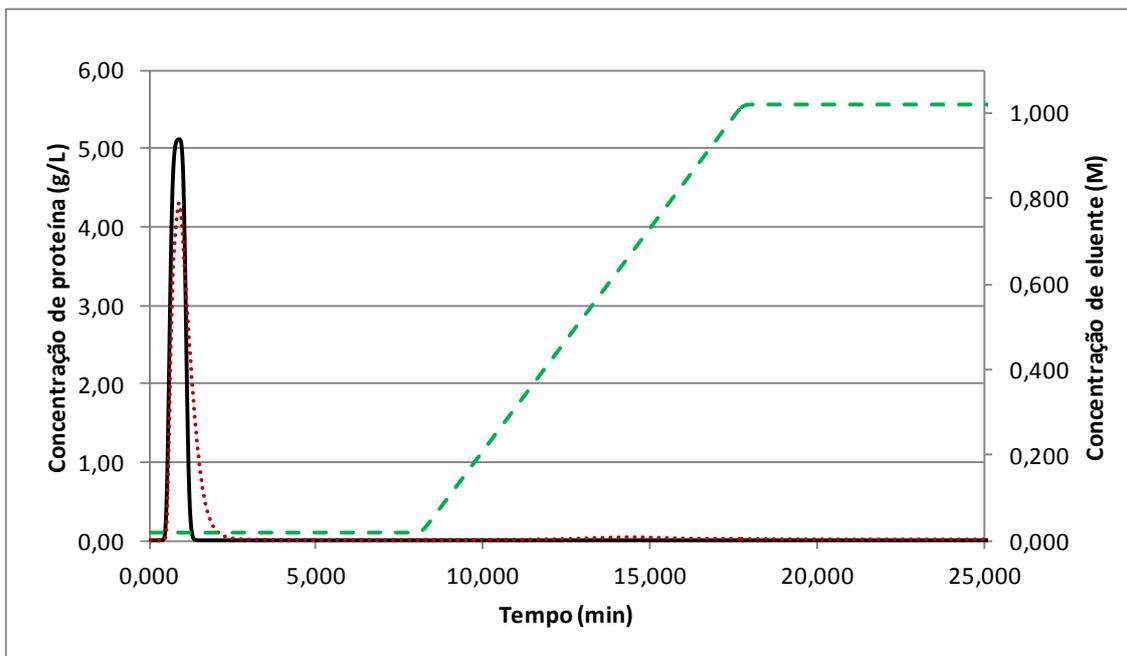


Figura 6.29 – Experimento A16 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

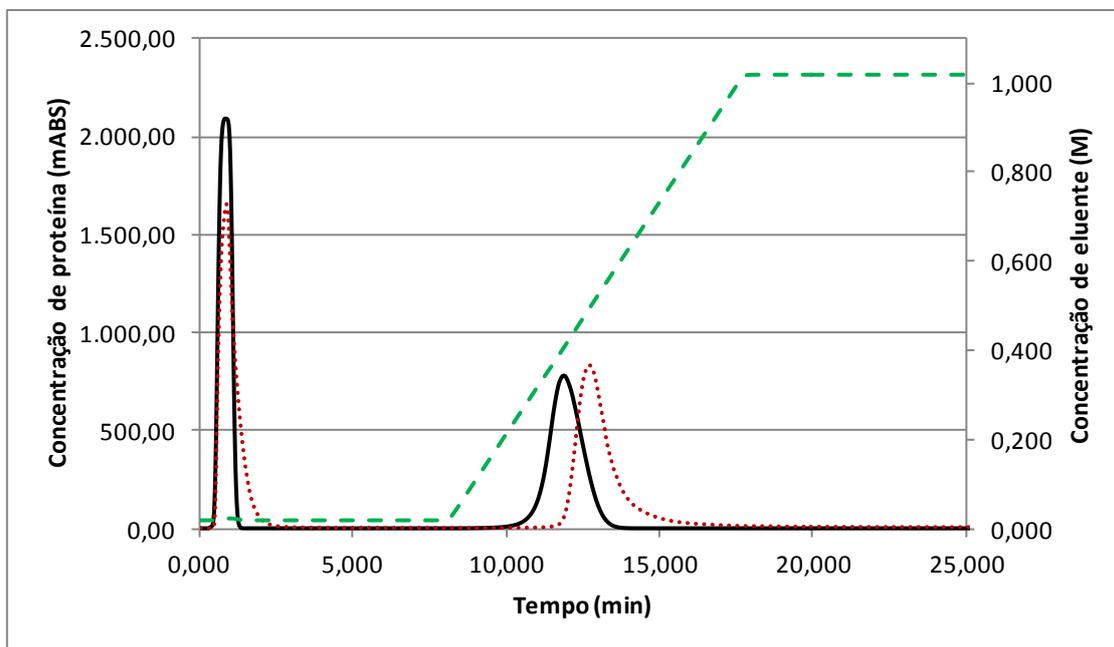


Figura 6.30 – Experimento A30 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301mM + lisozima 0,301 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

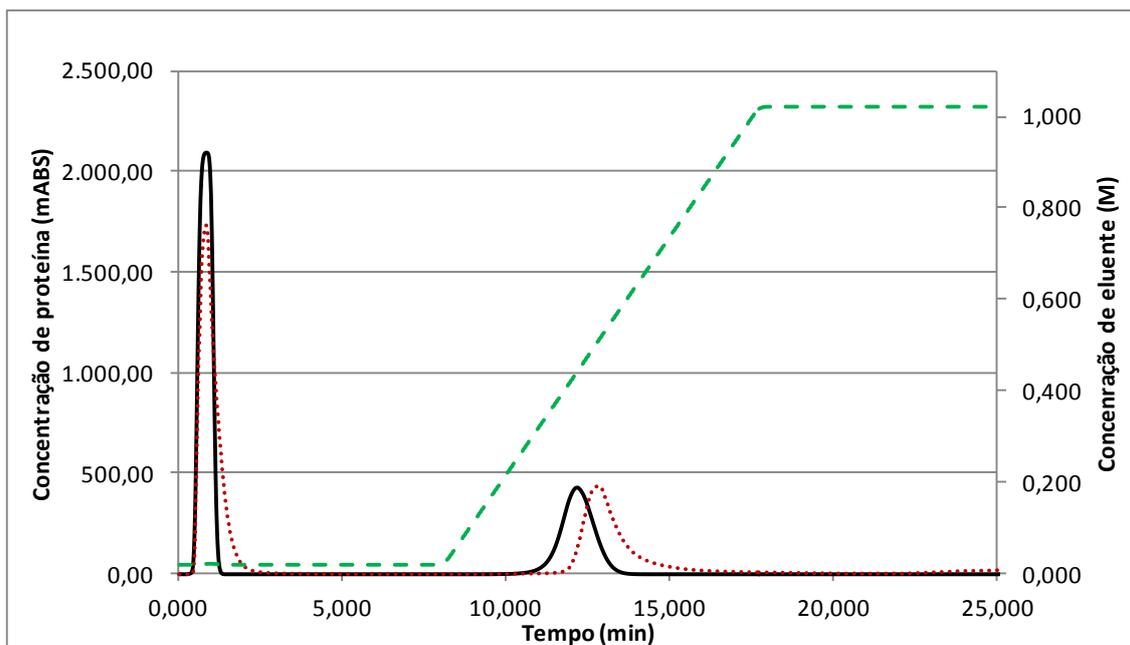


Figura 6.31 – Experimento A31 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,150 mM + lisozima 0,301 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

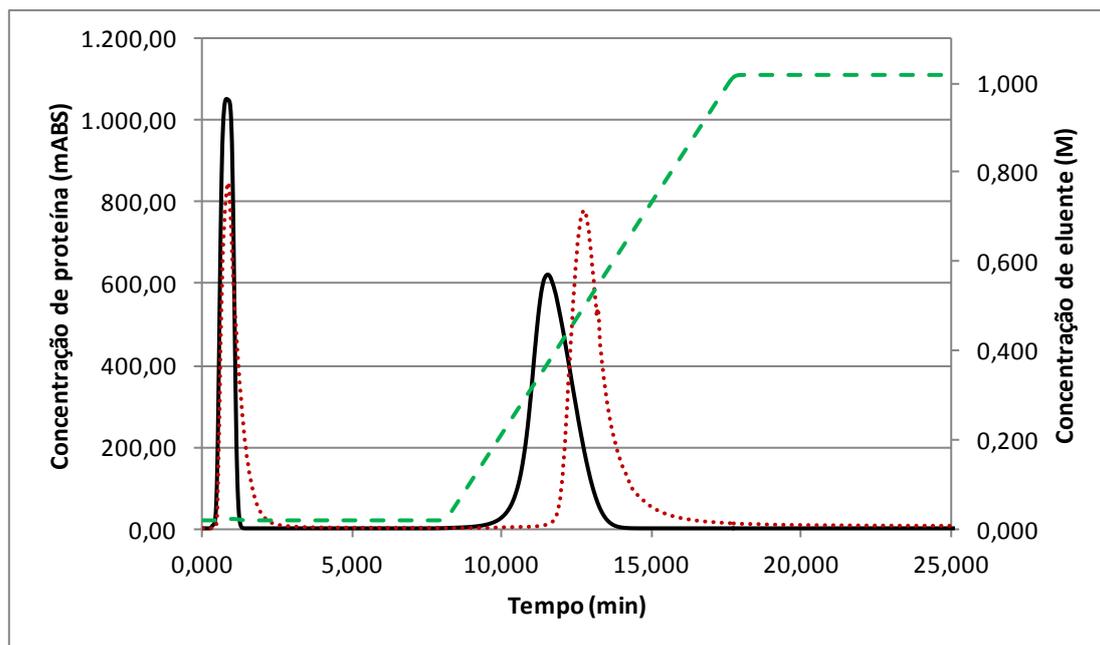


Figura 6.32 – Experimento A32 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301 mM + lisozima 0,150 mM) em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

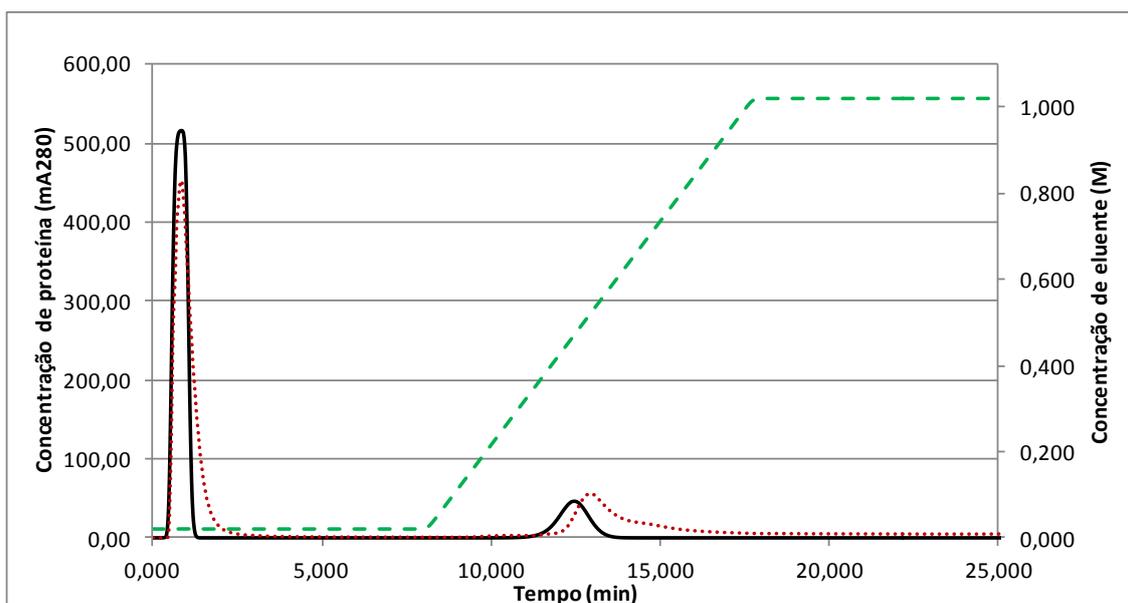


Figura 6.33 – Experimento A33 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,015 mM + lisozima 0,075 mM) em coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

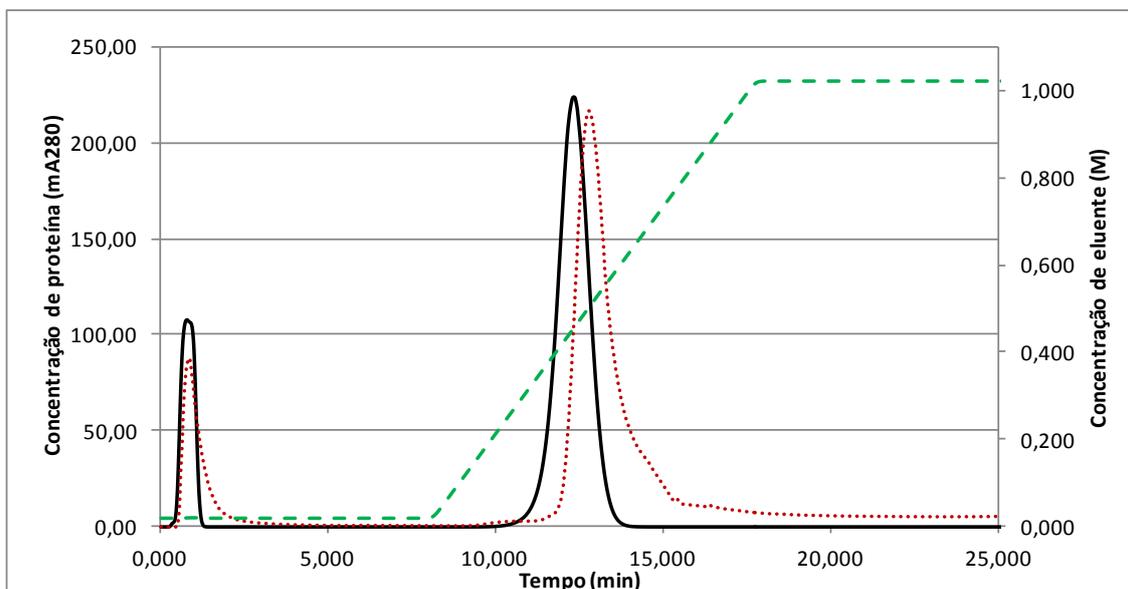


Figura 6.34 – Experimento A34 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,075 mM + lisozima 0,015 mM) em coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

A Tabela 6.14 apresenta para comparação os valores experimentais de volume de retenção (V_R^{max} e V_R^{EMG}) e o valor da simulação calculado no ponto máximo do pico de eluição (V_R^{calc}).

Tabela 6.14 –Verificação da influência da concentração de injeção de proteína na eluição em coluna HiTrap™ Capto™ Q

Exp	Proteína	Concentração inicial (mM)	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	V_R^{calc} (mL)
A5	BSA	0,015	12,90	13,82	12,47
A6		0,075	12,81	13,10	12,34
A7		0,150	12,77	13,10	12,16
A8		0,301	12,64	12,98	11,89
A15	Lisozima	0,075	0,87	1,06	0,87
A16		0,301	0,88	1,04	0,88
A30	BSA	0,301	12,72	13,03	11,88
	Lisozima	0,301	0,87	1,02	0,84
A31	BSA	0,15	12,80	13,14	12,19
	Lisozima	0,301	0,85	0,99	0,85
A32	BSA	0,301	12,75	13,07	11,89
	Lisozima	0,15	0,88	1,05	0,83
A33	BSA	0,015	12,97	13,81	12,50
	Lisozima	0,075	0,87	1,013	0,87
A34	BSA	0,075	12,77	13,16	12,32
	Lisozima	0,015	0,85	1,09	0,80

Observa-se que, seguindo o comportamento experimental, os valores simulados de volume de retenção de BSA diminuem com o aumento da concentração de injeção dessa proteína. Os desvios chegam a 6%.

Na eluição individual de lisozima (experimentos A13 e A14) o valor simulado do pico de eluição é idêntico ao experimental.

Assim como ocorreu para a resina Capto™ DEAE e de acordo com o comportamento experimental, os valores de volume de retenção quando há injeção de ambas proteínas não são idênticos aos encontrados na eluição individual, o que indica que o modelo foi capaz de representar a influência da presença de outra proteína na solução.

6.3.3 Coluna HiTrap™ SP FF - Avaliação da influência da concentração de injeção

A seguir são apresentados os resultados de modelagem obtidos para a BSA,

lisozima e a mistura de BSA e Lisozima na coluna HiTrap™ SP FF. Trata-se de experimentos da série "A", todos realizados com tampão fosfato 0,02M /pH 7.

As Figuras 6.35 a 6.38 trazem os resultados da injeção de lisozima, as Figuras 6.39 e 6.40 os resultados da injeção de BSA e as Figuras 6.41 a 6.45 os resultados da injeção da mistura de proteínas.

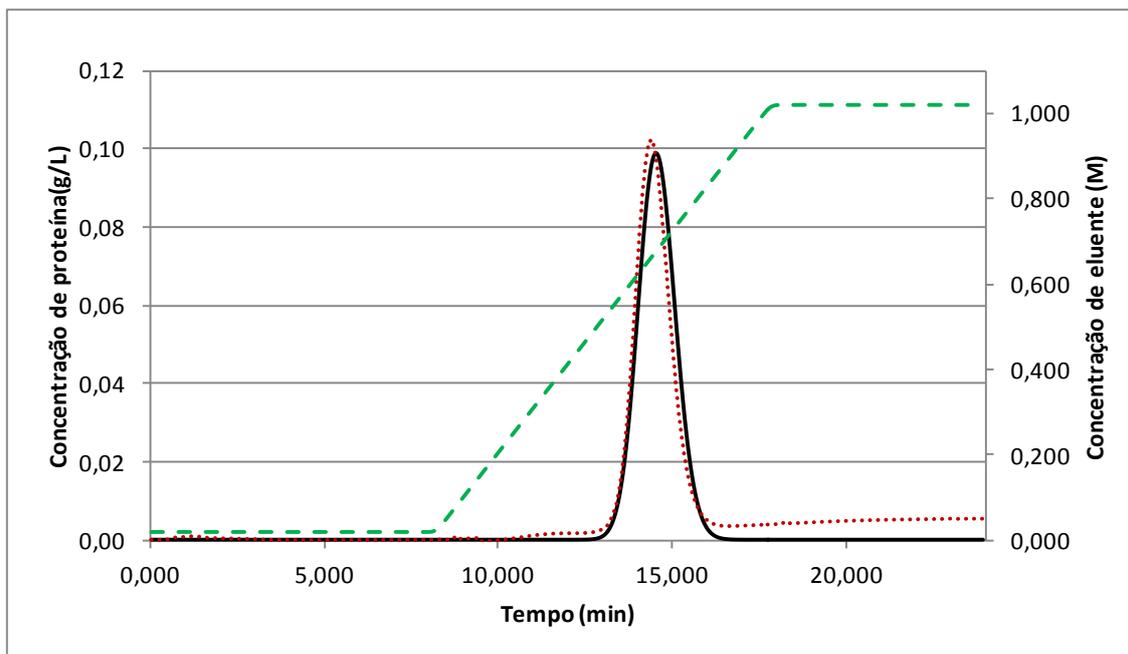


Figura 6.35 – Experimento A17 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha sólida) para lisozima em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), concentração inicial de proteína 0,015mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

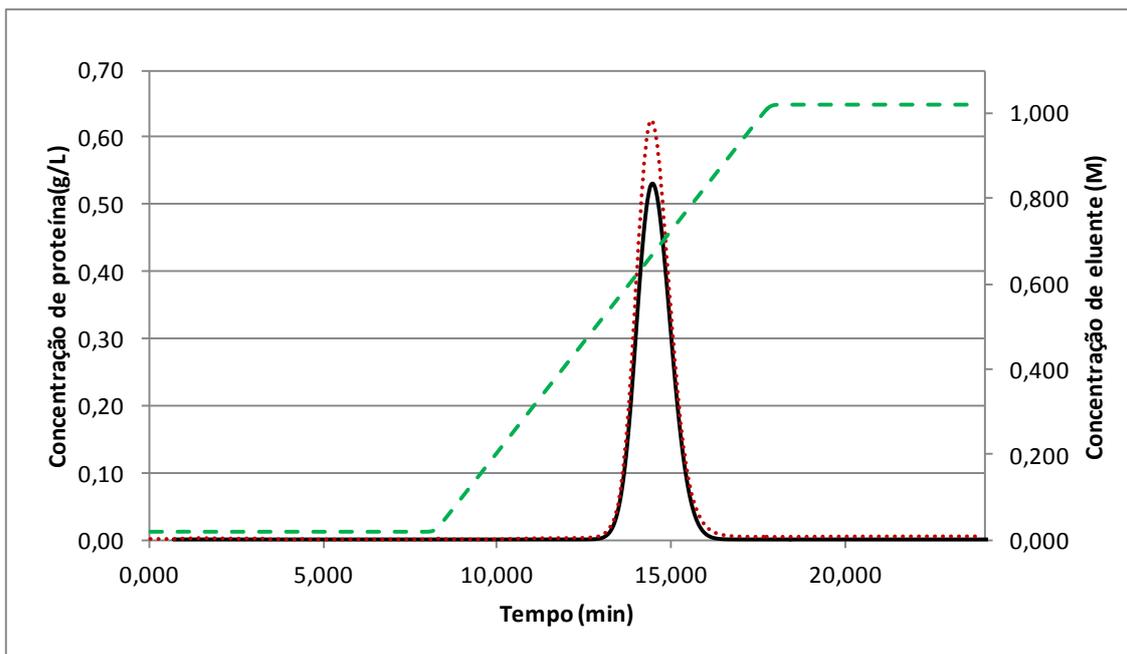


Figura 6.36 – Experimento A18 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha sólida) para lisozima em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

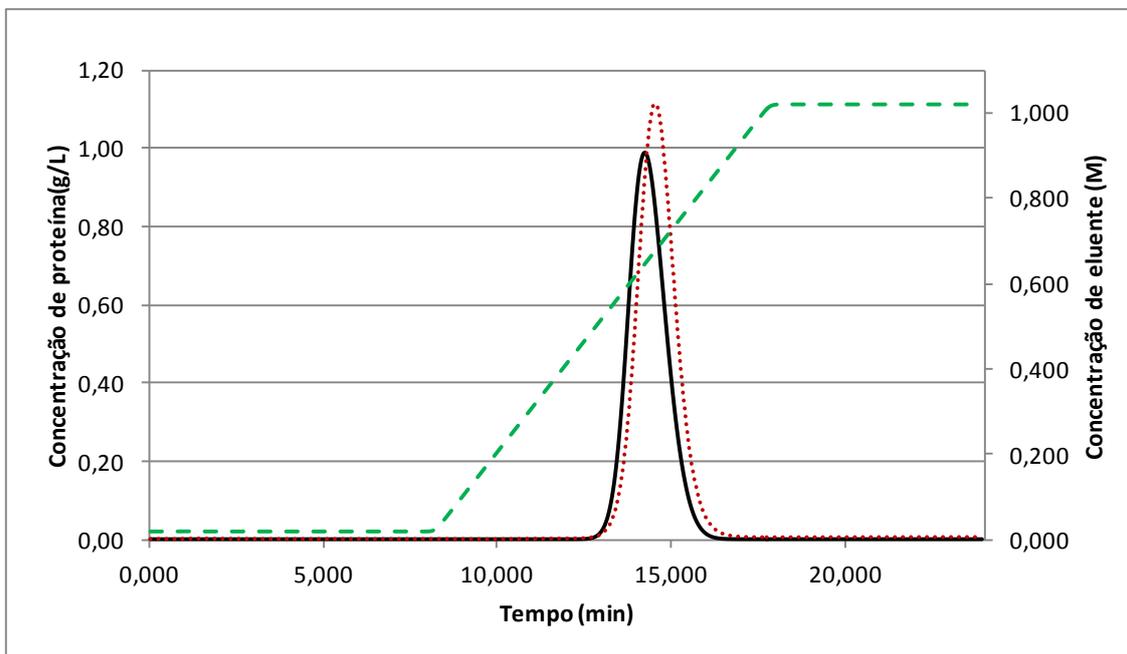


Figura 6.37 – Experimento A19 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), concentração inicial de proteína 0,150mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

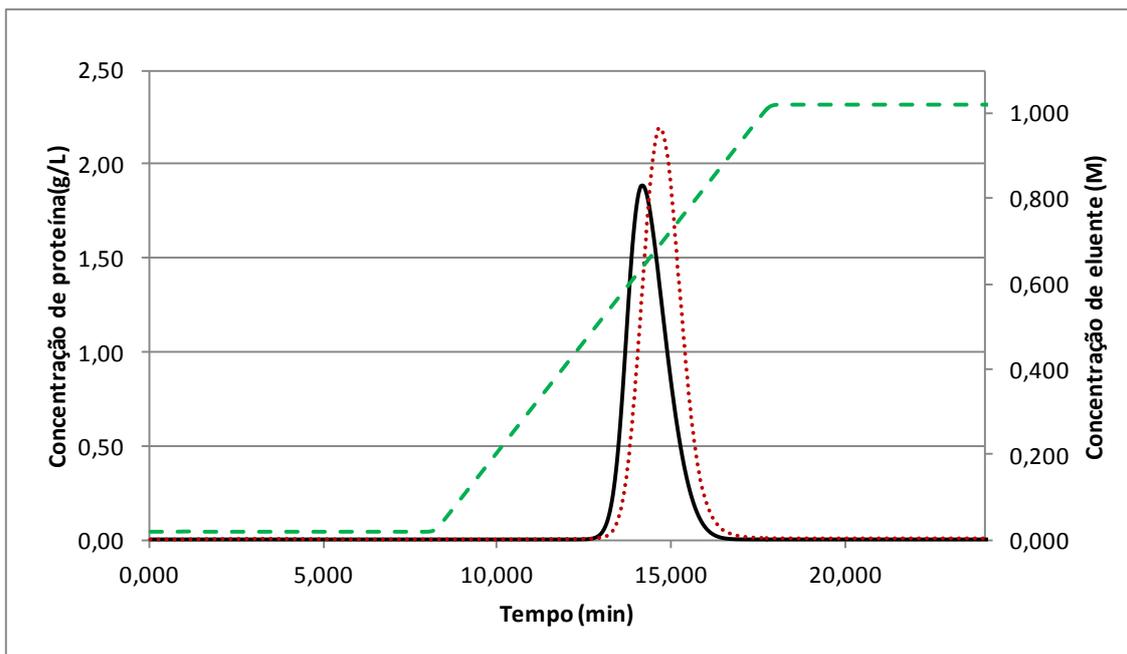


Figura 6.38 – Experimento A20 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

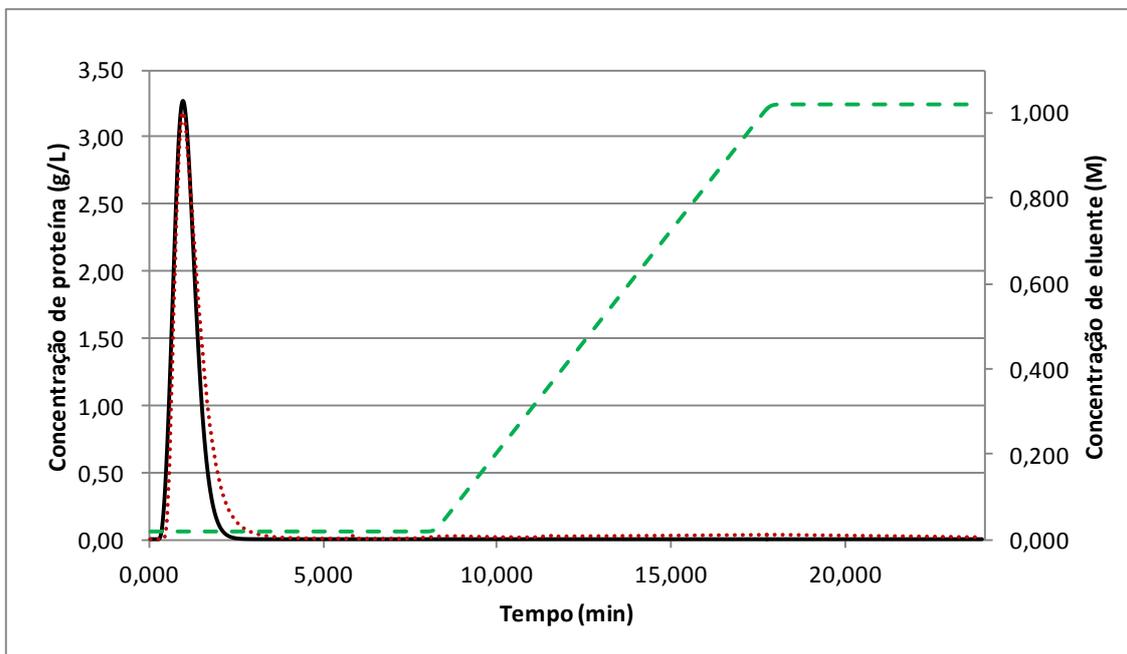


Figura 6.39 – Experimento A9 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), concentração inicial de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

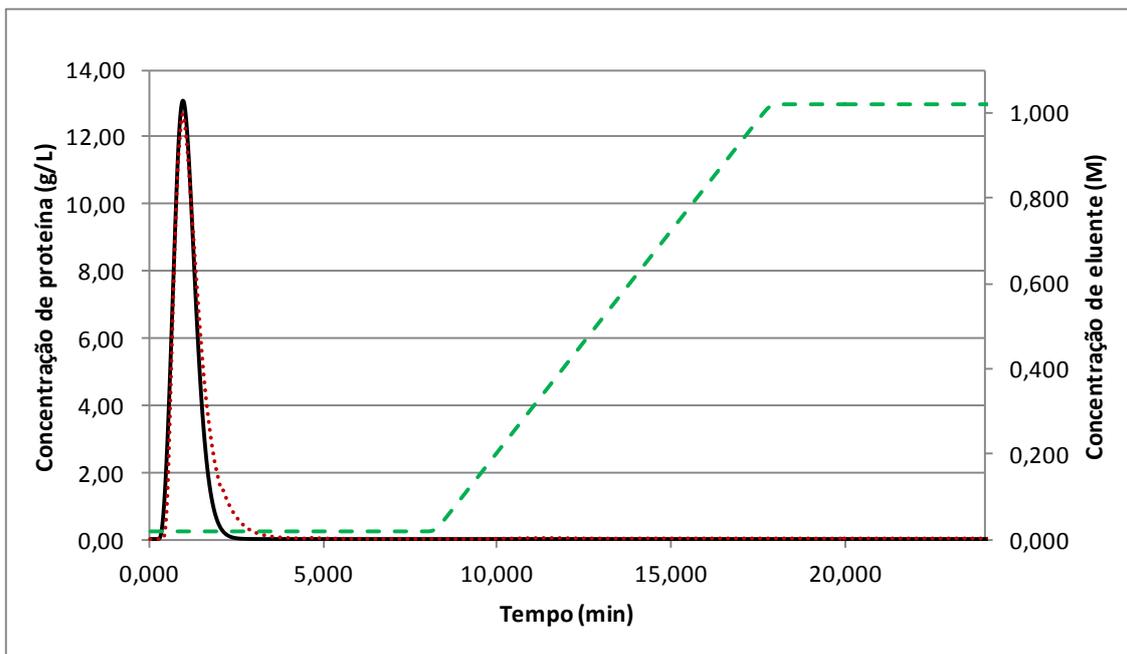


Figura 6.40 – Experimento A10 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

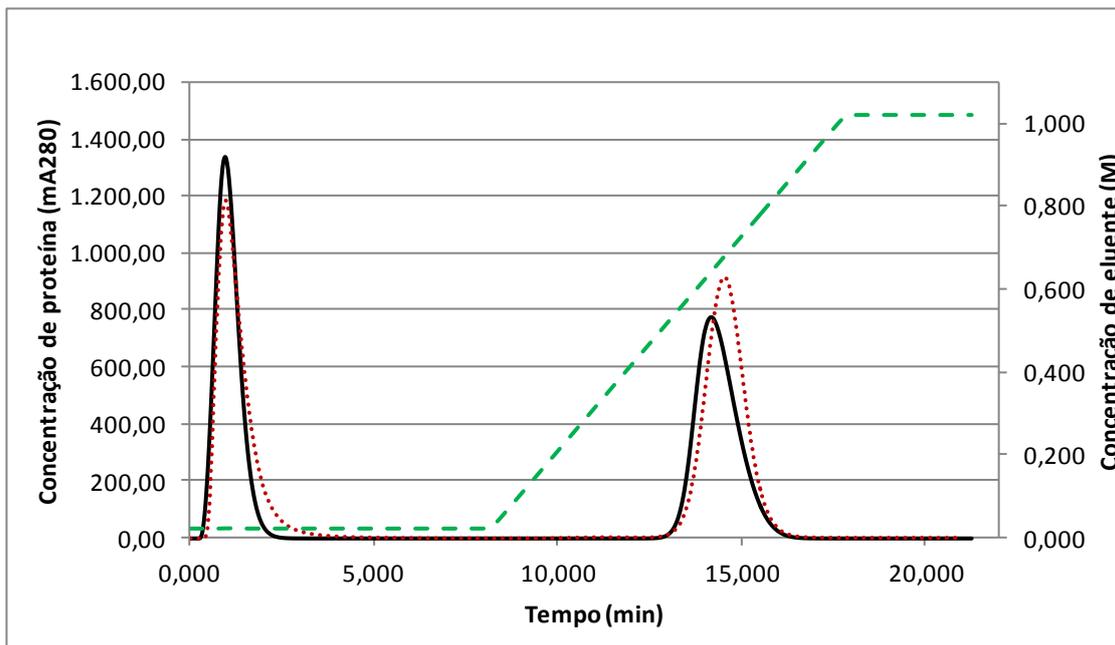


Figura 6.41 – Experimento A36 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301mM + lisozima 0,301 mM) em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

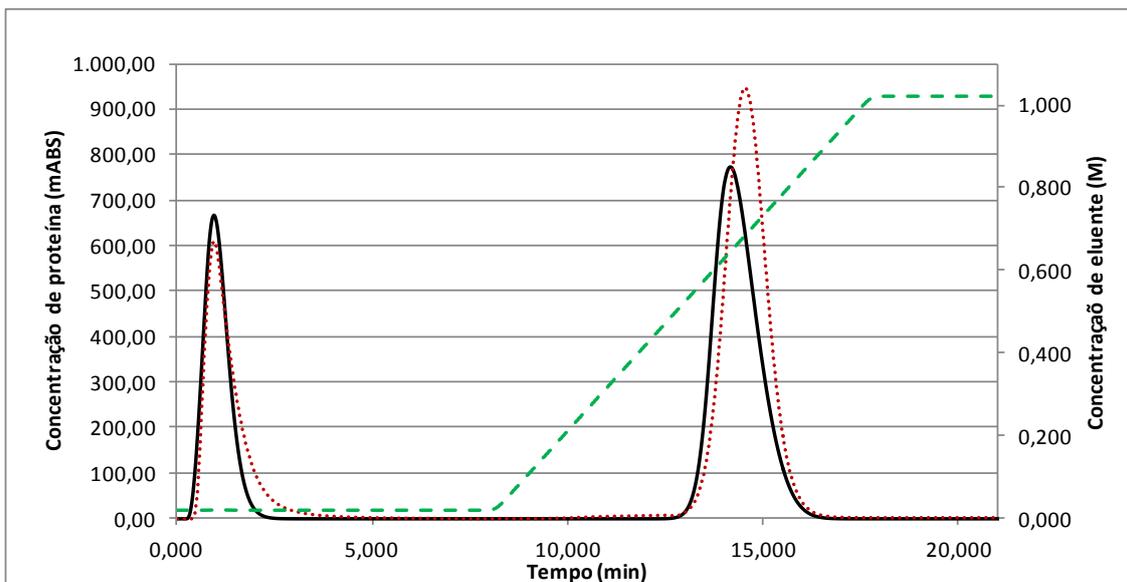


Figura 6.42 – Experimento A37 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,150 mM + lisozima 0,301 mM) em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

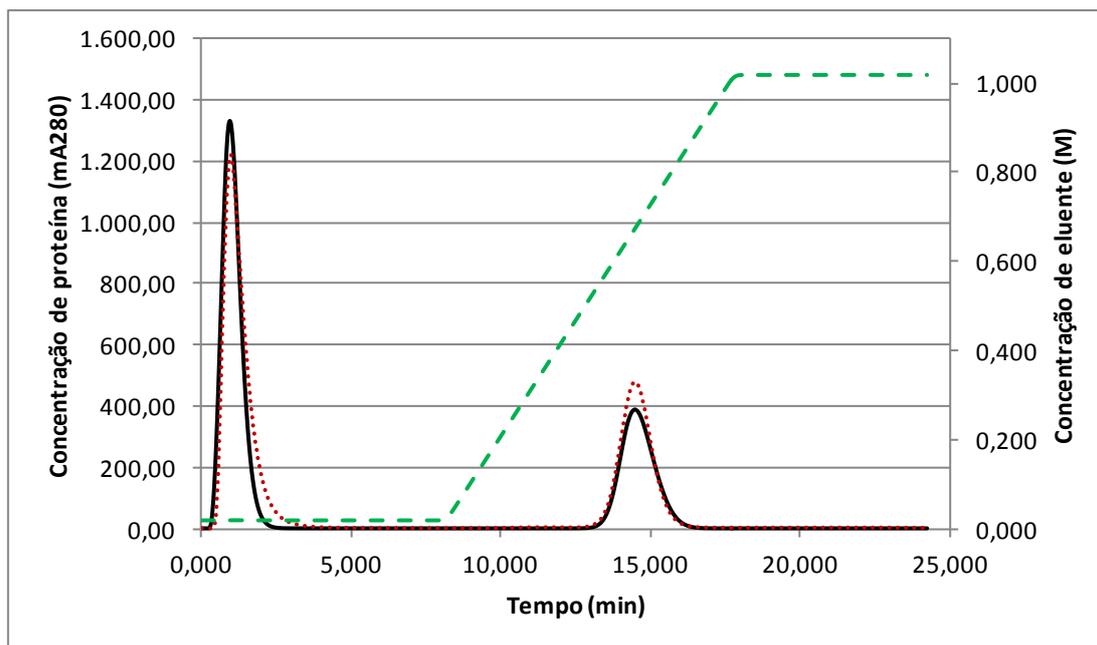


Figura 6.43 – Experimento A38 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301 mM + lisozima 0,150 mM) em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

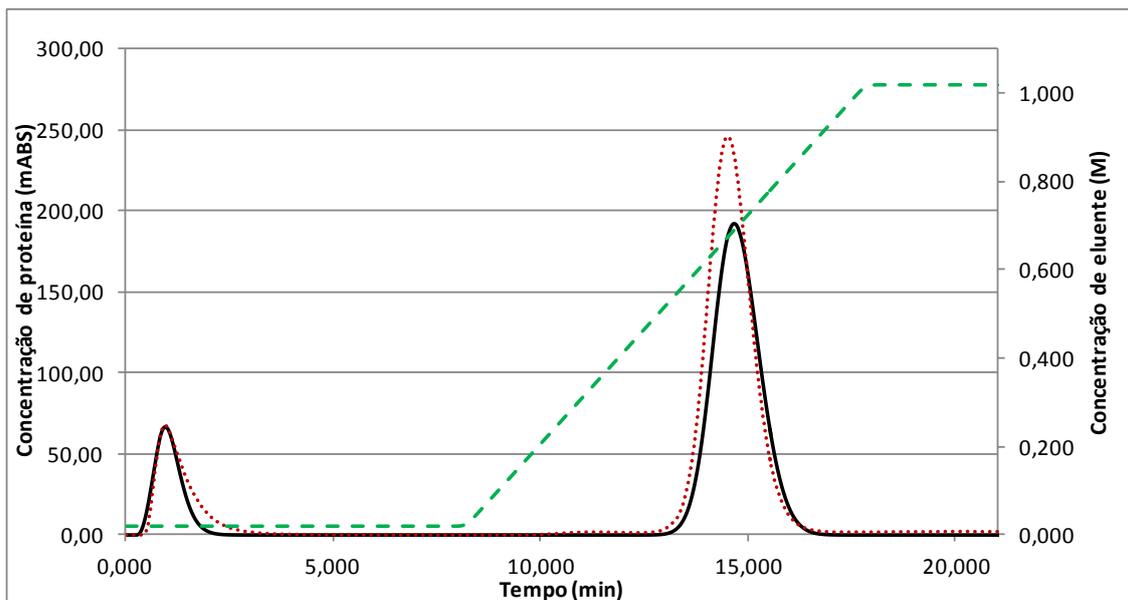


Figura 6.44 – Experimento A39 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,015 mM + lisozima 0,075 mM) em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

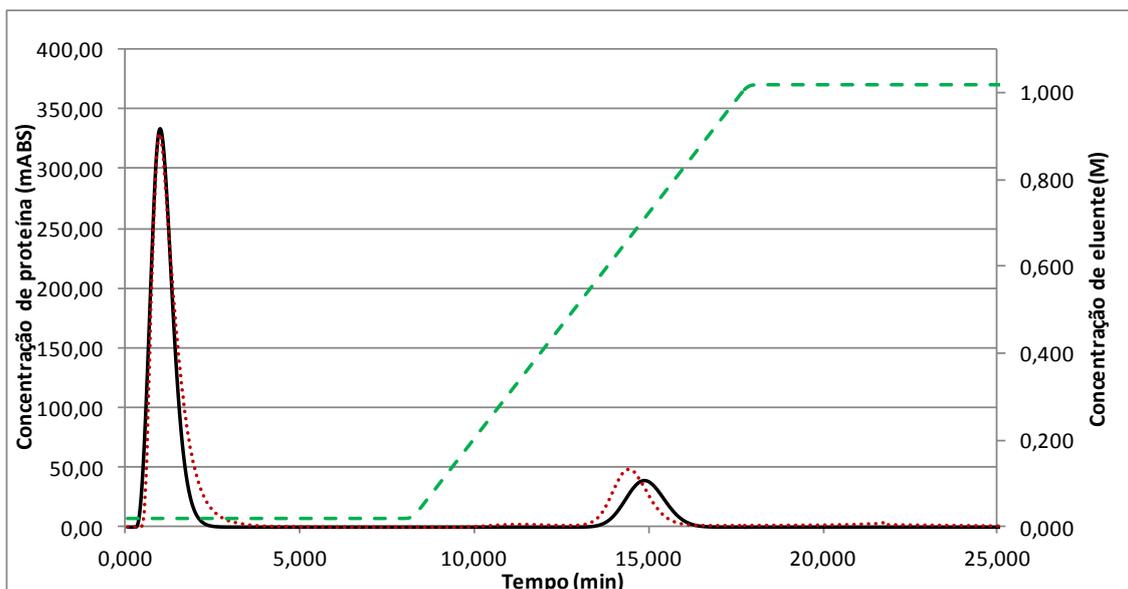


Figura 6.45 – Experimento A40 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,075 mM + lisozima 0,015 mM) em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

A Tabela 6.15 apresenta os valores experimentais de volume de retenção (V_R^{max} e V_R^{EMG}) e o valor simulado do volume de retenção no ponto máximo do pico de eluição (V_R^{calc}).

Tabela 6.15 – Verificação da influência da concentração de injeção de proteína na eluição em coluna HiTrap™ SP FF

Exp	Proteína	Concentração inicial (mM)	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	V_R^{calc} (mL)
A9	BSA	0,075	0,96	1,25	0,96
A10		0,301	0,96	1,24	0,96
A17	Lisozima	0,015	14,37	14,48	14,53
A18		0,075	14,40	14,52	14,44
A19		0,150	14,48	14,60	14,29
A20		0,301	14,64	14,75	14,16
A36	BSA	0,301	0,98	1,28	0,96
	Lisozima	0,301	14,54	14,58	14,19
A37	BSA	0,15	0,98	1,30	0,96
	Lisozima	0,301	14,54	14,59	14,16
A38	BSA	0,301	0,99	1,24	0,96
	Lisozima	0,15	14,51	14,57	14,51
A39	BSA	0,015	0,96	1,34	0,96
	Lisozima	0,075	14,51	14,57	14,65
A40	BSA	0,075	0,96	1,23	0,96
	Lisozima	0,015	14,43	14,49	14,85

Quando a BSA não adsorve (experimentos A9 e A10) o volume de retenção simulado é idêntico independente da concentração de injeção e o comportamento é o mesmo observado experimentalmente. O valor é também o mesmo quando a proteína é eluída a partir de uma mistura com lisozima, independente, portanto, da concentração de injeção de cada proteína. Os valores experimentais, entretanto, variam com a concentração quando há duas proteínas na solução injetada. O comportamento experimental, entretanto, é aleatório não podendo ser identificado um padrão de tal modo que se poderia assumir que a variação é devida ao erro experimental.

Para a lisozima observa-se que o volume de retenção simulado diminui com o aumento da concentração de injeção da proteína, enquanto o comportamento experimental é inverso.

6.3.4 Discussão dos resultados da série "A"

A resposta do modelo aos dados de gradiente de eluição salino é bastante precisa para os estudos de caso com a coluna HiTrap™ SP FF. Entretanto, para a adsorção de

BSA nas colunas HiTrap™ Capto™ DEAE e HiTrap™ Capto™ Q o mesmo comportamento não foi observado.

Como pode ser visualizado nas Figuras 6.13 a 6.16 e 6.24 a 6.27, e já discutido no Capítulo 5, a adsorção da BSA nas resinas Capto™ DEAE e Capto™ Q tende formar uma cauda no perfil de eluição que não é bem descrita pelo modelo. Tal comportamento não é observado na adsorção de lisozima na resina SP FF e essa é a razão para a simulação da coluna HiTrap™ SP FF apresentar boa aderência aos dados experimentais (Figuras 6.35 a 6.38).

As Figuras 6.46, 6.47 e 6.48 ilustram a diferença entre a adsorção de ambas proteínas com a variação da concentração de injeção. Os perfis da adsorção de lisozima em resina SP FF são praticamente simétricos aproximando-se de uma curva gaussiana, e os resultados simulados apresentam qualitativamente o mesmo comportamento das curvas experimentais (Figura 6.46A e Figura 6.46B). Nas Figuras 6.47A e 6.48A pode ser observada a dispersão da parte final do pico de eluição da BSA nas colunas HiTrap™ Capto™ DEAE e HiTrap™ Capto™ Q, respectivamente. Já nas Figuras 6.47B e 6.48B o mesmo comportamento não pode ser observado e qualitativamente parece existir uma ligeira dispersão da parte frontal da curva.

Pouquíssimos trabalhos na literatura que tratam da modelagem da coluna cromatográfica abordam este problema talvez em decorrência das condições experimentais com baixa concentração de injeção ou talvez devido às características dos sistemas proteína/resina estudados. Entretanto, é comum encontrar essa tendência experimentalmente, de formação de uma cauda, ao lidar com a adsorção de proteína, especialmente em concentrações de injeção elevadas.

Li e Pinto (1995) modelando uma coluna de troca iônica ao se depararem com tal comportamento experimental não correlacionado pelo modelo, afirmaram que a formação da cauda era devido à presença de impurezas ou a variações da BSA na solução.

Karkov e colaboradores (2013) simularam uma coluna cromatográfica multimodal com modificadores de fase móvel empregando o modelo SMA. Eles afirmaram que a formação da cauda era devido à dimerização da BSA que não é descrita pelo modelo e concluíram que a descrição apenas da parte frontal do pico era satisfatória.

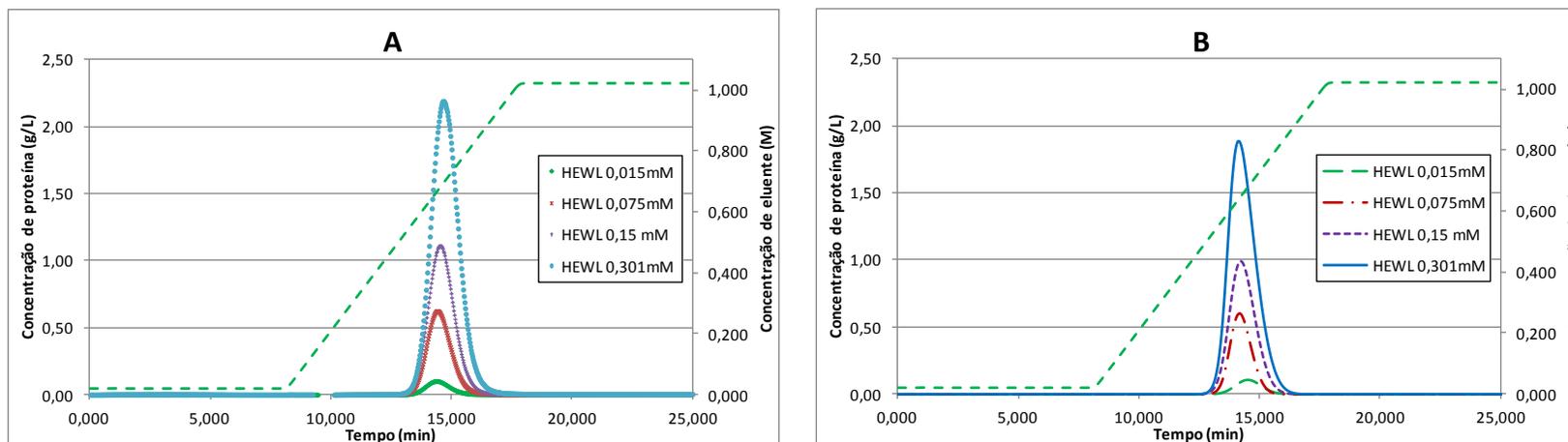


Figura 6.46 – Comportamento das curvas de eluição de lisozima em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL) em diferentes condições de injeção, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV. (A) Dados experimentais. (B) Resultados da simulação.

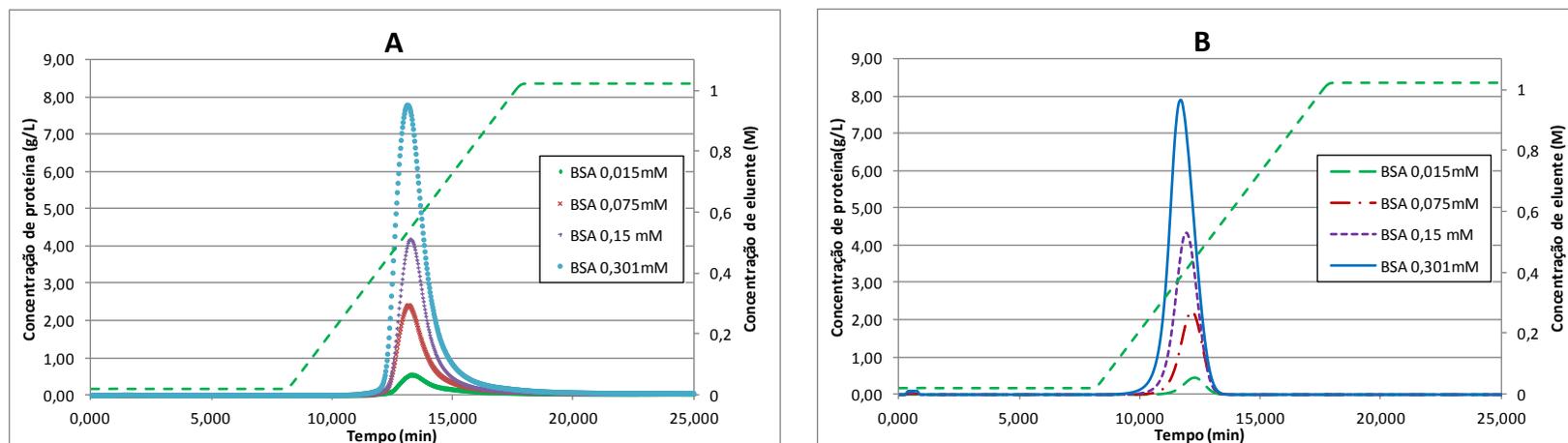


Figura 6.47 – Comportamento das curvas de eluição de BSA em coluna HiTrap™ Capto™ DEAE (1 mL) em diferentes condições de injeção, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV. (A) Dados experimentais. (B) Resultados da simulação.

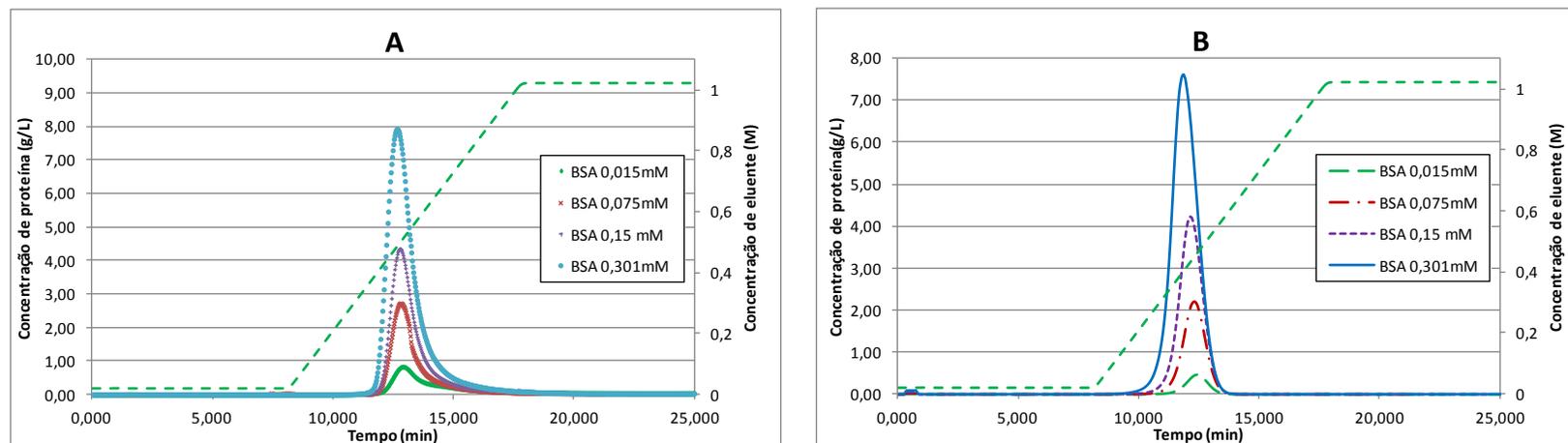


Figura 6.48 – Comportamento das curvas de eluição de BSA em coluna HiTrap™ Capto™ Q (1 mL) em diferentes condições de injeção, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV. (A) Dados experimentais. (B) Resultados da simulação.

É possível encontrar nos livros de teoria cromatográfica um argumento bem estabelecido para este tipo de fenômeno. A dispersão da parte final do pico de eluição de proteínas, comumente chamada de formação de cauda, seria um comportamento típico de isothermas de adsorção convexas, como a equação de Langmuir, e o oposto aconteceria em isothermas côncavas (SCHULTE e EPPING, 2005).

De fato, o perfil de eluição de uma determinada proteína depende da forma de interação entre a fase móvel e a fase estacionária. Esta, por sua vez, dá origem a diferentes tipos de modelos de isothermas que são genericamente classificadas como lineares, convexas e côncavas. A Figura 6.49 apresenta uma ilustração, exibida em Schulte e Epping (2005), da correlação entre os diferentes formatos das isothermas com os perfis de eluição. A diferença entre as figuras que apresentam o cromatograma ideal e as que apresentam o cromatograma real se devem a efeitos de transferência de massa, não devendo ser confundidos com os efeitos do equilíbrio termodinâmico que dão origem aos diferentes formatos das isothermas.

As isothermas lineares ocorrem quando os perfis de concentração de cada componente são independentes da concentração de injeção dos componentes e do volume de injeção (SEVERO JR., 2011). É um comportamento típico de cromatografia analítica e comumente classificada como cromatografia linear. Em geral, o comportamento linear ocorre em baixas concentrações de injeção e todos os tipos de isoterma apresentam a primeira parcela da curva (concentração próxima de zero) com formato linear. A classificação contrária à cromatografia linear é a cromatografia não linear que é típica de cromatografia líquida preparativa (caso analisado nesta pesquisa).

Já a classificação como cromatografia ideal parte do princípio que a dispersão axial é muito pequena e a resistência à transferência de massa é negligenciada.

Pela comparação da Figura 6.46 com a Figura 6.49, a adsorção da lisozima na resina SP FF poderia ser considerado o de uma cromatografia linear e isso, seria decorrente não da real característica linear da isoterma de adsorção da lisozima nesta resina, mas teria sido ocasionado pela baixa concentração de injeção dessa proteína.

Entretanto, para uma isoterma linear, a derivada da equação em relação à concentração é uma constante (constante de Henry) e assim, variações na concentração de injeção provocariam apenas variações na altura do pico de eluição (SCHULTE e EPPING, 2005). Esse comportamento, não foi observado experimentalmente, podendo

ser verificado na Tabela 5.1 que o volume de retenção aumenta com o aumento da concentração de injeção da proteína. Isso caracterizaria teoricamente uma isoterma côncava cuja inclinação aumenta com o aumento da concentração provocando o mesmo efeito no tempo de retenção.

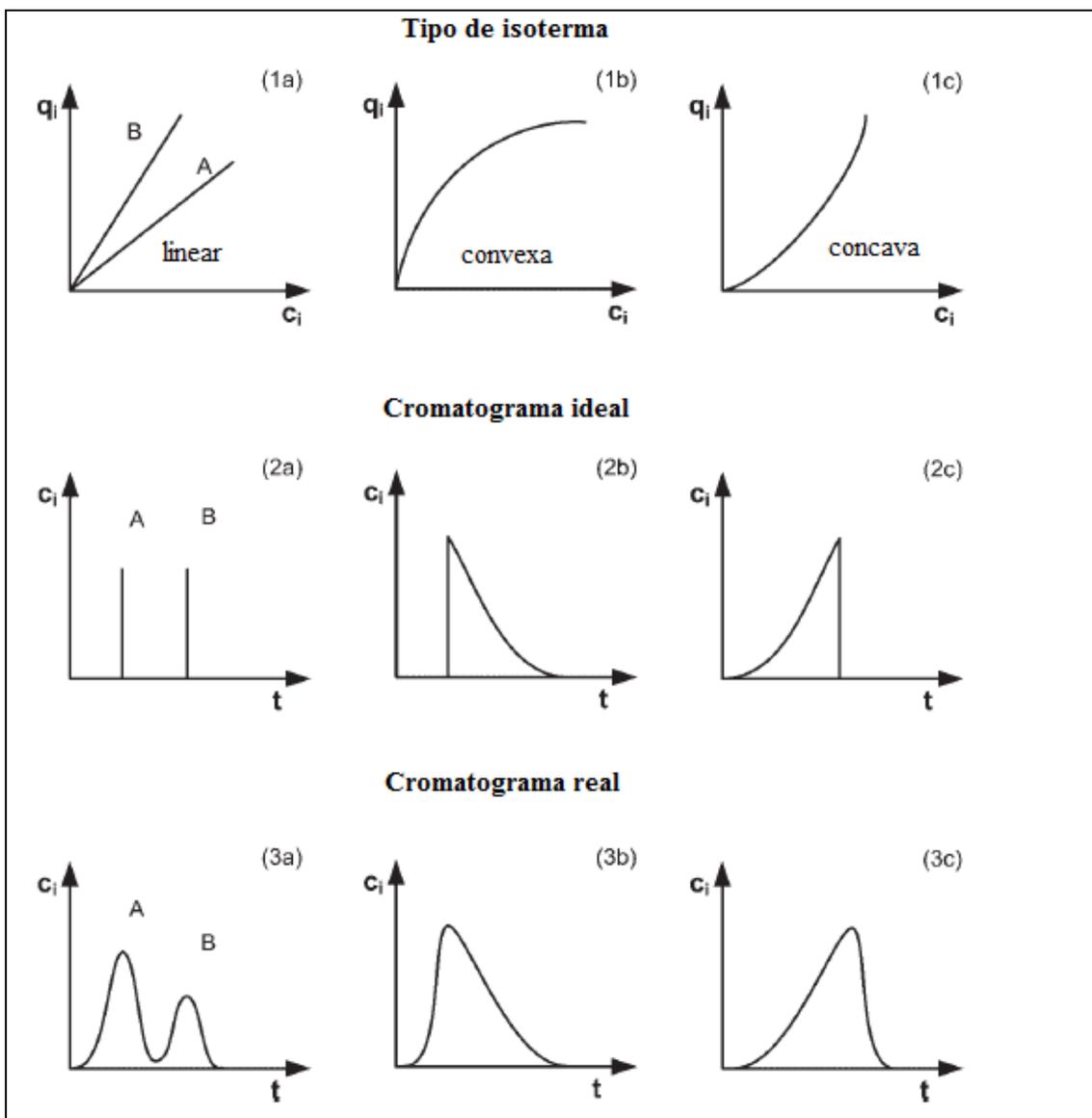


Figura 6.49 – Influência do tipo de isoterma sobre o cromatograma

Fonte: Adaptado de Schulte e Epping (2005)

A Figura 6.50 traz dois exemplos da literatura de isotermas de adsorção de lisozima em resina catiônica. Verifica-se que as curvas apresentam comportamento convexo e inclusive no trabalho de Carta e colaboradores (2005) as curvas foram modeladas utilizando a equação de Langmuir.

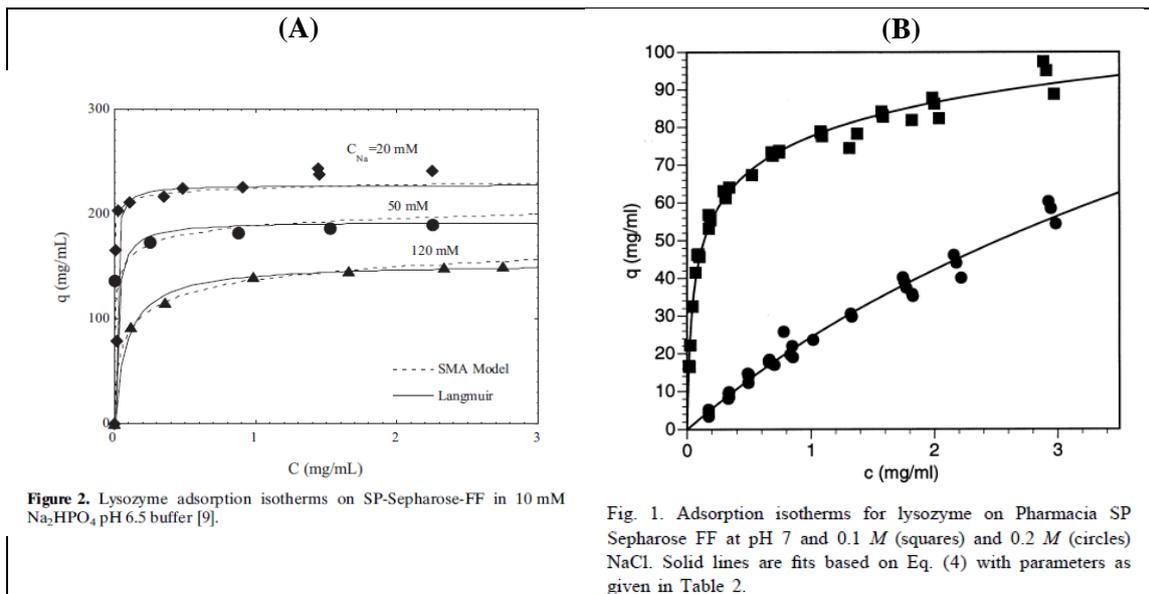


Figura 6.50 – (A) Isotermas de adsorção de lisozima em resina SP FF, pH 6,5 (B) Isotermas de adsorção de lisozima em resina SP FF, pH 7

Fonte: (A) Carta *et al.* (2005) (B) Chang e Lenhoff (1998)

Dessa forma, verifica-se que a teoria não é capaz de explicar o comportamento encontrado para a curva de eluição da lisozima. Entretanto, o ideal seria repetir os experimentos a fim de verificar a influência do erro experimental no comportamento do volume de retenção da lisozima.

Por outro lado, o comportamento da BSA, em uma análise da Figura 6.49, é bastante típico de um cromatograma real na presença de uma isoterma convexa e isso indica que a faixa de concentração analisada desta proteína encontra-se na região não linear da isoterma de adsorção. A inclinação da isoterma diminui com o aumento da concentração de proteína e o mesmo acontece com o tempo de retenção, fato que foi observado experimentalmente e pode ser verificado na Tabela 5.1.

O valor do volume de retenção simulado sempre diminui com o aumento da concentração de injeção e isso caracterizaria que a isoterma proposta nesta tese é convexa.

A Figura 6.51 traz dois exemplos da literatura de isotermas de adsorção de BSA em resinas aniônicas. Em ambos os casos verifica-se que o aumento da concentração de sal provoca uma diminuição na concentração de proteína adsorvida.

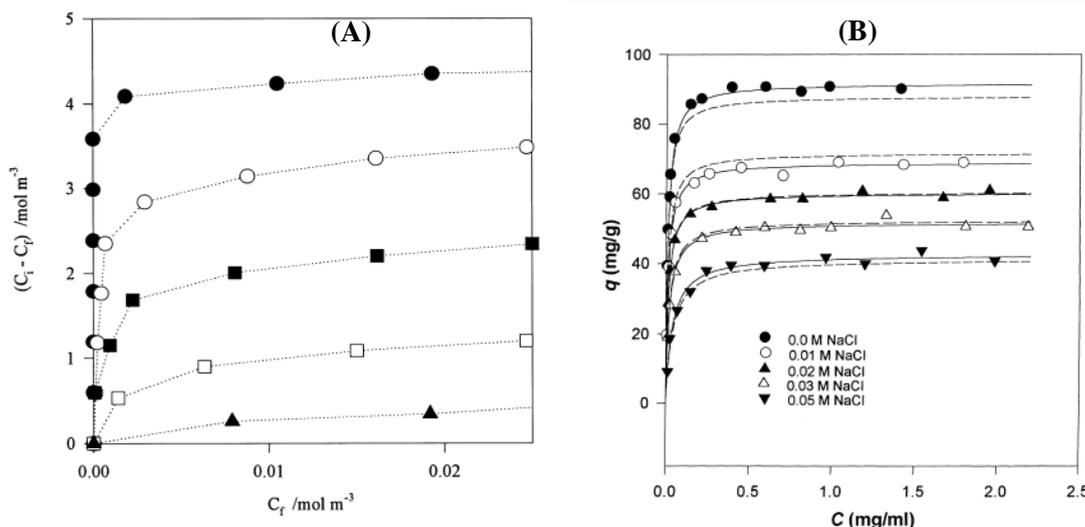


Fig. 8. Ion-exchange isotherms for exchange of BSA at QA5 at pH 6.8 in NaCl solutions of different ionic strength: ● [NaCl]=0; ○, [NaCl]=0.01 M; ■, [NaCl]=0.03 M; □ [NaCl]=0.06 M; ▲, [NaCl]=0.1 M. The lines shown are for convenience only.

Fig. 1. Comparison between the experimental isotherms (symbol), best-fit Langmuir isotherms for given individual NaCl concentration (—) and the isotherms predicted by the modified Langmuir model (---).

Figura 6.51 – Influência da concentração de NaCl na isoterma de adsorção de BSA em resinas aniônicas. (A) Adsorção de BSA em resina QA52 (B) Adsorção de BSA em resina Diaion

Fonte: (A) Bowen *et al.* (1998) (B) Lan *et al.* (2001)

A Figura 6.52 apresenta as isotermas de adsorção de BSA em resina Capto™ DEAE para diferentes concentrações salinas, calculadas utilizando os parâmetros da Tabela 6.11. Verifica-se que, assim como o comportamento experimental esperado, o aumento da concentração salina provoca uma diminuição da concentração de proteína adsorvida. É possível perceber também que em concentração de NaCl constante as curvas resultantes do modelo proposto são sempre convexas.

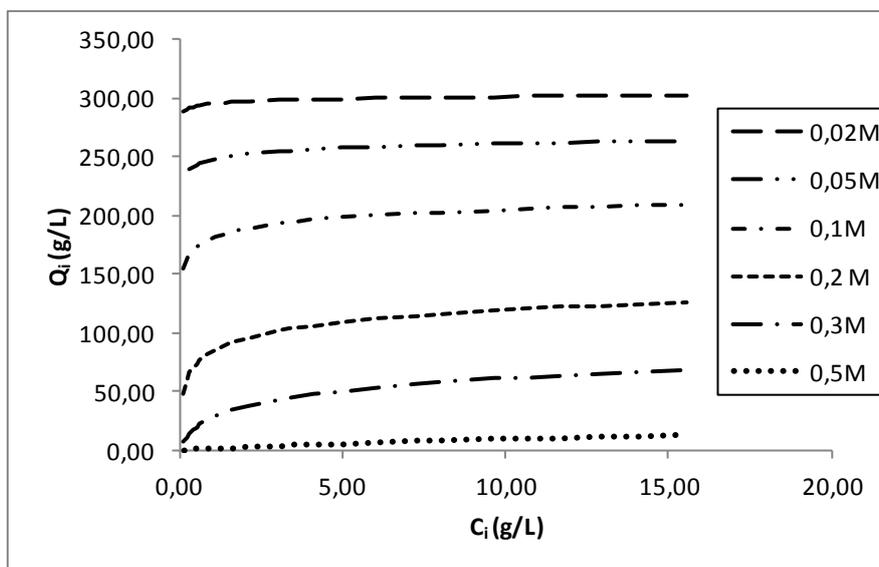


Figura 6.52 – Isotherma de adsorção para lisozima em resina Capto™ DEAE, em pH 7 para diferentes concentrações de NaCl, utilizando os parâmetros da Tabela 6.11

Portanto, outros fatores precisam ser analisados para o entendimento do comportamento do pico de eluição simulado com ligeira dispersão da parte frontal da curva ao invés da dispersão da parte final, como ocorre experimentalmente.

Para isso, foram calculados os valores de assimetria encontrados nas curvas simuladas resultantes da eluição de BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE. Assim como exposto no Capítulo 5, as curvas simuladas foram ajustadas com auxílio do programa TableCurve2D a uma curva gaussiana exponencialmente modificada (Equação 5.1).

A assimetria (ω) foi calculada pela Equação 6.2 como a razão entre o terceiro momento central e o desvio padrão elevado ao cubo.

$$\omega = \frac{2\tau^3}{(\sigma^2 + \tau^2)^{3/2}} \quad (6.2)$$

Valores de assimetria maiores que um indicam a formação de uma cauda à direita, valores menores que um indicam a formação de uma cauda à esquerda e valores iguais a zero indicam que a distribuição é aproximadamente simétrica.

A Tabela 6.16 apresenta os valores de assimetria calculados para as curvas simuladas dos experimentos A1 a A4. Todos são valores positivos o que indica uma formação de cauda para a direita. Deve-se, portanto, buscar entender por quê o formato da cauda simulada é distinto da cauda experimental.

Tabela 6.16 – Verificação da assimetria dos resultados simulados

Experimento	A1	A2	A3	A4
ω	1,80	1,48	1,06	0,88

A Figura 6.53 traz uma comparação qualitativa entre as curvas de eluição simuladas com três diferentes isotermas e as curvas experimentais. Para esta simulação foram utilizados os parâmetros apresentados na Tabela 6.11. O *frame* A apresenta o resultado da utilização do modelo SMA original onde todos os coeficientes de atividade são considerados unitários. O *frame* B traz novamente o resultado obtido pelo modelo proposto nesta tese que calcula os coeficientes de atividade da proteína e do sal. O

frame C traz o resultado da utilização de uma isoterma linear. Por fim, o frame D apresenta novamente os resultados experimentais para facilitar a comparação.

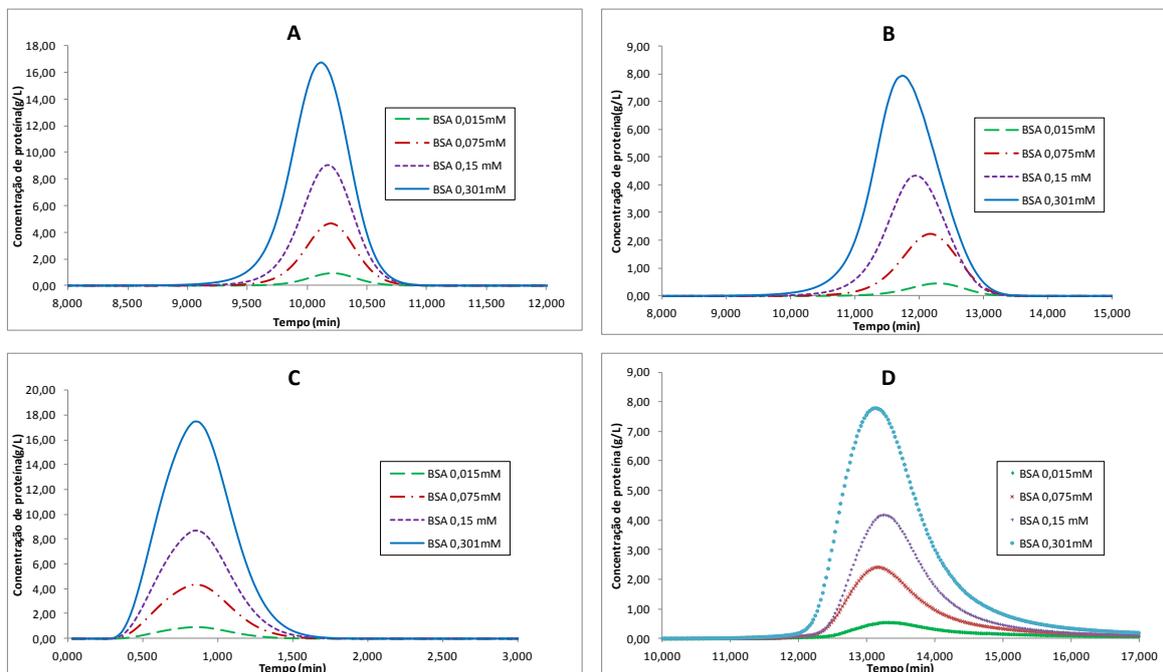


Figura 6.53 – Comportamento das curvas de eluição de BSA em coluna HiTrap™ Capto™ DEAE em diferentes condições de injeção. (A) Isotherma de adsorção considerando todos os coeficientes de atividade iguais a um (B) Isotherma de adsorção contemplando cálculo do coeficiente de atividade da BSA e do sal (C) Isotherma de adsorção linear (D) Curva experimental

Como resultado da utilização de uma isoterma linear (Equação 6.3), temos na Figura 6.53 C os volumes de retenção constantes e independentes da concentração de injeção da proteína.

$$\frac{Q_i}{C_{P,i}} = K_i \tag{6.3}$$

O resultado do modelo SMA (que considera os coeficientes de atividade da Equação 6.4 unitários) apresentado na Figura 6.53 A é o de um cromatograma bastante próximo ao de uma isoterma ideal. O comportamento das curvas varia apenas ligeiramente com o aumento da concentração de injeção.

$$\frac{Q_i}{C_{P,i}} = K_i \left(\frac{\Lambda}{C_{P,S} Z_S} \right)^{v_i} \frac{\gamma_i}{\gamma_S^{v_i}} \left(1 - \sum_{j=1}^m \frac{Q_j}{Q_j^{max}} \right)^{v_i} \tag{6.4}$$

Verifica-se que a parte inicial da curva é bastante similar entre a Figura 6.53A e 6.53B e distinta das demais figuras. Analisando as equações das isotermas, pode-se inferir que as características da parte inicial da curva estejam, portanto, mais associadas à capacidade máxima de adsorção (Q_j^{max}), enquanto a parte final da curva está mais associada à não idealidade das fases.

O melhor ajuste, portanto, da parcela inicial da curva pode ser buscado através de uma melhor representação da capacidade máxima de adsorção.

Velayudhan e colaboradores (1992) explicam que dados experimentais de moléculas pequenas de curvas de eluição isocrática apresentam um comportamento triangular como os da Figura 6.54 e que um modelo triangular dos picos seria válido para razões até 0,1 entre a massa da amostra e a capacidade de saturação da coluna.

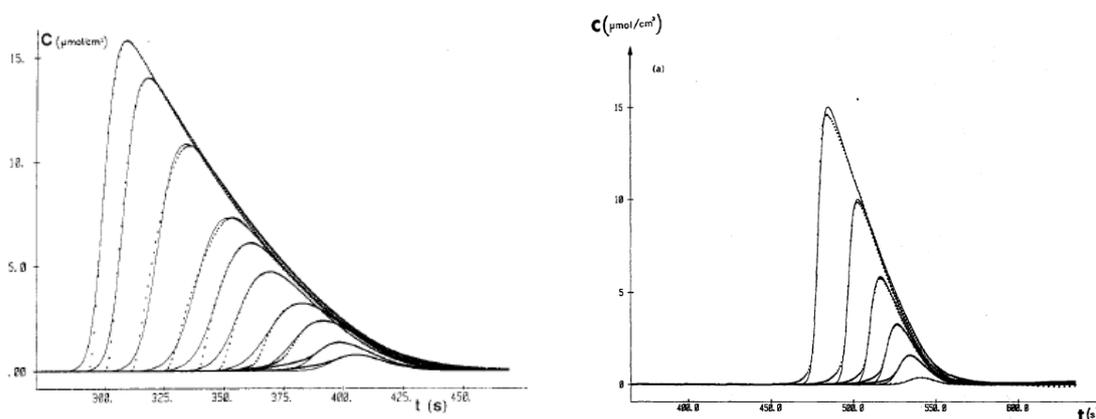


Figura 6.54 – (A) Comportamento das curvas de eluição de álcool benzílico em diferentes condições de injeção (B) Comportamento das curvas de eluição de cis-androsterona em diferentes condições de injeção

Fonte: (A) Jaulmes *et al.* (1986) (B) Gonzalez e Jaulmes (1987)

Tipicamente os estudos de modelagem de cromatografia preparativa lidam com eluição isocrática, isto é, a concentração de sal é sempre constante. Acredita-se, portanto que o aumento da concentração de sal na cromatografia por gradiente de eluição torna o comportamento da isoterma distinto daquele encontrado na cromatografia isocrática e o modelo não é capaz de prever esse comportamento.

6.3.5 Verificação da influência do volume da coluna

Os parâmetros previamente estimados para cada coluna foram utilizados para

predição da curva de eluição em colunas maiores a fim de verificar se seria possível realizar o aumento de escala prevendo o comportamento da curva de eluição, com parâmetros independentes do tamanho da coluna. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.17. Todos os experimentos foram realizados em tampão fosfato 0,02M, pH 7 e com gradiente salino de 10 volumes de coluna.

Tabela 6.17 – Verificação da influência do volume da coluna

Exp	Coluna	Proteína	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	V_R^{calc} (mL)
B2	HiScreen™ Capto™ DEAE		44,80	45,98	42,32
B4	HiScreen™ Capto™ Q	BSA 0,301mM	44,83	43,97	51,20
B6	HiScreen™ SP FF		2,94	3,28	3,04
B8	HiScreen™ Capto™ DEAE		2,12	2,23	2,12
B10	HiScreen™ Capto™ Q	Lisozima 0,301mM	2,30	2,46	2,85
B12	HiScreen™ SP FF		48,46	49,11	49,43
B13	HiScreen™ Capto™ DEAE	BSA 0,301mM	44,62	45,95	49,31
		Lisozima 0,301mM	2,40	2,51	2,12
B14	HiScreen™ Capto™ Q	BSA 0,301mM	42,94	43,92	50,16
		Lisozima 0,301mM	2,21	2,32	3,06
B15	HiScreen™ SP FF	BSA 0,301mM	2,67	3,38	3,31
		Lisozima 0,301mM	50,05	50,28	54,37

Os desvios entre os valores V_R^{max} e V_R^{calc} chegam a 17%, gerando diferenças de até 7mL no volume de retenção calculado em relação ao experimental, o que representa 1,5 vezes o volume da coluna.

As Figuras 6.55 a 6.63 trazem as curvas de eluição experimental e simulada superimpostas uma a outra a fim de permitir a visualização da aderência do modelo. São apresentados os resultados das proteínas individualmente eluídas e de ambas as proteínas eluídas juntas. Da mesma forma que nas colunas HiTrap™, os resultados na coluna HiScreen™, mostram que o modelo não é capaz de correlacionar bem a adsorção da BSA nas resinas aniônicas. Já a predição do comportamento da coluna HiScreen™ SP FF é excelente e o modelo foi capaz de prever o tempo de retenção em uma condição diferente de vazão e de volume de coluna.

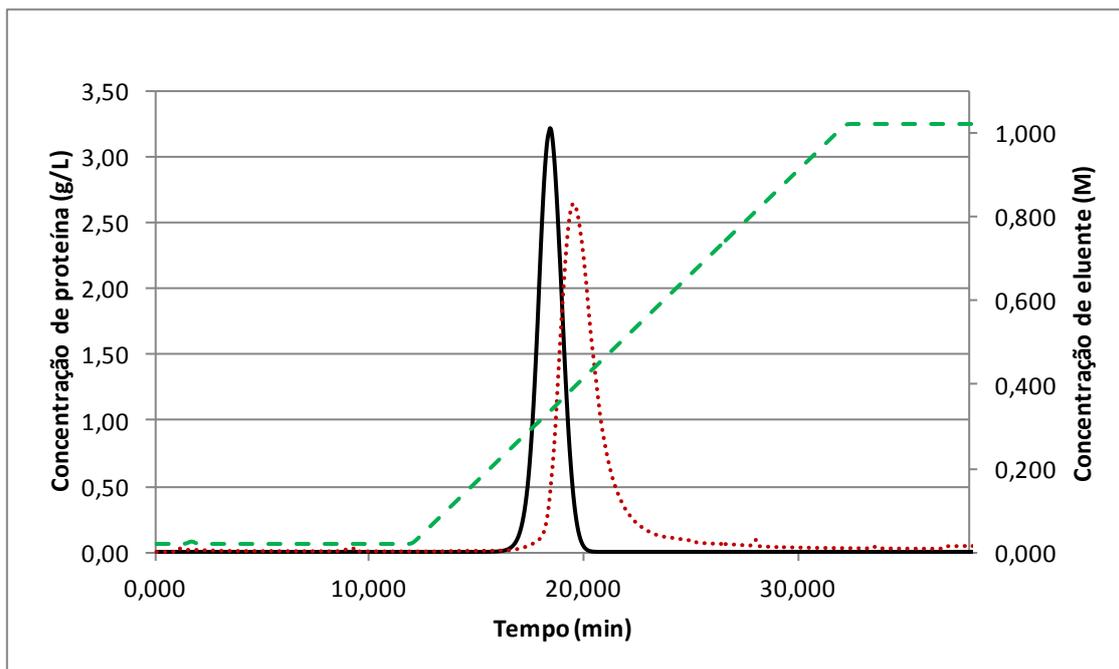


Figura 6.55 – Experimento B2 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiScreen™ Capto™ DEAE (4,7 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

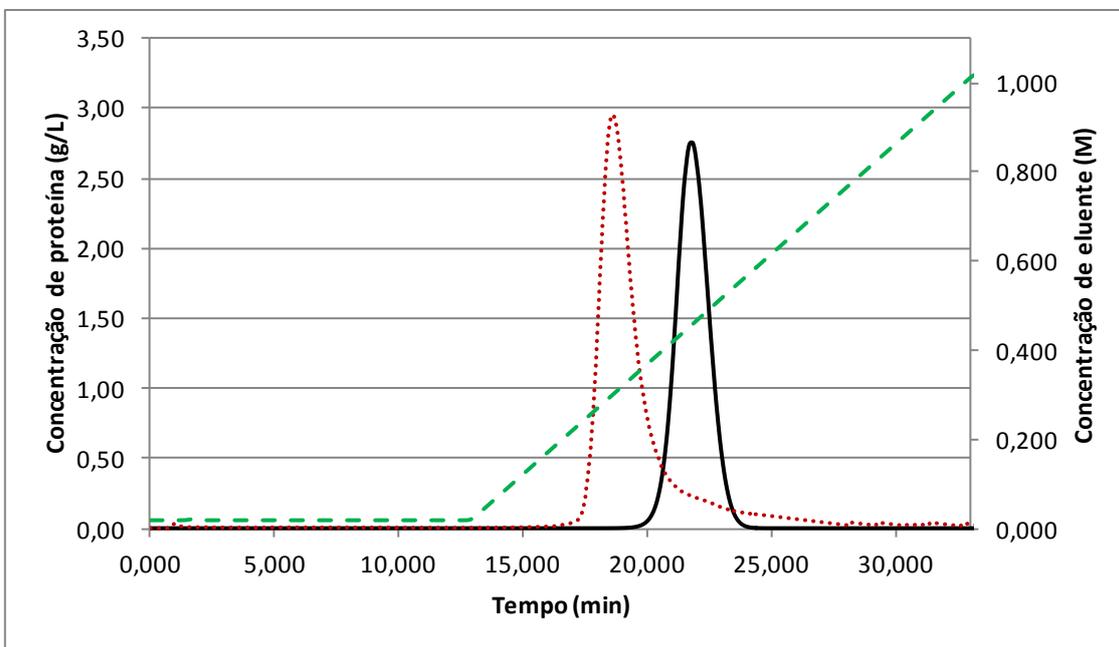


Figura 6.56 – Experimento B4 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiScreen™ Capto™ Q (4,7 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

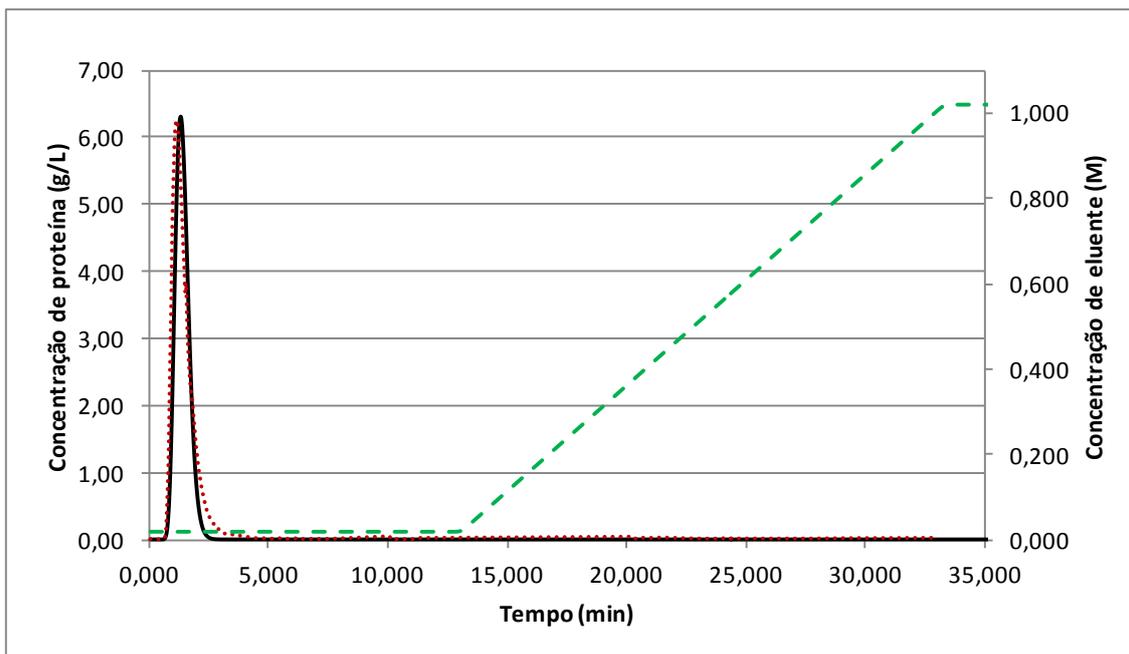


Figura 6.57 – Experimento B6 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para BSA em coluna HiScreen™ SP FF (4,7 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

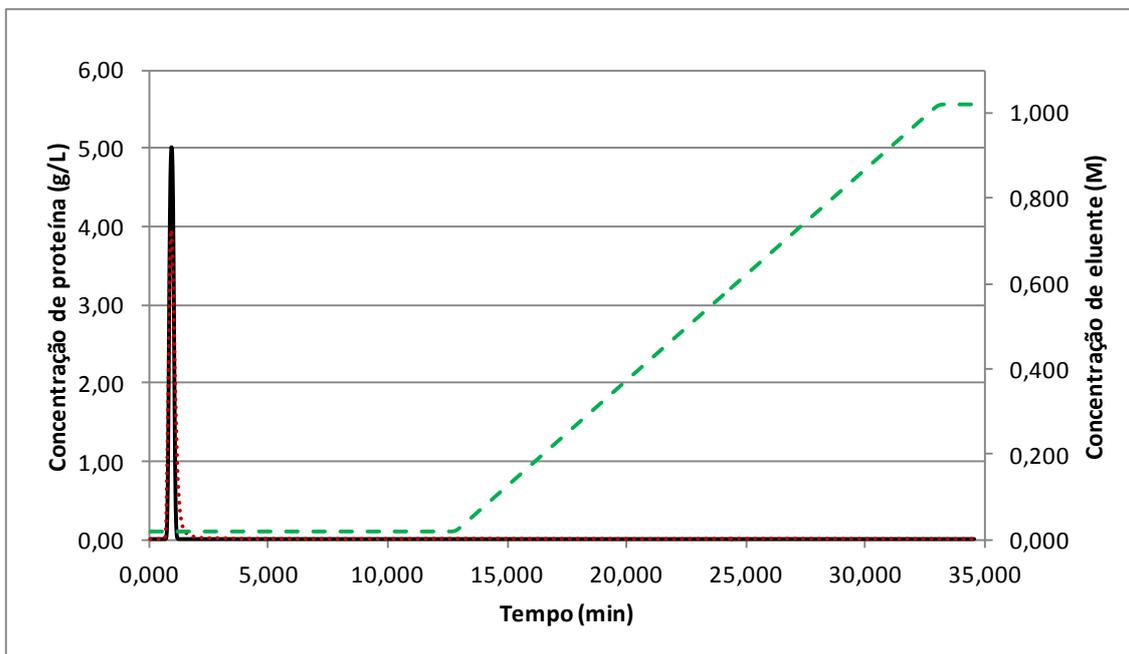


Figura 6.58 – Experimento B8 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiScreen™ Capto™ DEAE (4,7 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

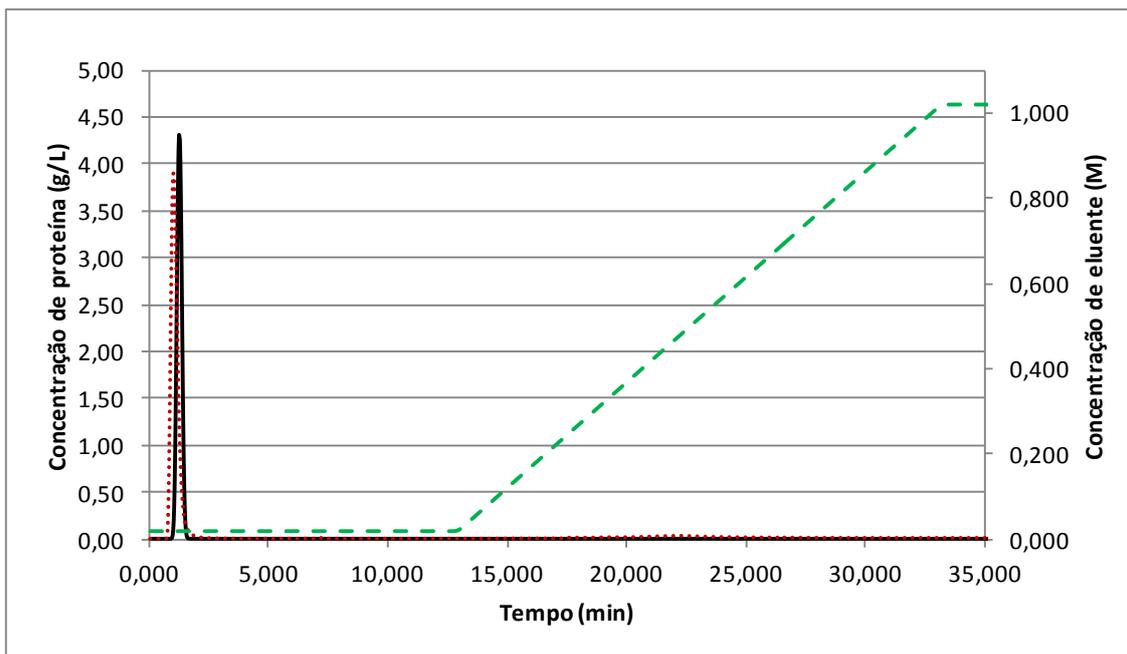


Figura 6.59 – Experimento B10 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiScreen™ Cpto™ Q (4,7 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

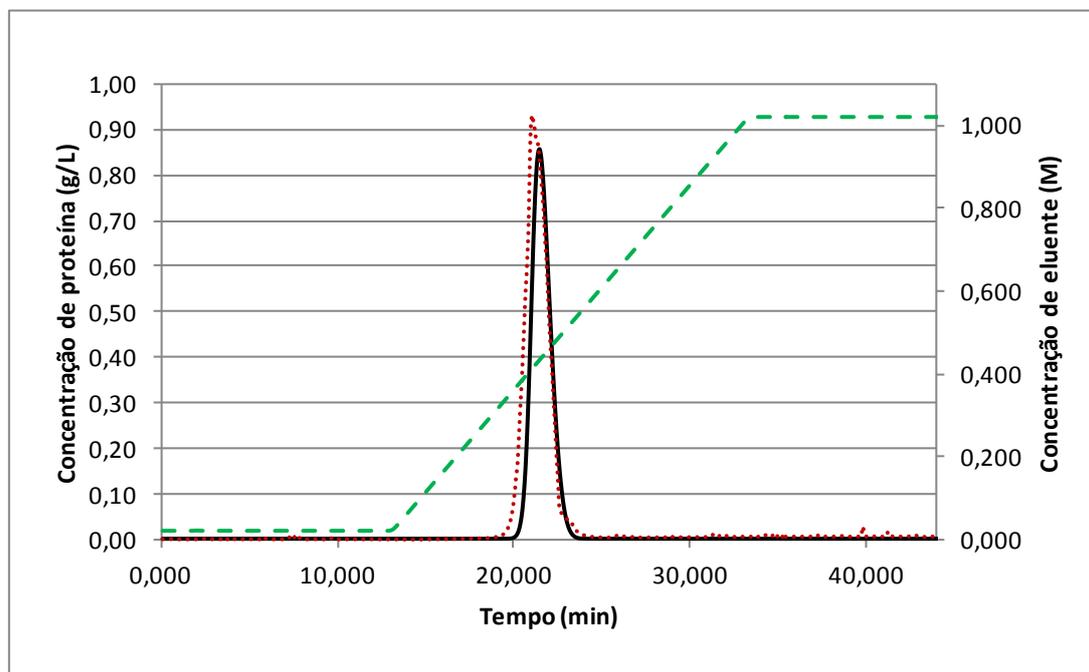


Figura 6.60 – Experimento B12 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para lisozima em coluna HiScreen™ SP FF (4,7 mL), concentração inicial de proteína 0,301mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

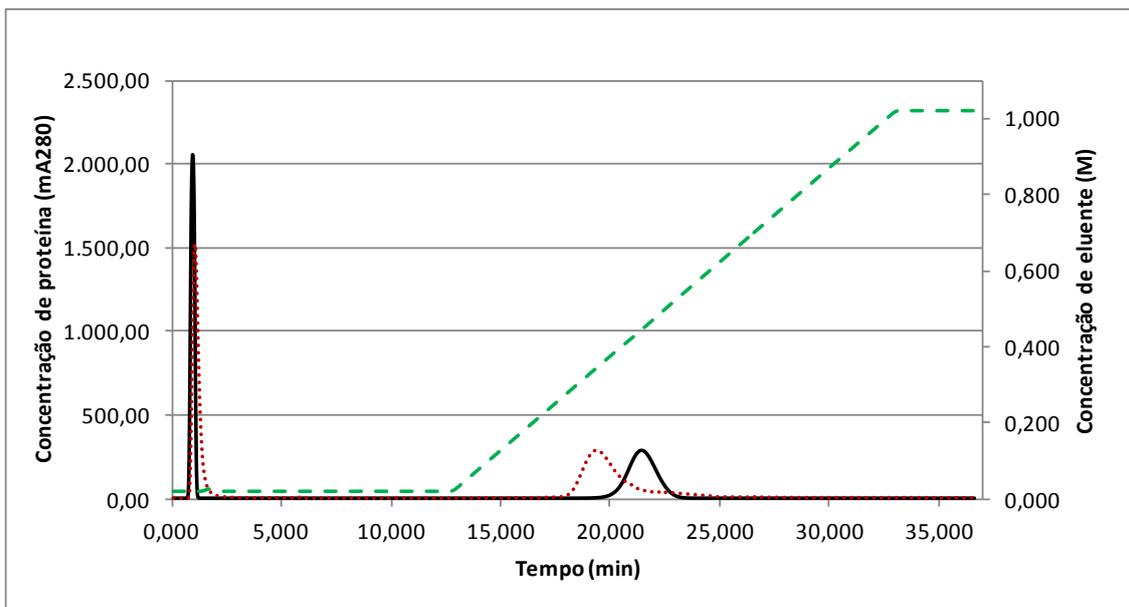


Figura 6.61 – Experimento B13 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301mM + lisozima 0,301mM) em coluna HiScreenTM CaptoTM DEAE (4,7 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

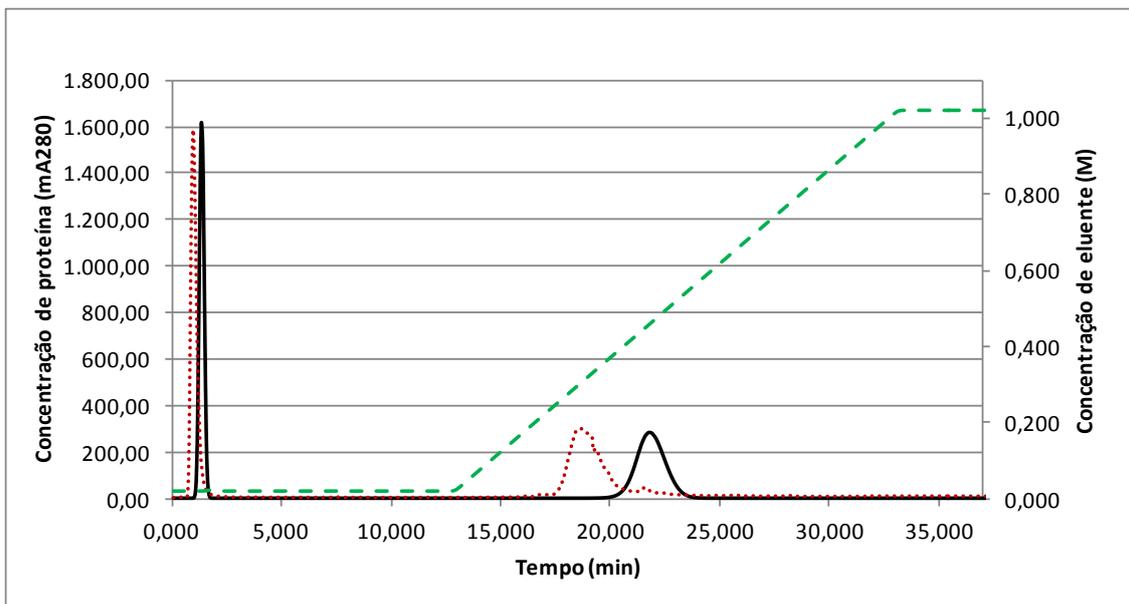


Figura 6.62 – Experimento B14 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301mM + lisozima 0,301mM) em coluna HiScreenTM CaptoTM Q (4,7 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

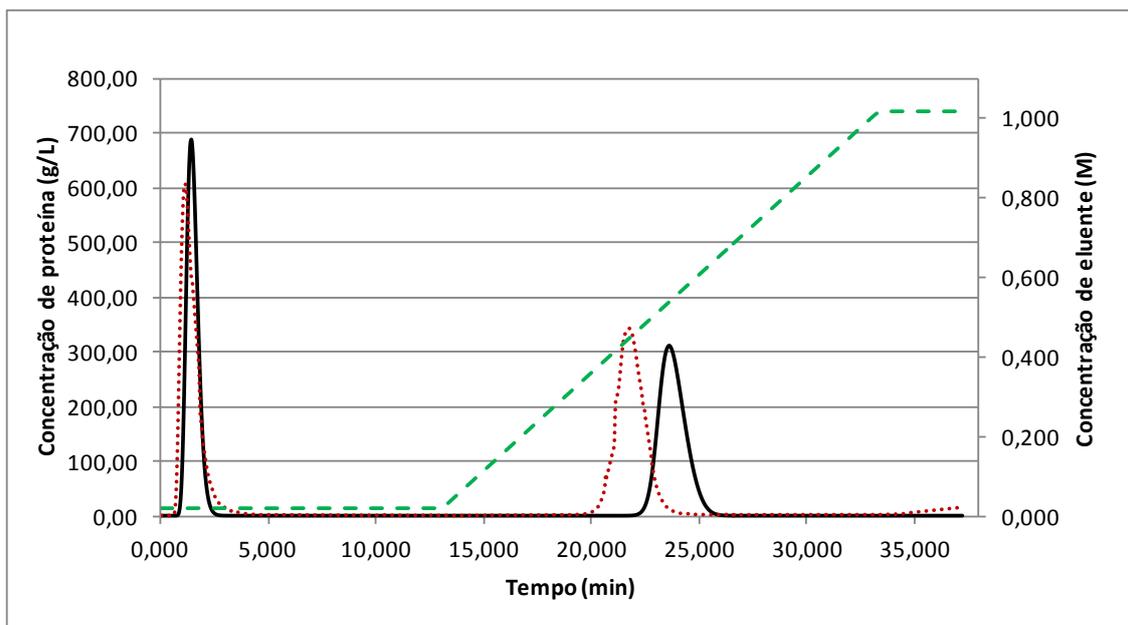


Figura 6.63 – Experimento B15 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para mistura de proteínas (BSA 0,301mM + lisozima 0,301mM) em coluna HiScreen™ SP FF (4,7 mL), tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

6.3.6 Verificação da influência do tampão

Nesta análise, os parâmetros estimados para cada coluna foram utilizados para predição da curva de eluição em tampão mais concentrados. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.18. Todos os experimentos foram realizados em tampão fosfato pH 7, com gradiente de eluição de 10 CV e concentração inicial de proteína de 0,075 mM.

Tabela 6.18: Resultados experimentais e teóricos da verificação da influência da concentração do tampão.

Exp	Coluna	Proteína	Concentração do tampão (M)	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	V_R^{calc} (mL)
C2	HiTrap™ Capto™ DEAE	BSA	0,2	1,00	1,43	9,94
C6	HiTrap™ Capto™ Q	BSA	0,2	0,89	1,22	10,59
C10	HiTrap™ SP FF	BSA	0,2	1,07	1,34	0,96
C18	HiTrap™ Capto™ DEAE	Lisozima	0,2	1,00	1,23	0,93
C22	HiTrap™ Capto™ Q	Lisozima	0,2	0,91	1,16	0,89
C26	HiTrap™ SP FF	Lisozima	0,2	3,13	3,70	11,71

Comparando os resultados experimentais e simulados dos estudos de caso C2,

C6 e C26 é possível perceber que o modelo não foi capaz de prever o efeito do aumento da concentração do tampão na adsorção das proteínas. Como havia sido verificado no Capítulo 5 (Figuras 5.25, 5.26 e 5.27) em tampão fosfato 0,2M nenhuma das proteínas adsorve nas resinas fazendo com que elas sejam eluídas durante a lavagem da coluna e os volumes de retenção sejam da ordem do volume da coluna. A simulação da coluna, entretanto, fornece um resultado de eluição das proteínas durante o gradiente salino.

Isso pode ser devido a não utilização de parâmetros específicos para o tampão fosfato no modelo, sendo utilizadas as propriedades de água para representar o tampão e calculada a força iônica do tampão utilizando os parâmetros do eluente (NaCl). A série de Hofmeister indica que íons fosfato produzem um efeito de "*salting-out*" mais acentuado que íons cloreto, de forma que as proteínas em soluções com tampão fosfato deveriam apresentar um coeficiente de atividade maior que em uma solução salina de cloreto de sódio na mesma concentração. Adicionalmente, o próprio coeficiente de atividade dos íons é bastante distinto. Dessa forma, pode-se afirmar que o modelo, por não descrever adequadamente a influência do tampão, não foi capaz de prever o comportamento em outras concentrações do tampão.

A segunda análise da influência do tampão foi realizada com concentração 0,02M e pH 8. Uma vez que o pH do meio mudou, foi necessário estimar novos parâmetros visto que tanto a carga das proteínas quanto a conformação das mesmas varia com o pH do meio e, por causa disso, também deve variar o fator de impedimento estérico e a constante de equilíbrio.

A Tabela 6.19 apresenta os valores dos parâmetros estimados tanto para pH 7 quanto para pH 8 para fins de comparação. Os valores condizem com o esperado.

Tabela 6.19: Parâmetros da isoterma de adsorção estimados para pH 7 e pH 8

Resina	Capto TM DEAE		Capto TM Q		SP FF	
Proteína	BSA		BSA		Lisozima	
pH	7	8	7	8	7	8
v	12,9	14,5	16,9	17,9	2,9	2,5
K	0,019	0,023	71	590	59,5	58,8
ζ	51	91	1,2	3,2	0,03	0,03
A [mol/L]	0,32	0,32	0,19	0,19	0,21	0,21

O aumento do pH acarreta um aumento da carga líquida da BSA e uma diminuição da carga líquida da lisozima (Apêndice E - Tabelas E.4 e E.6), e o mesmo comportamento foi observado para o coeficiente estequiométrico.

Em relação ao fator de impedimento estérico, é possível esperar teoricamente uma variação com o pH na adsorção de BSA e não na de lisozima, assim como mostra o resultado. A estrutura da BSA em solução possui o formato de um coração e compreende três domínios cada um com dois subdomínios (FERRER *et al.*, 2001) (MAJOREK *et al.*, 2012). Isso significa que se a orientação da molécula de BSA em pH 7 e pH 8 for diferente decorrente, por exemplo, da maior carga de ligação em pH 8, isso poderia representar uma diferença na orientação que a molécula se liga na resina e, assim, um fator de impedimento estérico distinto. Por outro lado, a molécula de lisozima apresenta uma estrutura globular compacta, sem tantas diferenças entre suas orientações.

A mudança de orientação da molécula também explica a alteração na constante de equilíbrio visto que um domínio diferente da molécula passa a se ligar à resina.

Os valores de volume de retenção encontram-se na Tabela 6.20. Pode-se observar que o modelo foi capaz de correlacionar de forma satisfatória os dados experimentais. Os desvios encontrados entre os valores V_R^{max} e V_R^{calc} são menores que 1%.

Tabela 6.20 – Resultados obtidos com parâmetros estimados para cada pH

Exp	Coluna	Proteína	pH	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	V_R^{calc} (mL)
C3	HiTrap TM Capto TM DEAE	BSA	8	13,01	13,57	13,09
C7	HiTrap TM Capto TM Q	BSA	8	13,11	13,57	13,11
C11	HiTrap TM SP FF	BSA	8	0,97	1,25	0,96
C19	HiTrap TM Capto TM DEAE	Lisozima	8	0,91	1,10	0,93
C23	HiTrap TM Capto TM Q	Lisozima	8	0,89	1,13	0,89
C27	HiTrap TM SP FF	Lisozima	8	13,91	14,10	13,93

As Figuras 6.64, 6.65 e 6.66 ilustram os resultados obtidos. Verifica-se que apesar de os volumes de retenção experimental e simulado, calculados no ponto máximo do pico, serem bastante similares, novamente o modelo não foi capaz de

representar a formação da cauda na parte final do pico de eluição da BSA nas resinas aniônicas.

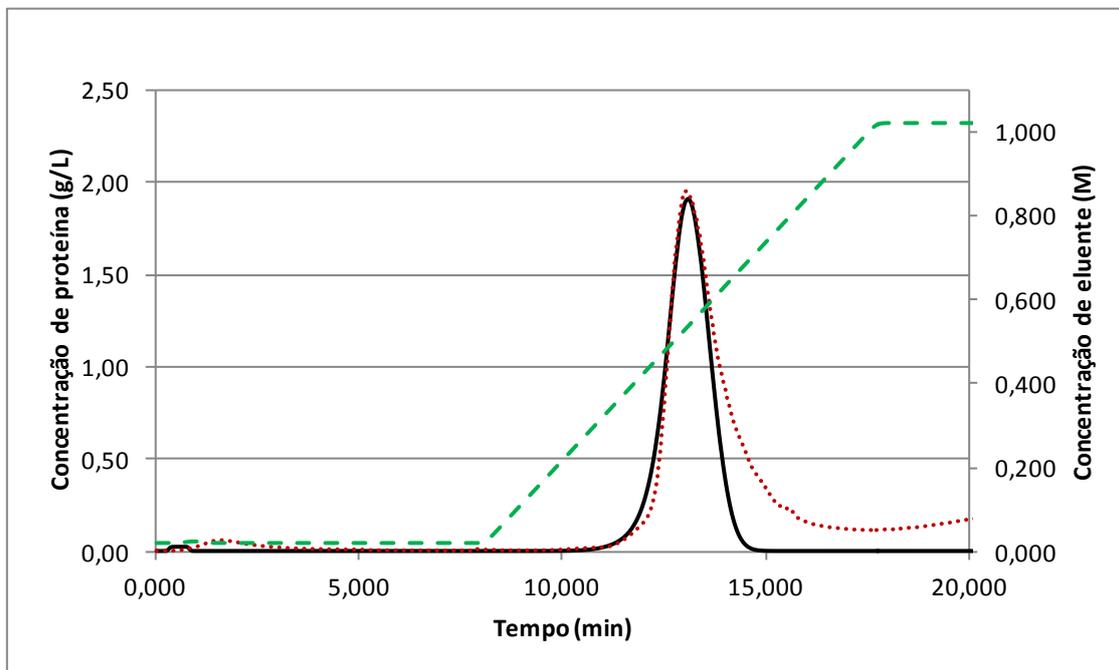


Figura 6.64 – Experimento C3 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para adsorção de BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE (1 mL), concentração de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

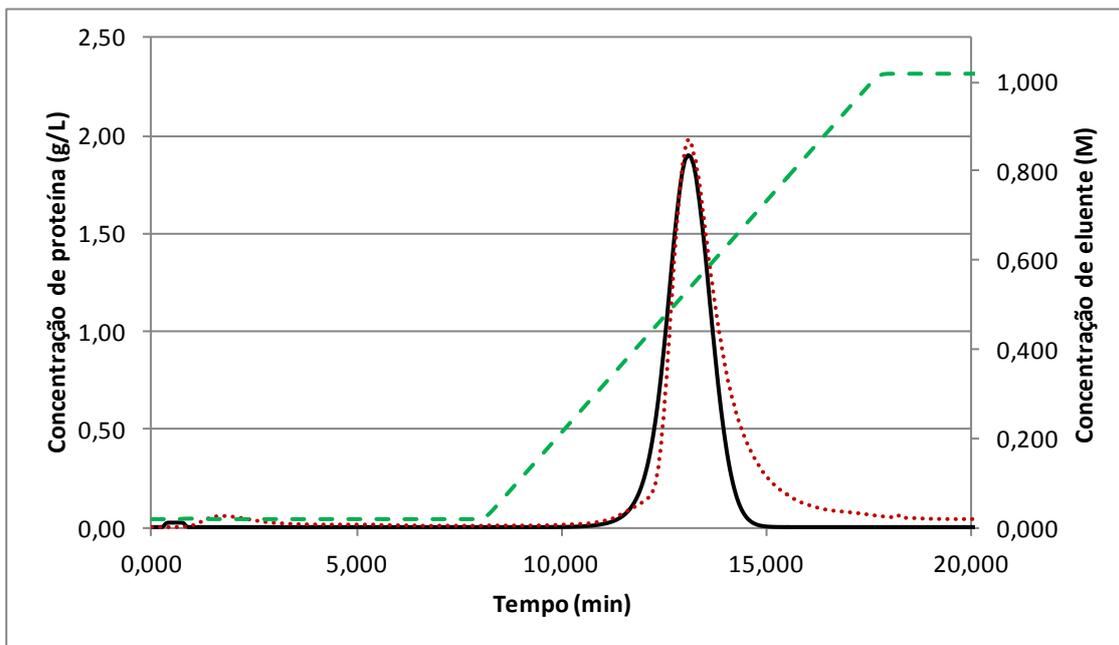


Figura 6.65 – Experimento C7 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para adsorção de BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM Q (1 mL), concentração de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

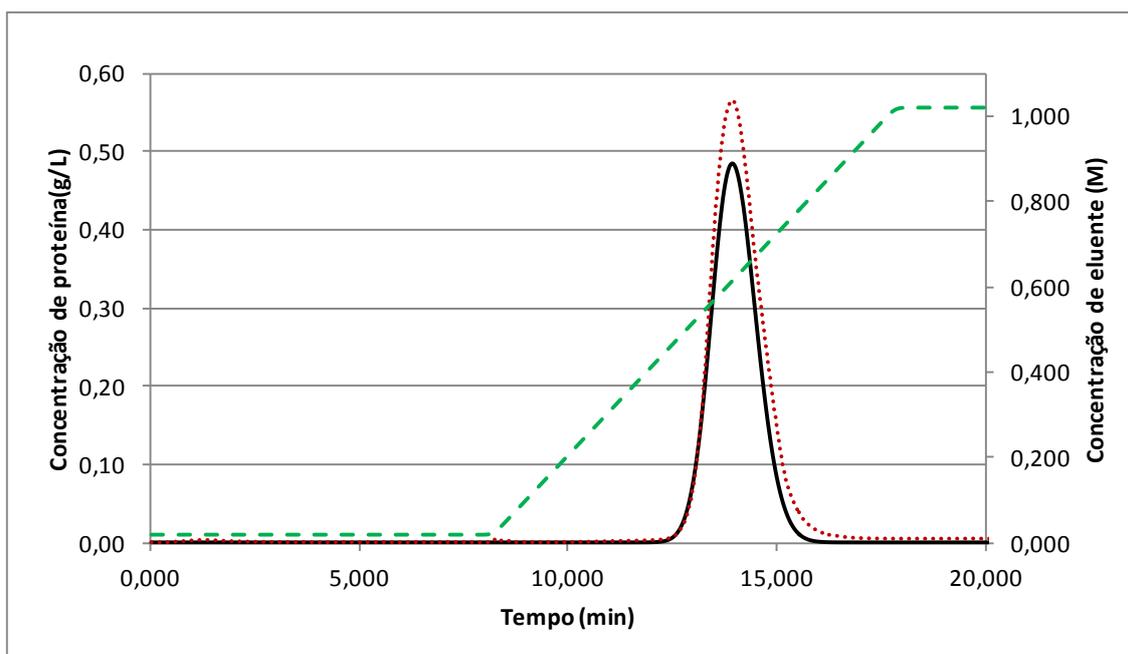


Figura 6.66 – Experimento C27 - Curva de eluição experimental (linha pontilhada) e simulada (linha contínua) para adsorção de lisozima em coluna HiTrap™ SP FF (1 mL), concentração de proteína 0,075mM, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV.

6.3.7 Verificação da influência do tamanho do gradiente.

Os resultados obtidos dos estudos de caso utilizados tanto para estimação de parâmetros quanto para avaliação da capacidade preditiva do modelo em relação à variação do tamanho do gradiente de eluição encontram-se na Tabela 6.21.

Em algumas situações, os desvios encontrados entre os valores V_R^{max} e V_R^{calc} são bastante elevados chegando a 67% para o experimento D20. Apesar disso, também é possível encontrar desvios baixos como, por exemplo, nos experimentos D10 (3%), A6 (2,2%), A8 (2,5%) e todos os estudos de caso envolvendo lisozima.

Tabela 6.21 – Verificação da influência do tamanho do gradiente

Experimento	Coluna	Proteína	Gradiente (CV)	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	V_R^{calc} (mL)
D1			5	11,76	12,12	9,92
A2			10	13,27	13,59	12,16
D3	HiTrap™ Capto™	BSA	30	17,37	18,01	19,27
D4	DEAE / 1 mL	0,075	60	21,92	23,40	29,2
D5		mM	80	23,95	27,02	35,3
D6			100	26,95	30,53	41,52

Tabela 6.21 – Continuação

Experimento	Coluna	Proteína	Gradiente (CV)	V_R^{max} (mL)	V_R^{EMG} (mL)	V_R^{calc} (mL)
D8			5	11,73	12,03	9,52
A4			10	13,12	13,45	11,73
D10	HiTrap™ Capto™ DEAE / 1	BSA	30	16,91	17,86	17,45
D11		0,301mM	60	21,20	22,74	25,96
D12	mL		80	22,88	25,84	31,3
D13			100	25,96	29,64	36,48
D15			5	11,50	11,88	10,27
A6			10	12,81	13,10	12,34
D17	HiTrap™	BSA	30	16,43	17,14	19,93
D18	Capto™ Q / 1 mL	0,075 mM	60	20,88	22,44	30,40
D19			80	23,70	25,77	37,20
D20			100	26,16	29,12	43,68
D22			5	11,36	11,69	10,31
A8			10	12,64	12,98	11,89
D24	HiTrap™	BSA	30	16,15	16,80	18,48
D25	Capto™ Q / 1 mL	0,301mM	60	20,24	21,87	27,76
D26			80	22,87	24,79	33,51
D27			100	25,32	28,39	39,48
D29			5	12,69	12,81	12,3
A18			10	14,40	14,52	14,44
D31	HiTrap™ SP FF / 1	Lisozima	30	19,73	19,88	20,75
D32	mL	0,075 mM	60	26,48	26,36	28,8
D33			80	30,51	30,57	33,17
D34			100	34,53	34,48	36,8
D36			5	12,76	12,84	11,76
A20			10	14,64	14,75	14,16
D38	HiTrap™ SP FF / 1	Lisozima	30	19,84	19,84	20,37
D39	mL	0,301mM	60	26,81	26,70	27,28
D40			80	30,85	30,72	31,7
D41			100	35,28	35,04	35,04

A Figura 5.67 ilustra os resultados obtidos para a coluna HiTrap™ Capto™ DEAE, a Figura 5.68 os resultados obtidos para a coluna HiTrap™ Capto™ Q, e a Figura 5.69 os resultados obtidos para a coluna HiTrap™ SP FF. Em cada figura o *frame* A representa a curva de eluição experimental com concentrações de injeção de 0,075mM; o *frame* B representa a curva de eluição simulada com concentrações de

injeção de 0,075mM; o *frame* C representa a curva de eluição experimental com concentrações de injeção de 0,301mM; e o *frame* D representa a curva de eluição simulada com concentrações de injeção de 0,301mM.

A resposta do modelo com o aumento do gradiente de eluição sempre possui uma tendência a fornecer picos de eluição simétricos. O pico em geral vai sendo achatado e deslocado para direita a medida que o tamanho do gradiente aumenta.

Esse é o comportamento experimental que ocorre na eluição de lisozima na coluna HiTrapTM SP FF (Figura 6.68) e, por isso, o ajuste do modelo é bastante bom. Por outro lado as curvas de eluição experimentais de BSA não apresentam um comportamento gaussiano.

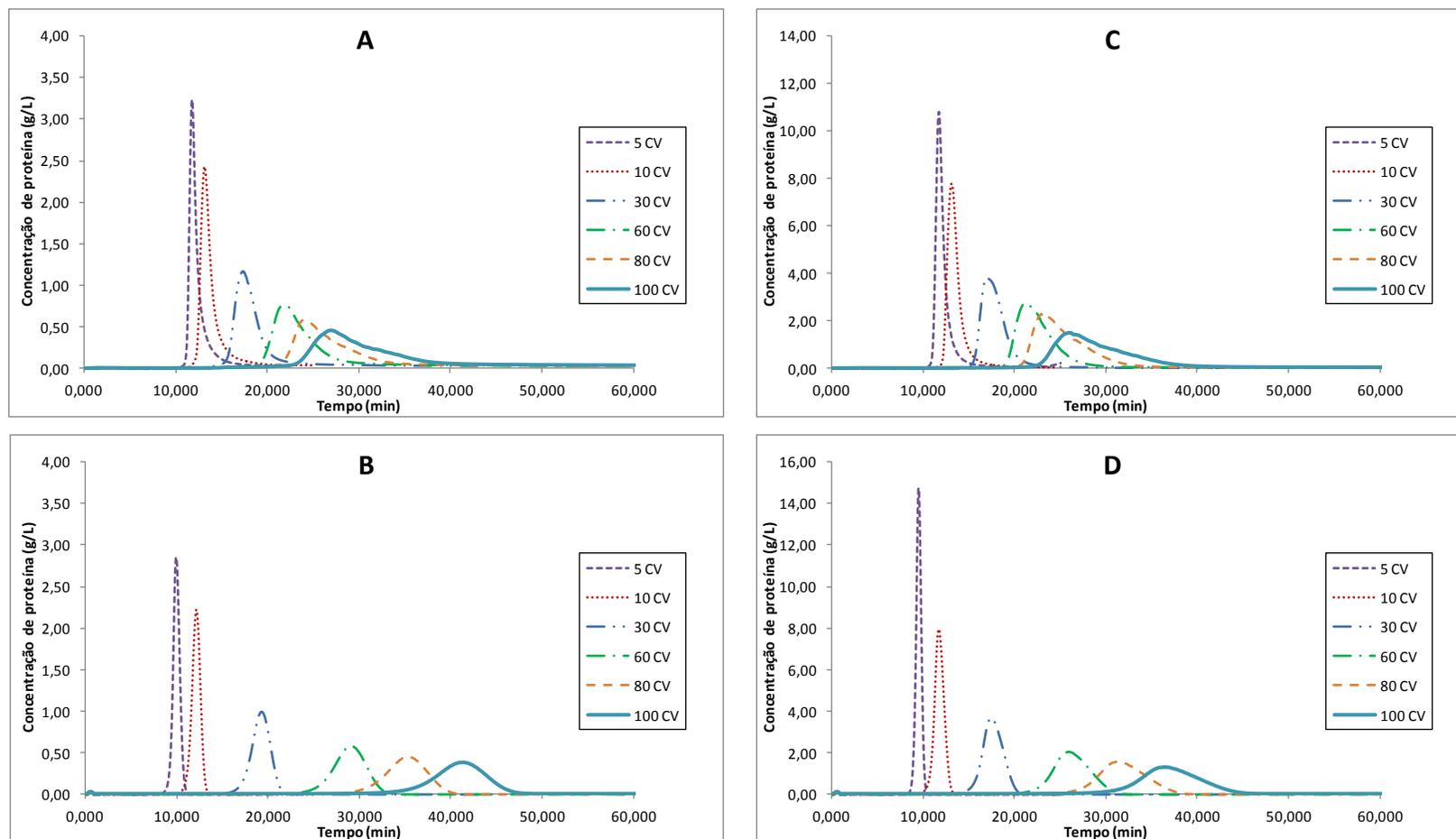


Figura 6.67 – Eluição de BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM DEAE , tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV. (A) Curvas experimentais com concentração de injeção de 0,075mM (B) Curvas simuladas com concentração de injeção de 0,075mM (C) Curvas experimentais com concentração de injeção de 0,301mM (D) Curvas simuladas com concentração de injeção de 0,301mM

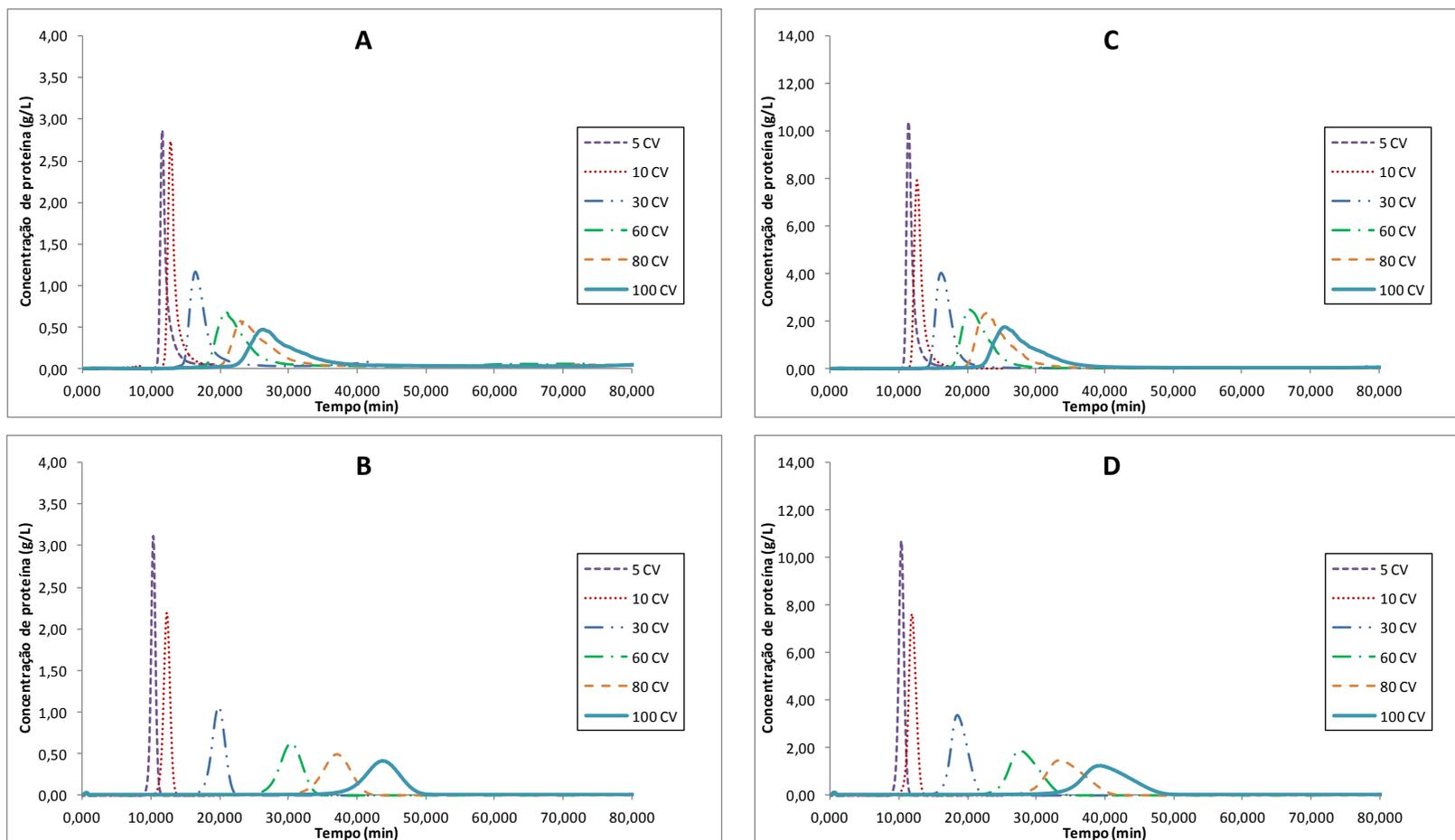


Figura 6.68 – Eluição de BSA em coluna HiTrapTM CaptoTM Q , tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV. (A) Curvas experimentais com concentração de injeção de 0,075mM (B) Curvas simuladas com concentração de injeção de 0,075mM (C) Curvas experimentais com concentração de injeção de 0,301mM (D) Curvas simuladas com concentração de injeção de 0,301mM

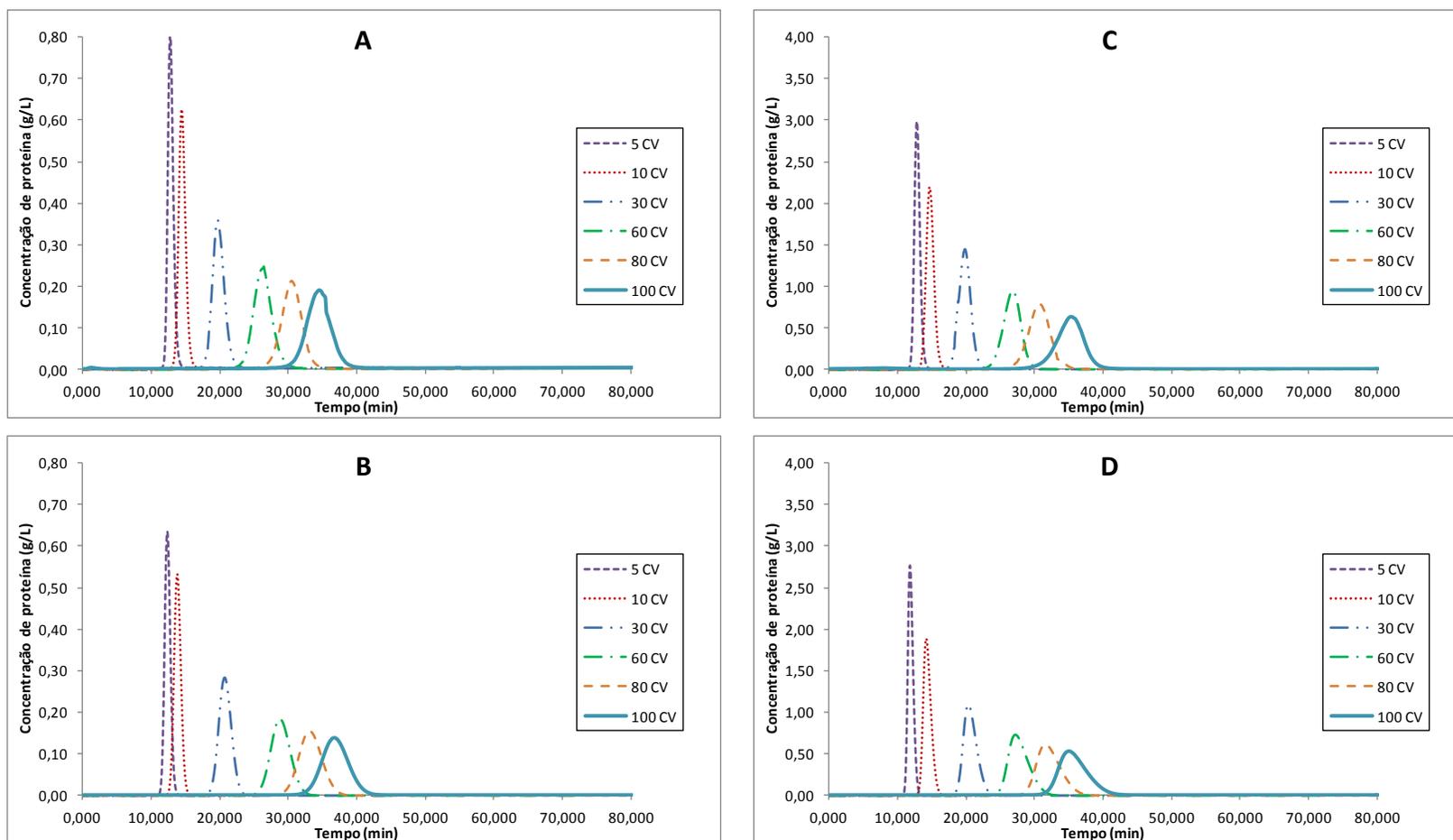


Figura 6.69 – Eluição de lisozima em coluna HiTrap™ SP FF, tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, gradiente de 10 CV. (A) Curvas experimentais com concentração de injeção de 0,075mM (B) Curvas simuladas com concentração de injeção de 0,075mM (C) Curvas experimentais com concentração de injeção de 0,301mM (D) Curvas simuladas com concentração de injeção de 0,301mM

6.3.8 Conclusões parciais da simulação da coluna cromatográfica de troca iônica

A correlação entre os dados experimentais e os simulados de eluição de lisozima, tanto dentre o conjunto de dados utilizado para a estimação de parâmetros, quanto os dados utilizados para a verificação da capacidade preditiva do modelo, apresentou excelentes resultados, com desvios menores que 3%. Por outro lado, a predição do volume de retenção da BSA em eluições com diferentes tamanhos de gradiente chegou a apresentar desvios de 67%.

Essa diferença se deve ao fato da lisozima apresentar curvas bastante próximas de uma curva gaussiana, com picos simétricos e a BSA apresentar curvas de eluição com uma elevada assimetria que não foi bem descrita pelo modelo.

O modelo proposto não foi capaz de prever o efeito do aumento da concentração do tampão na adsorção das proteínas e isso se deve, principalmente a não utilização de parâmetros específicos para o tampão fosfato. Já a influência da variação do pH foi bem correlacionada através da estimação de novos parâmetros para o equilíbrio de adsorção e os desvios entre os valores experimentais e os simulados foram menores que 1%.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Conforme apresentado na motivação desta tese, o mercado de biotecnologia vem crescendo significativamente nas últimas décadas e a aplicação dos produtos de origem biotecnológica é vasta. Tem sido necessário desenvolver metodologias eficientes de síntese de processos a fim de otimizar as condições operacionais dos equipamentos industriais e proporcionar melhores rendimentos de separação.

A cromatografia de troca iônica é uma das técnicas mais comumente utilizadas para purificação de proteínas e peptídeos para uso terapêutico e, praticamente, todos os processos de purificação industrial compreendem uma ou mais etapas de cromatografia de troca iônica (STABY *et al.*, 2000). Entretanto, as atuais metodologias de síntese de processos esbarram no rigor dos modelos cromatográficos empregados e fornecem resultados com grandes desvios.

Através da revisão dos trabalhos presentes na literatura, foi possível identificar lacunas na modelagem termodinâmica de sistemas contendo biomoléculas, especialmente carência de modelos que correlacionam dados experimentais de proteínas. Em relação à modelagem da adsorção das proteínas em resinas de troca iônica foi identificada ampla utilização de modelos empíricos e semi empíricos que não consideram adequadamente a não idealidade das fases em solução. Também foram encontradas lacunas nos dados experimentais de equilíbrio termodinâmico, assim como de equilíbrio de adsorção, das proteínas de interesse nas condições dos sistemas e com as resinas pesquisadas.

Dessa forma, nesta tese foi apresentado um modelo robusto para descrição da coluna de cromatografia de troca iônica que incorpora a não idealidade da fase cromatográfica móvel. O modelo foi empregado para descrever o comportamento da eluição por gradiente salino linear da BSA e da lisozima em colunas de cromatografia de troca iônica.

Foi considerado que a não idealidade da fase adsorvida é equivalente tanto para proteína quanto para o sal e, assim, o coeficiente de atividade da fase adsorvida foi negligenciado. Os coeficientes de atividade dos íons foram descritos por um modelo UNIQUAC acoplado ao termo de longo alcance de Debye-Huckel, enquanto a descrição do coeficiente de atividade das proteínas apenas levou em consideração as interações de curto e médio alcance do modelo UNIQUAC original.

O modelo composto de energia livre de Gibbs em excesso proposto foi capaz de representar os sistemas estudados em regiões de concentração diluída de proteína, tais quais as encontradas nos experimentos cromatográficos.

Também foram avaliados outros modelos de energia livre de Gibbs em excesso para a modelagem do coeficiente de atividades das proteínas e a discussão encontra-se no Apêndice desta tese.

Foram medidos dados experimentais de eluição de BSA e lisozima individualmente e da mistura de ambas proteínas com três diferentes resinas, dois tamanhos de coluna, seis tamanhos de gradiente de eluição, duas concentrações distintas do tampão de equilíbrio da coluna, assim como dois valores de pH, sendo realizados no total 84 experimentos.

Os resultados experimentais encontram-se dentro do esperado teoricamente. A eluição da lisozima apresenta picos simétricos próximos de uma curva gaussiana, enquanto a eluição da BSA nas resinas estudadas apresenta picos assimétricos com formação de uma cauda.

Os parâmetros do equilíbrio de adsorção foram determinados empregando o método inverso e foram capazes de predizer uma ampla faixa de condições diferentes de forma satisfatória.

O ajuste do modelo ao perfil de eluição de lisozima em todas as resinas e colunas estudadas foi bastante preciso. Por outro lado, a adsorção da BSA nas resinas aniônicas acarreta um comportamento onde a parte final do pico de eluição apresenta

uma dispersão (formação de cauda) que não foi satisfatoriamente descrita pelo modelo.

Dessa forma, pode-se concluir que o modelo pode ser empregado para o desenvolvimento de metodologias de síntese de bioprocessos, entretanto ainda devem ser realizadas pesquisas na área para elucidação dos problemas encontrados.

Para aprimoramento da pesquisa realizada, algumas lacunas podem ser preenchidas através das seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Parte experimental:

- i. Cálculo dos erros experimentais acumulados provenientes da pesagem das proteínas e dos sais, da pipetagem das soluções do cromatógrafo (misturador, injetor automático, medidor de absorvância);

- ii. Repetição de experimentos para o cálculo mais preciso dos erros experimentais;

- iii. Realização de experimentos em batelada da adsorção da BSA e lisozima nas resinas estudadas para melhor correlação da isoterma e entendimento do comportamento em relação à variação da concentração de sal e em relação ao tipo de sal;

- iv. Determinação dos parâmetros da isoterma de adsorção a partir de outras metodologias para comparação com os parâmetros estimados pelo método inverso (análise frontal, método das perturbações, eluição por pontos característicos);

- v. Realização de experimentos para determinação da capacidade das resinas de forma que não seja necessário estimar este valor como parâmetro do modelo;

- vi. Realização de experimentos para determinação dos parâmetros de transferência de massa e avaliação da influência dos parâmetros em relação aos valores calculados por correlações empíricas.

- Parte teórica:

- vii. Comparação dos resultados apresentados pelo modelo com a utilização de outras isotermas de adsorção, especialmente a equação SMA considerando todas as fases ideais e a equação SMA considerando apenas o coeficiente de atividade da proteína;

viii. Consideração da não idealidade da fase adsorvida como parte integrante do modelo;

ix. Utilização de outros procedimentos de otimização, visto que a função objetivo da estimação de parâmetros acarreta diversos ótimos locais.

Adicionalmente, trabalhos futuros poderiam investigar o potencial e as limitações da modelagem apresentada nesta tese para outras proteínas e misturas proteicas industriais mais complexas. Por fim, os parâmetros do modelo, tanto para os íons e as proteínas quanto para as resinas, deveriam ser associados a propriedades moleculares a fim de permitir uma predição do comportamento de proteínas desconhecidas, misturas de proteínas e novos materiais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N. L. ; HANTTON, T. A. "Liquid-liquid Extraction for Protein Separations". *Chemical Engineering Progress*, v. 84, n. 8, pp. 31-41, 1988.

ABRAMS, D. S. ; PRAUSNITZ, J. M. "Statistical thermodynamics of liquid mixtures: A new expression for the excess Gibbs energy of partly or completely miscible systems". *AIChE Journal*, v. 21, pp. 116–128, 1975.

ADHIKARI, S.; MANTHENA, P. V.; SAJWAN, K. *et al.* "A unified method for purification of basic proteins". *Analytical Biochemistry*, v. 400, pp. 203–206, 2010.

AGENA, S. M.; BOGLE, I. D. L.; PESSOA, F. L. P. "An activity coefficient model for proteins". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 55, n. 1, pp. 65–71, 1997.

AGENA, S. M.; BOGLE, I. D. L.; PESSOA, F. L. P. "An activity coefficient model for proteins". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 55 (1), pp. 65–71, 1997.

AGENA, S. M.; PUSEY, M. L.; BOGLE, I. D. L. "Protein Solubility Modeling". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 64, n. 2, pp. 144-150, 1998.

AGGARWAL, S. "What's fueling the biotech engine-2009–2010". *Nature biotechnology*, v. 28, n. 11, pp. 1165-1171, 2010.

AGGARWAL, S. "What's fueling the biotech engine-2010–2011". *Nature biotechnology*, v. 29, n. 12, pp. 1083-1089, 2011.

AGGARWAL, S. "What's fueling the biotech engine-2012–2013". *Nature biotechnology*, v. 32, n. 1, pp. 32-39, 2014.

AHAMED, T.; OTTENS, M.; NFOR, B. K. *et al.* "A generalized approach to thermodynamic properties of biomolecules for use in bioseparation process design". *Fluid Phase Equilibria*, v. 241, pp. 268–282, 2006.

AL-JIBBOURI, S. "Scale-up of chromatographic ion-exchange processes in biotechnology". *Journal of Chromatography A*, v. 116, pp. 135–142, 2006.

AL-JIBBOURI, S. "The influence of salt type on the retention of bovine serum albumin in ion-exchange chromatography". *Journal of Chromatography A*, v. 1139, pp. 57–62, 2007.

ALVES, K. C. N. Modelagem Termodinâmica de Sistemas Aquosos Bifásicos Contendo Sais e Polímeros. Dissertação de M.Sc. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008a.

ALVES, S. A. P. F. Coefficientes de Actividade de Aminoácidos em Solução Aquosa. M.Sc. Dissertation. Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008a.

ANDREWS, A. T.; NOBLE, I.; KEERATIPIBUL, S. *et al.* "Physicochemical properties of the main matrix proteins of three important culture vehicles". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, pp. 29-37, 1994.

ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. "Analysis of Affinity Separations". *Journal of Chemical Engineering*, v. 30, pp. B9–B23, 1985.

ARVE, B. H. ; LIAPIS, A. I. "Modeling and Analysis of Biospecific Adsorption in a Finite Bath". *AIChE Journal*, v. 33, pp. 179–193, 1987.

ARVE, B. H. ; LIAPIS, A. I. "Biospecific Adsorption in Fixed and Periodic Countercurrent Beds". *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, v. 32, pp. 616–27, 1988.

ASENJO, J. A. ; ANDREWS, B. A. "Is there a Rational Method to Purify Proteins?: From Expert Systems to Proteomics". *Journal of Molecular Recognition*, v. 17, pp. 236-247, 2004.

ASENJO, J. A. ; ANDREWS, B. A. "Mini-review: Challenges and Trends in Bioseparations". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, pp. 117–120, 2008.

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

ASENJO, J. A.; HERRERA, L.; BYRNE, B. "Development of an Expert System for selection and synthesis of protein purification processes". *Journal of Biotechnology*, v. 11, pp. 275-298, 1989.

ASENJO, J. A.; PARRADO, J.; ANDREWS, B. A. "The rational design of purification processes for recombinant proteins". *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 646, pp. 334-356, 1991.

ASENJO, J. A.; SCHMIDT, A. S.; HACHEM, F. *et al.* "Model for predicting the partition behaviour of proteins in aqueous two-phase systems". *Journal of Chromatography*, v. 668, pp. 47-54, 1994.

AVCI, A. K.; CAMURDAN, M. C.; KUTLU, O. U. "Quantitative description of protein adsorption by frontal analysis". *Process Biochemistry Journal*, v. 36, pp. 141-148, 2000.

BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.; BRACEWELL, D. G. "Advances in product release strategies and impact on bioprocess design". *Trends in Biotechnology*, v. 27, n. 8, pp. 477-485, 2009.

BARBOSA, L. R. S.; ORTORE, M. G.; SPINOZZI, F. *et al.* "The Importance of Protein-Protein Interactions on the pH-Induced Conformational Changes of Bovine Serum Albumin: A Small-Angle X-Ray Scattering Study". *Biophysical Journal*, v. 98, n. 1, pp. 147-157, 2010.

BARRETO JR., A. G. Projeto de Sistemas Cromatográficos para a Separação de Lapachol. Tese de D.Sc. Programa de Engenharia Química/COPPE/, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BENSCH, M.; SELBACH, B.; HUBBUCH, J. "High throughput screening techniques in downstream processing: preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems". *Chemical Engineering Science*, v. 62, pp. 2011–2021, 2007.

BENSCH, M.; WIERLING, P. S.; VON LIERS, E. *et al.* "High Throughput screening of chromatographic phases for rapid process development". *Chemical Engineering and Technology*, v. 28, pp. 1274–1284, 2005.

BHAMBURE, R.; KUMAR, K.; RATHORE, A. "High-throughput process development for biopharmaceutical drug substances". *Trends in Biotechnology*, v. 29, n. 3, pp. 126-135, 2011.

BISCAIA JR, E. C. **O método dos resíduos ponderados com aplicação em simulação de processos**. Anais do XV Congresso Nacional de Matemática Aplicada e Computacional – CNMAC. São Carlos - SP: [s.n.]. 1992.

BOGLE, I. D. L.; COCKSHOTT, A. R.; BULMER, M. *et al.* "A Process Systems Engineering View of Biochemical Process Operations". *Computers and Chemical Engineering (Fifth International Symposium on Process Systems Engineering)*, v. 20, n. 611, pp. 943-949, 1996.

BONDI, A. **Physical properties of molecular crystals, liquids and glasses**. New York: Wiley, 1968.

BONOMO, R. C. F. Termodinâmica, Modelagem e Simulação do Processo de Adsorção e Dessorção de BSA e b-lactoglobulina em Cromatografia de Interação Hidrofóbica. D.Sc. Thesis. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

BOWEN, W. R.; PAN, L. C.; SHARIF, A. O. "Predicting equilibrium constants for ion exchange of proteins - a colloid science approach". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 143, pp. 117–131, 1998.

BRETTI, C.; CREA, F.; DE STEFANO, C. *et al.* "Some thermodynamic properties of dl-Tyrosine and dl-Tryptophan. Effect of the ionic medium, ionic strength and temperature on the solubility and acid–base properties". *Fluid Phase Equilibria*, v. 314, pp. 185– 197, 2012.

BROMLEY, L. A. "Thermodynamic properties of strong electrolytes in aqueous solutions". *AIChE Journal*, v. 19, pp. 313-320, 1973.

BROOKS, C. A. ; CRAMER, S. M. "Steric mass-action ion-exchange: displacement profiles and induced salt gradients". *AIChE Journal*, v. 38, pp. 1969-1978, 1992.

BULL, H. B. ; BREESE, K. "Virial coefficients of protein solutions". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 149, pp. 164-168, 1972.

CAMERETTI, L. F. ; SADOWSKI, G. "Modeling of Aqueous Amino Acid and Polypeptide Solutions with PC-SAFT". *Chemical Engineering Process*, v. 47, pp. 1018–1025, 2008.

CARDOSO, M. J. E. M. ; O'CONNEL, J. P. "Activity Coefficients in Mixed Solvent Electrolyte Solutions". *Fluid Phase Equilibria*, v. 33 (3), pp. 315-326, 1987.

CARDOSO, M. J. E. M. Calculation on Phase and Chemical Equilibria in Electrolyte Systems. D.Sc. thesis. Institutet for Kemiteknik, Denmark, 1988.

CARTA, G.; UBIERA, A.; TIMOTHY, M. P. "Protein Mass Transfer Kinetics in Ion Exchange Media: Measurements and Interpretations". *Chemical Engineering Technology*, v. 28 , n. 11 , pp. 1252-1264, 2005.

CHAN, A.; TITCHENER-HOOKER, N.; BRACEWELL, D. G. *et al.* "A Systematic Approach for Modeling Chromatographic Processes- Application to Protein Purification". *AIChE Journal*, v. 54, pp. 965-977, 2008.

CHANG, B. H. ; BAE, Y. C. "Lysozyme-Lysozyme and Lysozyme-Salt Interactions in the Aqueous Saline Solution: A New Square-Well Potential". *Biomacromolecules*, v. 4, pp. 1713-1718, 2003.

CHANG, C. ; LENHOFF, A. M. "Comparison of Protein Adsorption Isotherms and Uptake Rates in Preparative Cation-exchange Materials". *Journal of Chromatography A*, v. 827, pp. 281–293, 1998.

CHASE, H. A. "Prediction of the Performance of Preparative Affinity Chromatography". *Journal of Chromatography*, v. 297, pp. 179–202, 1984.

CHEN, C. C. ; EVANS, L. B. "A Local Composition Model for the Excess Gibbs Energy of Aqueous Electrolyte Systems". *AIChE Journal*, v. 32, n. 3, pp. 444-454, 1986.

CHEN, C. C.; BOSTON, J. F.; EVANS, L. B. "Local Composition Model for Excess Gibbs Energy of Electrolyte Systems". *AIChE Journal*, v. 28, n. 4, pp. 588-596, 1982.

CHEN, C. C.; ZHI, Y.; EVANS, L. B. "Phase Partitioning of Biomolecules: Solubilities of Amino Acids". *Biotechnology Progress*, v. 5, n. 3, pp. 111–118, 1989.

CHEN, C. C.; ZHI, Y.; EVANS, L. B. "Phase Partitioning of Biomolecules: Solubilities of Amino Acids". *Biotechnology Progress*, v. 5, n. 3, pp. 111–118, 1989.

CHEN, J. ; CRAMER, S. M. "Protein adsorption isotherm behavior in hydrophobic interaction chromatography". *Journal of Chromatography A*, v. 1165 , pp. 67–77, 2007.

CHEN, J. ; SUN, Y. "Modeling of the salt effects on hydrophobic adsorption equilibrium of protein". *Journal of Chromatography A*, v. 992 , pp. 29-40, 2003.

CHEN, W.; DONG, X.; SUN, Y. "Analysis of Diffusion Models for Protein Adsorption to Porous Anion-exchange Adsorbent". *Journal of Chromatography A*, v. 962, pp. 29–40, 2002.

CHUNG, S. F. ; WEN, C. Y. "Longitudinal dispersion of liquid flowing through fixed and fluidized beds". *AIChE Journal*, v. 14, pp. 857-866, 1968.

CLEGG, S. L. ; PITZER, K. S. "Thermodynamics of Multicomponent, Miscible, Ionic Solutions: Generalized Equations for Symmetrical Electrolytes". *Journal of Chemical Physics*, v. 96, pp. 3513-3520, 1992.

COFFMAN, J. L.; KRAMARCZYK, J. F.; KELLEY, B. D. "Highthroughput screening of chromatographic separations: I. Method development and column modeling". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 100, pp. 605–618, 2008.

CONDER, J. R. ; HAYEK, B. O. "Adsorption kinetics and equilibria of bovine serum albumin on rigid ion-exchange and hydrophobic interaction chromatography matrices in a stirred cell". *Biochemical Engineering Journal*, v. 6, pp. 215–223, 2000.

COSTA, A. F. Cálculo da solubilidade de aminoácidos em sistemas aquosos utilizando um modelo UNIQUAC estendido. Dissertação de M.Sc. Programa de Engenharia Química/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1993.

COUTINHO, J. A. P. ; PESSOA, F. L. P. "A Modified Extended UNIQUAC Model for Proteins". *Fluid Phase Equilibria*, v. 222-223, pp. 127–133, 2004.

DALDRUP, J. G.; HELD, C.; RUETHER, F. *et al.* "Measurement and Modeling Solubility of Aqueous Multisolute Amino-Acid Solutions". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 49, pp. 1395–1401, 2010.

DE VAULT, D. "The theory of chromatography". *Journal of the American Chemical Society*, v. 65, n. 4, pp. 532-540, 1943.

DEBYE, P. ; HUCKEL, E. "Zur Theorie der Elektrolyte. I. Cefrierpunktserniedrigung un Verwardte Erscheinungon". *Physik. Z.*, v. 24, pp. 185, 1923.

DEITCHER, R. W.; ROME, J. E.; GILDEA, P. A. *et al.* "A new thermodynamic model describes the effects of ligand density and type, salt concentration and protein species in hydrophobic interaction chromatography". *Journal of Chromatography A*, v. 1217, pp. 199-208, 2010.

DIAS-CABRAL, A. C.; FERREIRA, A. S.; PHILLIPS, J. *et al.* "The effects of ligand chain length, salt concentration and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto polypropyleneglycol–Sepharse". *Biomedical Chromatography*, v. 19, pp. 606–616, 2005.

DIAS-CABRAL, A. C.; QUEIROZ, J. A.; PINTO, N. G. "Effect of salts and temperature on the adsorption of bovine serum albumin on polypropylene glycol-Sepharse under linear and overloaded chromatographic conditions". *Journal of Chromatography A*, v. 14, n. 1018 (2), pp. 137-153, 2003.

DRUCHOK, M.; KALYUZHNYI; RESCIC, J. *et al.* "Analysis of osmotic pressure data for aqueous protein solutions via a multicomponent model". *The Journal of Chemical Physics*, v. 124, pp. 114902-114909, 2006.

ELBRO, H. S.; FREDENSLUND, A.; RASMUEAEN, P. "A New Simple Equation for the Prediction of Solvent Activities in Polymer Solutions". *Macromolecules*, v. 23, pp. 4707, 1990.

EL-SAYED, M. Selective Cation-exchange Adsorption of the Two Major Whey Proteins. Ph.D. Thesis. Department of Chemical Engineering and Biotechnology, University of Cambridge, Cambridge, 2010.

FDA. Guidance for Industry PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance. Department of Health and Human Services - USA, 2004.

FERREIRA, L. A. R. D. F. SEPARATION AND PURIFICATION OF AMINO ACIDS. Chem Eng. D. Thesis. Departamento de Engenharia Química / Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto, 2008.

FERREIRA, L. A.; BREIL, M. P.; PINHO, S. P. *et al.* "Thermodynamic Modeling of Several Aqueous Alkanol Solutions Containing Amino Acids with the Perturbed-Chain Statistical Associated Fluid Theory Equation of State". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 48, pp. 5498-5505, 2009.

FERREIRA, L. A.; MACEDO, E. A.; PINHO, S. P. "Effect of KCl and Na₂SO₄ on the Solubility of Glycine and DL-Alanine in Water at 298.15 K". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 44, pp. 8892-8898, 2005.

FERRER, M. L.; DUCHOWICZ, R.; CARRASCO, B. *et al.* "The Conformation of Serum Albumin in Solution: A Combined Phosphorescence Depolarization-Hydrodynamic Modeling Study". *Biophysical Journal*, v. 80, pp. 2422–2430, 2001.

FINETTE, G. M. S.; MAO, Q. M.; HEARN, M. T. W. "Examination of protein adsorption in fluidized bed and packed bed columns at different temperatures using frontal chromatographic methods". *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, v. 58, pp. 35–46, 1998.

FOLOGEA, D.; LEDDEN, B.; MCNABB, D. S. *et al.* "Electrical characterization of protein molecules by a solid-state nanopore". *Applied Physics Letters*, v. 91, n. 5, pp. 539011-539013, 2007.

FRANCO, L. F. M. ; PESSOA FILHO, P. A. "On the solubility of proteins as a function of pH: mathematical development and application". *Fluid Phase Equilibria*, v. 306, n. 2, pp. 242-250, 2011.

FRANCO, L. F. M.; MATTEDI, S.; PESSÔA FILHO, P. A. "A new approach for the thermodynamic modeling of the solubility of amino acids and b-lactam compounds as a function of pH". *Fluid Phase Equilibria*, v. 354, pp. 38– 46, 2013.

FREDERIKSEN, S. S. Computer Aided Development Chromatographic Separations. Ph.D. Thesis. Department of Chemical Engineering, Technical University of Denmark, Lyngby, 2004.

FREDESLUND, A.; JONES, R. L.; PRAUSNITZ, J. M. "Group-Contribution Estimation of Activity Coefficients in Non Ideal Liquid Mixtures". *AIChE Journal*, v. 21, pp. 1086-1099, 1975.

FREED, A. S. Multiscale Modeling of Chromatographic Systems: Insights into Protein Selectivity, Ligand Design and Methods Development. Ph.D. Thesis. Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, 2010.

FUCHS, D.; FISCHER, J.; TUMAKAKA, F. *et al.* "Solubility of amino acids: Influence of the pH value and the addition of alcoholic cosolvents on aqueous solubility". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 45, n. 19, pp. 6578–6584, 2006.

GADAM, S. D.; G., J.; CRAMER, S. M. "Characterization of non-linear adsorption properties of dextran-based polyelectrolyte displacers in ion-exchange systems". *Journal of Chromatography A*, v. 630, n. 1–2, pp. 37–52, 1993.

GARCIA ROJAS, E. E.; REIS COIMBRA, J. S.; MINIM, L. A. *et al.* "Hydrophobic interaction adsorption of hen egg white proteins albumin, conalbumin, and lysozyme". *Journal of Chromatography B*, v. 840, pp. 85–93, 2006.

GONZALEZ, M. J. ; JAULMES, A. . V. P. V.-M. C. "Modelling of Peak Profiles - Application to the preparative liquid-chromatography of steroids". *Journal of Chromatography*, v. 386, pp. 333-344, 1987.

GRITTI, F. ; GUIOCHON, G. "Critical Contribution of Nonlinear Chromatography to the Understanding of Retention Mechanism in Reversed-phase Liquid Chromatography". *Journal of Chromatography A*, v. 1099, pp. 1-42, 2005.

GROSS, J. ; SADOWSKI, G. "Perturbed-chain SAFT: An equation of state based on a perturbation theory for chain molecules". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 40, pp. 1244-1260, 2001.

GROSS, J. ; SADOWSKI, G. "Application of the perturbed-chain SAFT equation of state to associating systems". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 41, pp. 5510-5515, 2002.

GU, T. ; ZHENG, Y. "A study of the scale-up of reversed-phase liquid chromatography". *Separation and Purification Technology*, v. 15, pp. 41-58, 1999.

GU, T. **Mathematical modeling and scale-up of liquid chromatography**. Berlin: Springer, 1995.

GUÉLAT, B.; DELEGRANGE, L.; VALAX, P. *et al.* "Model-based prediction of monoclonal antibody retention in ion-exchange chromatography". *Journal of Chromatography A*, v. 1298, pp. 17– 25, 2013.

GUÉLAT, B.; STRÖHLEIN, G.; LATTUADA, M. *et al.* "Electrostatic model for protein adsorption in ion-exchange chromatography and application to monoclonal antibodies, lysozyme and chymotrypsinogen A". *Journal of Chromatography A*, v. 1217, 2010.

GUERRIER, L.; LOMAS, L.; BOSCHETTI, E. "A new general approach to purify proteins from complex mixtures". *Journal of Chromatography*, v. 1156, pp. 188-195, 2007.

GUGGENHEIM, E. A. "Thermodynamic properties of aqueous solutions of strong electrolytes". *Phil. Mag.*, v. 19, pp. 588-643, 1935.

GUIOCHON, G. ; BEAVER, L. A. "Separation science is the key to successful biopharmaceuticals". *Journal of Chromatography A*, v. 1218, pp. 8836– 8858, 2011.

GUIOCHON, G.; GOLSHAN-SHIRAZI, S.; KATTI, A. M. **Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography**. Boston: Academic phase Press, 1994.

GUPTA, R. B. ; HEIDEMANN, R. A. "Solubility Models for Amino Acids and Antibiotics". *AIChE Journal*, v. 36, pp. 333-341, 1990.

GUPTA, R. B. ; HEIDEMANN, R. A. "Solubility Models for Amino Acids and Antibiotics". *AIChE Journal*, v. 36, pp. 333-341, 1990.

HAHN, R.; DEINHOFER, K.; MACHOLD, C. *et al.* "Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins II. Binding Capacity, Recovery and Mass Transfer Properties". *Journal of Chromatography B*, v. 790, pp. 99-114, 2003.

HAMEL, J. P. ; HUNTER, J. B. Modeling and Applications of Downstream Processing - A Survey of Innovative Strategies. In: HAMEL, J.; HUNTER, J. B.; SIKDAR, S. K. **Downstream Processing and Bioseparation**. [S.l.]: American Chemical Society, v. 419, 1990. Cap. 1, p. 1-35.

HANSEN, S. K. High Throughput Analytics dor Protein Purification Process Development and Process Control. Dr. Ing. Thesis. Karlsruher Instituts fur Technologie, Aarhus, 2013.

HAYNES, C. A.; TAMURA, K.; KORFER, H. R. *et al.* "Thermodynamic Properties of Aqueous α -Chymotrypsin Solutions from Membrane Osmometry Measurements". *The Journal of Physical Chemistry*, v. 96, pp. 905-912, 1992.

HEADON, D. R. ; WALSH, G. "The Industrial Production of Enzymes". *Biotechnology Advances*, v. 12, pp. 635-646, 1994.

HELD, C.; CAMERETTI, L. F.; SADOWSKI, G. "Measuring and Modeling Activity Coefficients in Aqueous Amino-Acid Solutions". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 50, pp. 131–141, 2011.

HELD, C.; RESCHKE, T.; MÜLLER, R. *et al.* "Measuring and Modeling Aqueous Electrolyte/Amino-Acid Solutions with ePC-SAFT". *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 68, pp. 1–12, 2014.

HELFFERICH, F. G. **Ion Exchange**. [S.l.]: Courier Dover Publications, v. Dover science books – McGraw-Hill series in advanced chemistry, 1995.

HELFFERICH. **Ion Exchange**. New York: Dover Publications, v. Dover Science Books, 1995.

HUANG, S. H. ; RADOSZ, M. "Equation of State for Small, Large, Polydisperse and Association Molecules". *Industrial and Chemical Engineering Research*, v. 29, pp. 2284 , 1990.

HUANG, S. H. ; RADOSZ, M. "Equation of State for Small Large, Polydisperse and Associating Molecules: Extention to Fluid Mixtures". *Industrial and Chemical Engineering Research*, v. 30, pp. 1994 , 1991.

HUBBUCH, J.; LINDEN, T.; KNEIPS, E. *et al.* "Mechanism and kinetics of protein transport in chromatographic media studied by confocal laser scanning microscopy. Part I. The interplay of sorbent structure and fluid phase conditions". *Journal of Chromatography A*, v. 1021(1-2), pp. 93-104, 2003.

HUENUPI, E.; GÓMEZ, A.; ANDREWS, B. A. *et al.* "Optimization and design considerations of two-phase continuous protein separation". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 74, pp. 256-263, 1999.

HUNTER, A. K. . C. G.". Protein adsorption on novel acrylamido-based polymeric ion-exchangers: IV. Effects of protein size on adsorption capacity and rate". *Journal of Chromatography A*, v. 971 (1-2), pp. 105–116, 2002.

IWAI, Y. ; ARAI, Y. **Physico-Chemical Properties for Chemical Engineering**. Japan: Soc. Chem. Eng., v. 11, 1989.

IYER, H.; TAPPER, S.; LESTER, P. *et al.* "Use of the steric mass action model in ion-exchange chromatographic process development". *Journal of Chromatography A*, v. 832, pp. 1-9, 1999.

JAMES, A. T. ; MARTIN, A. J. P. "Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of ammonia and the methylamines". *Journal of Biochemistry*, v. 52, n. 2, pp. 238-242, 1952.

JAULMES, A.; VIDAL-MADJAR, C.; COLIN, H. *et al.* "Study of Peak Profiles in Nonlinear Liquid Chromatography". *Journal of Physical Chemistry*, v. 90, pp. 207-215, 1986.

JAWORSKI, Z.; CZERNUSZEWICZ, M.; GRALLA, L. "A COMPARATIVE STUDY OF THERMODYNAMIC ELECTROLYTE MODELS APPLIED TO THE SOLVAY SODA SYSTEM". *Chemical and Process Engineering*, v. 32 , n. 2, pp. 135-154, 2011.

JEANSONNE, M. S. ; FOLEY, J. P. "Review of the Exponentially Modified Gaussian (EMG) Function Since 1983". *Journal of Chromatographic Science*, v. 29, pp. 258-266, 1991.

JI, P. ; FENG, W. "Solubility of Amino Acids in Water and Aqueous Solutions by the Statistical Associating Fluid Theory". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 47, pp. 6275–6279, 2008.

JI, P. ; FENG, W. "Solubility of Amino Acids in Water and Aqueous Solutions by the Statistical Associating Fluid Theory". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 47, pp. 6275–6279, 2008.

JI, P.; FENG, W.; TAN, T. "Modeling of Density of Aqueous Solutions of Amino Acids with the Statistical Associating Fluid Theory". *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 39, pp. 1057-1064, 2007.

JI, P.; ZOU, J.; FENG, W. "Effect of alcohol on the solubility of amino acid in water". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , v. 56, pp. 185-188, 2009.

JIN, L.; YU, Y. X.; GAO, G. H. "A molecular-thermodynamic model for the interactions between globular proteins in aqueous solutions: applications to bovine

serum albumin (BSA), lysozyme, alpha-chymotrypsin, and immuno-gamma-globulins (IgG) solutions". *Journal of Colloid Interface Science*, v. 304, n. 1, pp. 77-83, 2006.

KACZMARSKI, K. "Estimation of adsorption isotherm parameters with inverse methods – Possible problems". *Journal of Chromatography A*, v. 1176, pp. 57-68, 2007.

KALTENBRUNNER, O. ; JUNGBAUER, A. "Adsorption isotherms in protein chromatography: Combined influence of protein and salt concentration on adsorption isotherm". *Journal of Chromatography A*, v. 734 , pp. 183-194, 1996.

KALTENBRUNNER, O.; GIAVERINI, O.; WOEHLER, D. *et al.* "Application of Chromatographic Theory for Process Characterization Towards Validation of an Ion-Exchange Operation". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 98 (1), pp. 201-210, 2007.

KALYANPUR, M. "Downstream Processing in the Biotechnology Industry". *Molecular Biotechnology*, v. 22, pp. 87-98, 2002.

KARKOV, H. S.; SEJERGAARD, L.; CRAMER, S. M. "Methods development in multimodal chromatography with mobile phase modifiers using the steric mass action model". *Journal of Chromatography A*, v. 1318, pp. 149– 155, 2013.

KEIM, C. ; LADISCH, M. R. **Bioseparation of Natural Products**. Progress in Biotechnology - Anais do International Conference on Bioprocess Engineering: "Recovery and Recycle of Resources to Protect the Global Environment". [S.l.]: [s.n.]. 2000.

KELLEY, B. D. "Biochemical engineering Bioprocessing of therapeutic proteins - Editorial overview". *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, pp. 173-174, 2001.

KELLEY, B. D.; BLANK, G.; LEE, A. Downstream processing of monoclonal antibodies: current practices and future opportunities. In: GOTTSCHALK, U. (.). **Process Scale Purification of Antibodies**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. p. 1–23.

KENNEDY, J. ; EBERHART, R. **A discrete binary version of the particle swarm algorithm**. Proc. IEEE International Conference on Neural Networks. Perth: [s.n.]. 1995. p. 1942-1948.

KHOSHKBARCHI, M. K. ; VERA, J. H. "Measurement and Modeling of Activities of Amino Acids in Aqueous Salt Systems". *AIChE Journal*, v. 42, pp. 2354-2364, 1996a.

KHOSHKBARCHI, M. K. ; VERA, J. H. "A Simplified Hard-Sphere Model for Activity Coefficients of Amino Acids and Peptides in Aqueous Solutions". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 35, pp. 4319, 1996b.

KHOSHKBARCHI, M. K. ; VERA, J. H. "Effect of NaCl and KCl on the Solubility of Amino Acids in Aqueous Solutions at 298.2 K: Measurements and Modeling". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 36, pp. 2445-2451, 1997.

KHOSHKBARCHI, M. K. ; VERA, J. H. "A Theoretically Improved Perturbation Model for Activity Coefficients of Amino Acids and Peptides in Aqueous Solutions". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 37, pp. 3052-3057, 1998.

KIM, Y.; HAAM, S.; KOO, K. K. *et al.* "Representation of Solid-Liquid Equilibrium of L-Ornithine-L-Aspartate + Water + Methanol System Using the Chen Model for Mixed-Solvent Electrolyte Solution". *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 46, pp. 1387-1391, 2001.

KNUBOVETS, T.; OSTERHOUT, J. J.; CONNOLLY, P. J. *et al.* "Structure, thermostability, and conformational flexibility of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, pp. 1262-1267, 1999.

KONTOGEORGIS, G. M.; FREDENSLUND, A.; TAESIOS, D. P. "Simple Activity Coefficient Model for the Prediction of Solvent Activities in Polymer Solutions". *Znd. Eng. Chem.Res.*, v. 32, pp. 362, 1993.

KOPACIEWICZ, W.; ROUNDS, M. A.; FAUSNAUGH, J. *et al.* "Retention Model for High-performance Ion-exchange Chromatography". *Journal of Chromatography*, v. 266, pp. 3-21, 1983.

KURAMOCHI, H.; NORITOMI, H.; HOSHINO, D. *et al.* "Measurements of Vapor Pressures of Aqueous Amino Acid Solutions and Determination of Activity Coefficients of Amino Acids". *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 42, pp. 470-474, 1997.

LADIWALA, A.; REGE, K.; BRENNEMAN, C. M. *et al.* "A priori prediction of adsorption isotherm parameters and chromatographic behavior in ion-exchange systems". *PNAS*, v. 102 (33), pp. 1710–1715, 2005.

LAN, Q.; BASSI, A. S.; ZHU, J. X. *et al.* "A modified Langmuir model for the prediction of the effects of ionic strength on the equilibrium characteristics of protein adsorption onto ion exchange/affinity adsorbents". *Chemical Engineering Journal*, v. 81, pp. 179-186, 2001.

LAPIDUS, L. ; AMUNDSON, N. R. "Mathematics of adsorption in beds. VI. The effect of longitudinal diffusion in ion exchange and chromatographic columns". *Journal of Physical Chemistry*, v. 56, pp. 984-988, 1952.

LARSEN, B. L.; RASMUSSEN, P.; FREDESLUND, A. "A Modified UNIFAC Group-Contribution Model for Prediction of Phase Equilibria and Heat of Mixing". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 26, pp. 2274-2286, 1987.

LESER, E. W. ; ASENJO, J. A. "Review: Rational design of purification processes for recombinant proteins". *Journal of Chromatography*, v. 584, pp. 43-57, 1992.

LESER, E. W. ; ASENJO, J. A. "The rational selection of purification processes for proteins: an expert system for downstream processing design". *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 721, pp. 337-347, 1994.

LESER, E. W. PROT EX: an expert system for selecting the sequence of processes for the downstream purification of proteins. Ph.D. thesis. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Food. The University of Reading, Reading, 1996.

LESER, E. W.; LIENQUEO, M. E.; ASENJO, J. A. "Implementation in an Expert System of selection rationale for purification processes for recombinant proteins". *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 782, pp. 441-455, 1996.

LI, Y. ; PINTO, N. G. "Model for ion-exchange equilibria of macromolecules in preparative chromatography". *Journal of Chromatography A*, v. 702, pp. 113-123, 1995.

LIAPIS, A. I.; ANSPACH, B.; FINDLEY, M. E. *et al.* "Biospecific adsorption of lysozyme onto monoclonal antibody ligand immobilized on nonporous silica particles". *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, v. 34, pp. 467–77, 1989.

LIENQUEO, M. E. ; ASENJO, J. A. "Use of expert systems for the synthesis of downstream protein processes". *Computers and Chemical Engineering*, v. 24, pp. 2339-2350, 2000.

LIENQUEO, M. E.; LESER, E. W.; ASENJO, J. A. "An Expert System for the Selection and Synthesis of Multistep Protein Separation Processes". *Computers and Chemical Engineering*, v. 20, pp. S189-S194, 1996.

LIENQUEO, M. E.; SALGADO, J. C.; ASENJO, J. A. **Design of an expert system for selection of protein purification processes:** comparison between different selection criteria. *Computer Applications in Biotechnology - CAB7*. Osaka, Japan: [s.n.]. 1998. p. 321–324.

LIENQUEO, M. E.; SALGADO, J. C.; ASENJO, J. A. "An Expert System for selection of protein purification processes: experimental validation". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 74, pp. 293-299, 1999.

LIM, Y. L.; JORGENSEN, S. B.; KIM, I. "Computer-aided model analysis for ionic strength-dependent effective charge of protein in ion-exchange chromatography". *Biochemical Engineering Journal*, v. 25, pp. 125-140, 2005.

LIN, Y. Z.; LI, Y. G.; LU, J. F. "Correlation and Prediction of Osmotic Pressures for Aqueous Bovine Serum Albumin–NaCl Solutions Based on Two Yukawa Potentials". *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 239, pp. 58-63, 2001.

LIN, Y. Z.; LI, Y. G.; LU, J. F. "Study on Osmotic Pressures for Aqueous Lysozyme and α -Chymotrypsin—Electrolyte Solutions with Two Yukawa Potentials". *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 251, pp. 256-262, 2002.

LIU, J. C.; LU, J. F.; LI, Y. G. "Study on the activity coefficients and the solubilities of amino acids in water by the perturbation theory". *Fluid Phase Equilibria*, v. 142, pp. 67-82, 1998.

LIU, J.; HILTON, Z. A.; CRAMER, S. M. "Chemically Selective Displacers for High-Resolution Protein Separations in Ion-Exchange Systems: Effect of Displacer". *Analytical Chemistry*, v. 80, pp. 3357-3364, 2008.

LONG, F. A. ; MCDEVIT, W. F. "Activity Coefficients of Nonelectrolyte Solutes in Aqueous Salt Solutions". *Chemical Reviews*, v. 51, pp. 119–169, 1952.

LOWE, C. R.; LOWE, A. R.; GUPTA, G. "New Developments in Affinity Chromatography with Potential Application in the Production of Biopharmaceuticals". *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, pp. 561–574, 2001.

LU, J. "Mathematical modeling of salt-gradient ion-exchange simulated moving bed chromatography for protein separations". *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, v. 5(12), pp. 1613-1620, 2004.

LU, Y.; CHEN, D.; WANG, G. K. *et al.* "Study of Interactions of Bovine Serum Albumin in Aqueous (NH₄)₂SO₄ Solution at 25 °C by Osmotic Pressure Measurements". *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 54, pp. 1975–1980, 2009.

MACEDO, E. A.; SKOVBOG, P.; RASMUSSEN, P. "Calculation of Phase Equilibria for Solutions of Strong Electrolytes in Solvent-Water Mixtures". *Chemical Engineering Science*, v. 45, n. 4, pp. 875, 1990.

MAJOREK, K. A.; POREBSKI, P. J.; DAYAL, A. *et al.* "Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins". *Molecular Immunology*, v. 52, pp. 174– 182, 2012.

MAO, Q. M.; JOHNSTON, A.; PRINCE, I. G. *et al.* "High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins". *Journal of Chromatography*, v. 548, pp. 147-63, 1991.

MARTIN, A. J. P. ; SYNGE, R. L. M. "A new form of chromatogram employing two liquid phase". *Biochemistry Journal*, v. 35, pp. 1358-1358, 1941.

MARTIN, C.; IBERER, G.; UBIERA, A. *et al.* "Two-component protein adsorption kinetics in porous ion exchange media". *Journal of Chromatography A*, v. 1079 , pp. 105–115, 2005.

MIGLIORINI, C.; GENTILINI, A.; MAZZOTTI, M. *et al.* "Design of Simulated Moving Bed Units under Nonideal Conditions". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 38 (6), pp. 2400-2410, 1999.

MINTON, A. P. "A molecular model for the dependence of the osmotic pressure of bovine serum albumin upon concentration and PH". *Biophysical Chemistry*, v. 57, pp. 65-70, 1995.

MIYABE, K. ; GUIOCHON, G. "Analysis of Surface Diffusion Phenomena in Reversed-Phase Liquid Chromatography". *Analytical Chemistry*, v. 71 (4), pp. 889–896, 1999.

MIYABE, K. ; GUIOCHON, G. "Measurement of the parameters of the mass transfer kinetics in high performance liquid chromatography". *Journal of Separation Science*, v. 26, pp. 155-173, 2003.

MOLLERUP, J. M. "Applied thermodynamics: A new frontier for biotechnology". *Fluid Phase Equilibria*, v. 241, pp. 205-215, 2006.

MOLLERUP, J. M. "The thermodynamic principles of ligand binding in chromatography and biology". *Journal of Biotechnology*, v. 132, pp. 187-195, 2007.

MOLLERUP, J. M.; BREIL, M. P.; VOGELPOHL, C. *et al.* "Simultaneous correlation of hydrophobic interactions in HIC and protein solubility in aqueous salt solutions and mixed solvents". *Fluid Phase Equilibria*, v. 301, pp. 163-170, 2011.

MOLLERUP, J. M.; HANSEN, T. B.; KIDAL, S. *et al.* "Development, modelling, optimisation and scale-up of chromatographic purification of a therapeutic protein". *Fluid Phase Equilibria*, v. 261, pp. 133-139, 2007.

MOLLERUP, J. M.; HANSEN, T. B.; KIDAL, S. *et al.* "Quality by design-Thermodynamic modelling of chromatographic separation of proteins". *Journal of Chromatography A*, v. 1177 , pp. 200-206, 2008.

MOON, Y. U.; ANDERSON, C. O.; BLANCH, H. W. *et al.* "Osmotic pressures and second virial coefficients for aqueous saline solutions of lysozyme". *Fluid Phase Equilibria*, v. 168, pp. 229-239, 2000b.

MOON, Y. U.; CURTIS, R. A.; ANDERSON, C. O. *et al.* "Protein–Protein Interactions in Aqueous Ammonium Sulfate Solutions. Lysozyme and Bovine Serum Albumin (BSA)". *Journal of Solution Chemistry*, v. 29, n. 8, 2000a.

MORTAZAVI-MANESH, S.; GHOTBI, C.; TAGHIKHANI, V. "A new model for predicting activity coefficients in aqueous solutions of amino acids and peptides". *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 35, pp. 101-112, 2003.

MORTAZAVI-MANESH, S.; GHOTBI, C.; TAGHIKHANI, V. "A new model for predicting activity coefficients in aqueous solutions of amino acids and peptides". *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 35, pp. 101-112, 2003.

NAIK, A. D. ; BHAGWAT, S. S. "Optimization of an Artificial Neural Network for Modeling Protein Solubility". *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 50, pp. 460-467, 2005.

NAIK, A. D. ; BHAGWAT, S. S. "Optimization of an Artificial Neural Network for Modeling Protein Solubility". *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 50, pp. 460-467, 2005.

NASS, K. K. "Representation of the Solubility Behavior of Amino Acids in Water". *AIChE Journal*, v. 34, n. 8, pp. 1257-1266, 1988.

NASS, K. K. "Representation of the Solubility Behavior of Amino Acids in Water". *AIChE Journal*, v. 34, n. 8, pp. 1257-1266, 1988.

NATALI, J. M.; PINTO, J. M.; PAPAGEORGIOU, L. G. "Piecewise polynomial interpolations and approximations of one-dimensional functions through mixed integer linear programming". *Optimization Methods and Software*, v. 24, n. 4-5, pp. 783-803, 2009.

NELSON, D. L. ; COX, M. **Lehninger- Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NFOR, B. K. Model-based Rational and Systematic Protein Purification Process Development. PhD Thesis. Department of Biotechnology, Delft University of Technology, 2011.

NFOR, B. K.; AHAMED, T.; VAN DEDEM, G. W. K. *et al.* "Design strategies for integrated protein purification processes: challenges, progress and outlook". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, pp. 124-132, 2008.

NFOR, B. K.; NOVERRAZ, M.; CHILAMKURTHI, S. *et al.* "High-throughput isotherm determination and thermodynamic modeling of protein adsorption on mixed mode adsorbents". *Journal of Chromatography A*, v. 1217 , pp. 6829–6850, 2010.

NFOR, B. K.; VERHAERT, P. D.; VAN DER WIELEN, L. A. *et al.* "Rational and systematic protein purification process development: the next generation". *Trends in Biotechnology*, v. 27 (12), pp. 673-679, 2009.

OBERHOLZER, M. R. ; LENHOFF, A. M. "Protein Adsorption Isotherms through Colloidal Energetics". *Langmuir*, v. 15, pp. 3905-3914, 1999.

OISHI, T. ; PRAUSNITZ, J. M. "Estimation of Solvent Activities in Polymer Solutions Using a Group Contribution Methodology". *Ind. Eng. Chemical Process Des. Dev.*, v. 17, pp. 333-339, 1978.

OLIVEIRA, J. A.; GAMBETTA, R.; PINTO, J. C. **Pega Ponto Versão 1.0**. INPI 00071903, Janeiro 2006.

ORELLA, C. J. ; KIRWAN, D. J. "Correlation of Amino Acid Solubilities in Aqueous Aliphatic Alcohol Solutions". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 30, pp. 1040-1045, 1991.

ORELLANA, C. A.; SHENE, C.; ASENJO, J. A. "Mathematical Modeling of Elution Curves for a Protein Mixture in Ion Exchange Chromatography Applied to High Protein Concentration". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 104 (3), pp. 572-581, 2009.

OSBERGHAUS, A.; HEPBILDIKLER, S.; NATH, S. *et al.* "Determination of parameters for the steric mass action model—A comparison between two approaches". *Journal of Chromatography A*, v. 1233 (13), pp. 54–65, April 2012.

PAZUKI, G. R. ; NIKOOKAR, M. "A new local composition model for predicting of activity coefficient and solubility of amino acids and peptides in water". *Biochemical Engineering Journal*, v. 28, pp. 44-49, 2006.

PAZUKI, G. R.; HOSSEINBEIGI, H. R.; EDALAT, M. "Correlation of Phase Equilibria of Amino Acids and Peptides in Aqueous Solution Based on the Perturbation Theory of Equation of State". *Fluid Phase Equilibria*, v. 240, pp. 40-45, 2006.

PAZUKI, G. R.; ROHANI, A. A.; DASHTIZADEH, A. "Correlation of the mean ionic activity coefficients of electrolytes in aqueous amino acid and peptide systems". *Fluid Phase Equilibria*, v. 231, pp. 171-175, 2005.

PAZUKI, G. R.; TAGHIKHANI, V.; VOSSOUGH, M. "Correlation and Prediction the Activity Coefficients and Solubility of Amino Acids and Simple Peptide in Aqueous Solution using the Modified Local Composition Model". *Fluid Phase Equilibria*, v. 255, pp. 160-16, 2007.

PAZUKI, G. R.; TAGHIKHANI, V.; VOSSOUGH, M. "Modeling of Aqueous Biomolecules Using a New Free-Volume Group Contribution Model". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 48, pp. 4109-4118, 2009.

PEDERSEN, L. Modeling retention volumes, isotherms and plate heights for whey proteins in anion-exchange chromatography. Ph.D. Thesis. IVC-SEP - Department of Chemical Engineering, Technical University of Denmark, Copenhagen, 2002.

PEDERSEN, L.; MOLLERUP, J.; HANSEN, E. *et al.* "Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins". *Journal of Chromatography B*, v. 790, pp. 161-173, 2003.

PERKINS, T. W.; MAK, D. S.; ROOT, T. W. *et al.* "Protein Retention in Hydrophobic Interaction Chromatography: Modeling Variation with Buffer Ionic Strength and Column Hydrophobicity". *Journal of Chromatography A*, v. 766, pp. 1-14, 1997.

PESSÔA FILHO, P. A. ; MAURER, G. "An extension of the Pitzer equation for the excess Gibbs energy of aqueous electrolyte systems to aqueous polyelectrolyte solutions". *Fluid Phase Equilibria*, v. 269, n. 1-2, pp. 25-35, 2008.

PESSOA, F. L. P. ; RASMUSSEN, P. **Cálculo do Equilíbrio Líquido-Vapor em Soluções de água-Ácido Nítrico Usando a Equação UNIQUAC Estendida e Revisada para Eletrólitos. Influencia do Termo Debye-Hucke**. 9º Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Salvador: [s.n.]. 1992.

PESSOA, F. L. P. Equilíbrio de Fases de Misturas Reativas. Tese D.Sc. Programa de Engenharia Química/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1992.

PESSOA, F. L. P. Memorial. Concurso público para o cargo de professor titular. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

PETRIDES, D. P. ; SILETTI, C. A. **The Role of Process Simulation and Scheduling Tools in the Development and Manufacturing of Biopharmaceuticals**. Proceedings of the 2004 Winter Simulation Conference. Washington: [s.n.]. 2004. p. 2046-2051.

PETRIDES, D. P.; KOULOURIS, A.; LAGONIKOS, P. T. "The role of process simulation in pharmaceutical process development and product commercialization". *Pharmaceutical Engineering*, v. 22, pp. 1-8, 2002.

PINHO, S. P. A. Phase Equilibria in Electrolyte Systems. Eng. Chem. D. Thesis. Departamento de Engenharia Química / Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto, 2000.

PINHO, S. P.; SILVA, C. M.; MACEDO, E. A. "Solubility of Amino Acids: A Group-Contribution Model Involving Phase and Chemical Equilibria". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 33, pp. 1341-1347, 1994.

PITZER, K. S. "Electrolytes from Dilute Solutions to Fused Salts". *Journal of the American Chemical Society*, v. 102, n. 9, pp. 2902-2906, 1980.

PRADHAN, A. A. ; VERA, J. H. "Effect of Acids and Bases on the Solubility of Amino Acids". *Fluid Phase Equilibria*, v. 152, pp. 121-132, 1998.

PRAUSNITZ, J. M.; LICHTENTHALER, R. N.; AZEVEDO, E. G. **Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria**. 3. ed. New Jersey: Prentice Hall (Prentice Hall International Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences), 1999.

PRESS, W. H.; TEUKOLSKY, S. A.; VETTERLING, W. T. *et al.* **Numerical Recipes in Fortran 90**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.

PROKOPAKIS, G. J. ; ASENJO, J. A. Synthesis of Downstream Processes. In: ASENJO, J. A. **Separation Processes in Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 571-601.

RADER, R. A. "An Analysis of the US Biosimilars Development Pipeline and Likely Market Evolution". *BioProcess International*, v. 11, n. 6s, pp. 16-23, 2013.

RAJE, P. ; PINTO, N. G. "Combination of the steric mass action and non-ideal surface solution models for overload protein ion-exchange chromatography". *Journal of Chromatography A*, v. 760, pp. 89-103, 1997.

RAJE, P. ; PINTO, N. G. "Importance of heat of adsorption in modeling protein equilibria for overloaded chromatography". *Journal of Chromatography A*, v. 796, pp. 141-156, 1998.

REGE, K.; PEPSIN, M.; FALCON, B. *et al.* "High-throughput process development for recombinant protein purification". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 93, n. 4, pp. 618-630, 2006.

REGNIER, F. E. ; MAZSAROFF, I. "A Theoretical-Examination of Adsorption Processes in Preparative Liquid-Chromatography of Proteins". *Biotechnology Progress*, v. 3, pp. 22-26, 1987.

RENON, H. ; PRAUSNITZ, J. M. "Local Compositions in Thermodynamic Excess Functions for Liquid Mixtures". *AIChE Journal*, v. 14, n. 1, pp. 135-144, 1968.

ROSS, P. D. ; MINTON, A. P. "Analysis of Non-ideal Behavior in Concentrated Hemoglobin Solutions". *Journal of Molecular Biology*, v. 112, pp. 437-452, 1977.

ROUNDS, M. A. ; REGNIER, F. E. "Evaluation of a Retention Model for High-Performance Ion-exchange Chromatography Using two Different Displacing Salts". *Journal of Chromatography*, v. 283, pp. 37-45, 1984.

SADEGHI, R. "Thermodynamic Representation of Phase Equilibrium Behavior of Aqueous Solutions of Amino Acids by the Modified Wilson Model". *Fluid Phase Equilibria*, v. 260, pp. 266-274, 2007.

SANDER, B.; FREDESLUND, A.; RASMUSSEN, P. "Calculation of Vapor-Liquid Equilibria in Mixed Solvent/Salt Systems, using an Extended UNIQUAC Equation". *Chemical Engineering Science*, v. 41, pp. 1171, 1986.

SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHI, A. *et al.* "Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market". *Journal Bioprocessing & Biotechniques*, pp. S4:002, 2012.

SASAHARA, K.; SAKURAI, M.; NITTA, K. "The Volume and Compressibility Changes of Lysozyme Associated with Guanidinium Chloride and Pressure-assisted Unfolding". *Journal of Molecular Biology*, v. 291, pp. 693-701, 1999.

SCATCHARD, G.; RUSH, R. M.; JOHNSON, J. S. "Osmotic and Activity Coefficients for Binary Mixtures of Sodium Chloride, Sodium Sulfate, Magnesium Sulfate and Magnesium Chloride in Water at 25°C". *The Journal of Physical Chemistry*, v. 74, pp. 3786, 1970.

SCHRAMM, H.; KASPEREIT, M.; KIENLE, A. *et al.* "Simulated Moving Bed Process with Cyclic Modulation of the Feed Concentration". *Journal of Chromatography A*, v. 1006 (1-2), pp. 77-86, 2003.

SCHULTE, M. ; EPPING, A. Fundamentals and General Terminology. In: SCHMIDT-TRAUB, H. **Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents**. [S.l.]: Wiley-VCH, 2005. p. 9-49.

SEVERO JR., J. B. Avaliação de técnicas de planejamento de experimentos no reconhecimento do equilíbrio de adsorção em sistemas cromatográficos. Tese de D.Sc. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SEYFI, S.; PAZUKI, G.; AGHAMIRI, S. F. *et al.* "On the prediction of equilibrium phase behavior of amino acids in aqueous and aqueous-electrolyte solutions using SAFT equation of state". *Fluid Phase Equilibria*, v. 287, pp. 15-22, 2009.

SHENE, C.; LUCERO, A.; ANDREWS, B. A. *et al.* "Mathematical Modeling of Elution Curves for a Protein Mixture in Ion Exchange Chromatography and for the Optimal Selection of Operational Conditions". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 95 (4), pp. 704-713, 2006.

SHERIDAN, C. "Fresh from the biologic pipeline-2009". *Nature Biotechnology*, v. 28, n. 4, pp. 307-310, 2010.

SHUKLA, A. A.; BAE, S. S.; MOORE, J. A. *et al.* "Synthesis and characterization of high-affinity, low molecular weight displacers for cation-exchange chromatography". *Industrial & engineering chemistry research*, v. 37 (10), pp. 4090-4098, 1998.

SHUKLA, A. A.; HUBBARD, B.; TRESSEL, T. *et al.* "Downstream processing of monoclonal antibodies—application of platform approaches". *Journal of Chromatography B*, v. 848 (1), pp. 28-39, 2007.

SHULGIN, I. L. ; RUCKENSTEIN, E. "Relationship between preferential interaction of a protein in an aqueous mixed solvent and its solubility". *Biophysical Chemistry*, v. 118, pp. 128-134, 2005.

SIROLA, J. J. Industrial applications of chemical process synthesis. In: ANDERSON, J. L.; BISCHOFF, K. B. **Advances in Chemical Engineering: Process Synthesis**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Science, v. 23, 1996. p. 1-62.

SIMEONIDIS, E.; PINTO, J. M.; LIENQUEO, M. E. *et al.* "MINLP Models for the Synthesis of Optimal Peptide Tags and Downstream Protein Processing". *Biotechnology Progress*, v. 21, pp. 875-884, 2005a.

SIMEONIDIS, E.; PINTO, J. M.; PAPAGEORGIOU, L. G. **Optimal Peptide Tag Design and Synthesis of Downstream Protein Processing**. 14th European Symposium on Computer Aided Process Engineering - ESCAPE-14. Lisbon: [s.n.]. 2004. p. 289–294.

SIMEONIDIS, E.; PINTO, J. M.; PAPAGEORGIOU, L. G. **An MILP model for optimal design of purification tags and synthesis of downstream processing**. 15th European Symposium on Computer Aided Process Engineering - ESCAPE-15. Barcelona: [s.n.]. 2005b. p. 1537-1542.

SKIDMORE, G. L.; HORSTMANN, B. J.; CHASE, H. A. "Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose FF". *Journal of Chromatography*, v. 498, pp. 113-128, 1990.

SOTO, A.; ARCE, A.; KHOSHKBARCHI, M. K. *et al.* "Measurements and modeling of the solubility of a mixture of two amino acids in aqueous solutions". *Fluid Phase Equilibria*, v. 158-160, pp. 893-901, 1999.

SOTO, A.; ARCE, A.; KHOSHKBARCHI, M. K. "Experimental data and modeling of apparent molar volumes, isentropic compressibilities and refractive indices in aqueous solutions of glycine+NaCl". *Biophysical Chemistry*, v. 74, pp. 165-173, 1998.

STABY, A. I. ; MOLLERUP, J. "Solute retention of lysozyme in hydrophobic interaction perfusion chromatography". *Journal of Chromatography A*, v. 734, pp. 205-212, 1996.

STABY, A.; JENSEN, I. H.; MOLLERUP, I. "Comparison of chromatographic ion-exchange resins: I. Strong anion-exchange resins". *Journal of Chromatography A*, v. 897 (10–2), pp. 99–111, November 2000.

STABY, I.; JENSEN, R. H.; BENSCH, M. *et al.* "Comparison of chromatographic ion-exchange resins: VI. Weak anion-exchange resins". *Journal of Chromatography A*, v. 1164 (1–2), pp. 82–94, September 2007.

STEFFENS, M. A.; FRAGA, E. S.; BOGLE, I. D. L. "Multicriteria process synthesis for generating sustainable and economic bioprocesses". *Computers and Chemical Engineering*, v. 23, pp. 1455-1467, 1999a.

STEFFENS, M. A.; FRAGA, E. S.; BOGLE, I. D. L. "Optimal System Wide Design for Bioprocesses". *Computers and Chemical Engineering*, v. Supplement, pp. S51-S54, 1999b.

STEFFENS, M. A.; FRAGA, E. S.; BOGLE, I. D. L. "Synthesis of bioprocesses using physical properties data". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 68, pp. 218-230, 2000a.

STEFFENS, M. A.; FRAGA, E. S.; BOGLE, I. D. L. "Synthesis of purification tags for optimal downstream processing". *Computers and Chemical Engineering*, v. 24, pp. 717-720, 2000b.

STEIN, A. ; KIESEWETTER, A. "Cation exchange chromatography in antibody purification: pH screening for optimised binding and HCP removal". *Journal of Chromatography B*, v. 848, pp. 151-158, 2007.

STONE, M. C. ; CARTA, G. "Protein adsorption and transport in agarose and dextran-grafted agarose media for ion exchange chromatography". *Journal of Chromatography A*, v. 1146 , pp. 202–215, 2007.

STONE, M. C.; TAO, Y.; CARTA, G. "Protein adsorption and transport in agarose and dextran-grafted agarose media for ion exchange chromatography: Effect of ionic strength and protein characteristics". *Journal of Chromatography A*, v. 1216 , pp. 4465–4474, 2009.

SUSANTO, A.; KNIEPS-GRUNHAGEN, E.; VON LIERES, E. *et al.* "High Throughput Screening for the Design and Optimization of Chromatographic Processes: Assessment of Model Parameter Determination from High Throughput Compatible Data". *Chemical Engineering & Technology*, v. 31, n. 12, pp. 1846-1855, 2008.

SUSANTO, A.; TREIER, K.; KNIEPS-GRÜN HAGEN, E. *et al.* "High throughput screening for the design and optimization of chromatographic processes: automated optimization of chromatographic phase systems". *Chemical Engineering and Technology*, v. 32, pp. 140-154, 2009.

TALU, O. ; ZWIEBEL, I. "Multicomponent Adsorption Equilibria of Nonideal Mixtures". *AiChE Journal*, v. 32 (8), pp. 1263-1276, 1986.

TAO, Z.; YU, C.; ZHANG, H. *et al.* "Comparative study of adsorption isotherms of BSA on DEAE- and CM-dextran-type ion exchangers". *Reactive and Functional Polymers*, v. 32, pp. 257-262, 1997.

THOMSEN, K. ; RASMUSSEN, P. "Modeling of vapor-liquid-solid equilibrium in gas-aqueous electrolyte systems". *Chemical Engineering Science*, v. 54, pp. 1787-1802, 1999.

THOMSEN, K. Aqueous electrolytes: model parameters and process simulation. Ph.D. Thesis. Department of Chemical Engineering, Technical University of Denmark, Copenhagen, 1997.

THOMSEN, K.; RASMUSSEN, P.; GANI, R. "CORRELATION AND PREDICTION OF THERMAL PROPERTIES AND PHASE BEHAVIOUR FOR A CLASS OF AQUEOUS ELECTROLYTE SYSTEMS". *Chemical Engineering Science*, v. 51, n. 14, pp. 3675-3683, 1996.

TJONG, H. ; ZHOU, H. X. "Prediction of Protein Solubility from Calculation of Transfer Free Energy". *Biophysical Journal*, v. 95, pp. 2601-2609, 2008.

TO, B. C. S. ; LENHOFF, A. M. "Hydrophobic interaction chromatography of proteins II. Solution thermodynamic properties as a determinant of retention". *Journal of Chromatography A*, v. 1141, pp. 235-243, 2011.

TSENG, H. C.; LEE, C. Y.; WENG, W. L. *et al.* "Solubilities of amino acids in water at various pH values under 298.15K". *Fluid Phase Equilibria*, v. 285, pp. 90-95, 2009.

TYN, M. T. ; GUSEK, T. W. "Prediction of Diffusion Coefficients of Proteins". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 35, pp. 327-338, 1990.

UBIERA, A. R. ; CARTA, G. "Radiotracer measurements of protein mass transfer: Kinetics in ion exchange media". *Biotechnology Journal*, v. 1, pp. 665-674, 2006.

VAN DER WIELEN, L. A. M. ; RUDOLPH, E. S. J. "On the generalization of thermodynamic properties for selection of bioseparation processes". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 74, pp. 275-283, 1999.

VASQUEZ-ALVAREZ, E. ; PINTO, J. M. **MILP Models for the Synteshis of Protein Purification Processes**. Computer Aided Chemical Engineering (Proceedings of the European Symposium on Computer Aided Process Engineering – 11. [S.l.]: [s.n.], 2001. p. 579-584.

VASQUEZ-ALVAREZ, E. ; PINTO, J. M. **Mixed integer optimization models for the Synthesis of Protein Purification Processes with product loss**. Computer Aided Chemical Engineering (Proceedings of European Symposium on Computer Aided Process Engineering – ESC– ESCAPE-12). [S.l.]: [s.n.], 2002. p. 373-378.

VASQUEZ-ALVAREZ, E. ; PINTO, J. M. "A mixed integer linear programming model for the optimal synthesis of protein purification processes with product loss". *Chemical and Biochemical Engineering Quaterly*, v. 17, pp. 77-84, 2003.

VASQUEZ-ALVAREZ, E. ; PINTO, J. M. "Efficient MILP formulations for the optimal synthesis of chromatographic protein purification processes". *Journal of Biotechnology*, v. 110, pp. 295-311, 2004.

VASQUEZ-ALVAREZ, E.; LIENQUEO, M. E.; PINTO, J. M. "Optimal synthesis of protein purification processes". *Biotechnology Progress*, v. 17, pp. 685-696, 2001.

VELAYUDHAN, A.; LADISCH, M. R.; PORTER, J. E. "Modeling of non-linear elution chromatography for preparative-scale separations". *AIChE Symposium Series*, v. 88, n. 290, pp. 1-11, 1992.

VILKER, V. L.; COLTON, C. K.; SMITH, K. A. "The Osmotic Pressure of Concentrated Protein Solutions: Effect of Concentration and pH in saline Solutions of Bovine Serum Albumin". *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 79, pp. 548-566, 1981.

WAI, P. P. C.; BOGLE, I. D. L.; BAGHERPOUR, K. *et al.* "Process synthesis and simulation strategies for integrated biochemical process design". *Computers and Chemical Engineering*, v. 20, pp. S357-S362, 1996.

WAKAO, N.; OSHIMA, T.; YAGI, S. "Mass Transfer from Packed Beds of Particles to a Fluid". *Chem. Eng. Jap.*, v. 22, pp. 780, 1958.

WALSH, G. "Biopharmaceutical benchmarks 2010". *Nature Biotechnology*, v. 28, pp. 917-924, 2010.

WANG, P.; ANDERKO, A.; YOUNG, R. D. "A speciation-based model for mixed-solvent electrolyte systems". *Fluid Phase Equilibria*, v. 203 , pp. 141–176, 2002.

WATANABE, E.; TSOKA, S.; ASENJO, J. A. "Selection of chromatographic protein purification operations based on physicochemical properties". *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 721, pp. 348-364, 1994.

WENZIG, E.; LINGG, S.; KERZEL, P. *et al.* "Comparison of Selected Methods for Downstream Processing in the Production of Bacterial Lipase". *Chemical Engineering & Technology*, v. 16, pp. 405-412, 1993.

WHEELWRIGHT, S. M. "Designing downstream processes for large scale protein purification". *Bio/Technol*, v. 5, pp. 789-793, 1987.

WIBLIN, D. J.; ROE, S. D.; MYHILL, R. G. "Computer aided desk-top scale-up and optimisation of chromatographic processes". *Journal of Chromatography A*, v. 702 , pp. 81-87, 1995.

WIENDAHL, M.; WIERLING, P. S.; NIELSEN, J. *et al.* "High throughput screening for the design and optimization of chromatographic processes – miniaturization, automation and parallelization of breakthrough and elution studies". *Chemical Engineering and Technology*, v. 31, n. 6, pp. 893-903, 2008.

WIERLING, P. S.; BOGUMIL, R.; KNIEPS-GRUNHAGEN, E. *et al.* "High-throughput screening of packed-bed chromatography coupled with SELDI-TOF MS analysis: monoclonal antibodies versus host cell protein". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 98, pp. 440-450, 2007.

WILLS, P. R.; COMPER, W. D.; WINZOR, D. J. "Thermodynamic Nonideality in Macromolecular Solutions: Interpretation of Virial Coefficients". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 300, pp. 206-212, 1993.

WILSON, G. "Vapor-liquid Equilibrium. XI. A New Expression for the Excess Free Energy of Mixing". *Journal of the American Chemical Society*, v. 86, pp. 127-130, 1964.

WILSON, J. N. "A theory of chromatography". *Journal of the American Chemical Society*, v. 62, n. 6, pp. 1583-1591, 1940.

WU, J. ; PRAUSNITZ, J. M. "Osmotic pressures of aqueous bovine serum albumin solutions at high ionic strength". *Fluid Phase Equilibria*, v. 155, pp. 139-154, 1999.

XIA, F.; NAGRATH, D.; CRAMER, S. M. "Modeling of adsorption in hydrophobic interaction chromatography systems using a preferential interaction quadratic isotherm". *Journal of Chromatography A*, v. 989, pp. 47–54, 2003.

XU, X.; MADEIRA, P. P.; TEIXEIRA, J. A. *et al.* "A new modified Wilson equation for the calculation of vapor–liquid equilibrium of aqueous polymer solutions". *Fluid Phase Equilibria*, v. 213, pp. 53–63, 2003.

XU, X.; PINHO, S. P.; MACEDO, E. "Activity Coefficients and Solubility of Amino Acids in Water by the Modified Wilson Model". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 43, pp. 3200-3204, 2004.

XUE, X. Y.; SUN, J. X.; JUAN, M. W. "Correlation and prediction of osmotic pressures for three aqueous protein–electrolyte solutions based on the Ross perturbation theory and soft-core three-Yukawa potential". *Journal of Molecular Liquids*, v. 139, pp. 80-88, 2008.

YAMAMOTO, S. "Eletrostatic Interaction Chromatography Process for Protein Separations: Impact of Engineering Analysis of Biorecognition Mechanism on Process Optimization". *Chemical Engineering and Technology*, v. 28 (11), pp. 1387-1393, 2005.

YAMAMOTO, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. "Ion exchange chromatography of proteins predictions of elution curves and operational conditions. I. theoretical considerations". *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, pp. 1465-1483, 1983.

YAO, S. J.; GUAN, Y. X.; YU, L. H. "Adsorption Performance of Proteins to CM Sepharose FF and DEAE Sepharose FF Adsorbents". *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 20, n. 1, pp. 93-98, 2003.

YOKOZEKI, A. "Osmotic pressures studied using a simple equation-of-state and its applications". *Applied Energy*, v. 83, pp. 15–41, 2006.

YOUSEF, M. A.; DATTA, E.; RODGERS, V. G. J. "Confirmation of Free Solvent Model Assumptions in Predicting the Osmotic Pressure of Concentrated Globular Proteins". *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 243, pp. 321-325, 2001.

YOUSEF, M. A.; DATTA, E.; RODGERS, V. G. J. "Model of Osmotic Pressure for High Concentrated Binary Protein Solutions". *AIChE Journal*, v. 48, n. 4, pp. 913-917, 2002.

YU, L.; ZHANG, L.; SUN, Y. "Protein behavior at surfaces: Orientation, conformational transitions and transport". *Journal of Chromatography A*, v. 1382, pp. 118-134, 2015.

ZEMAITIS, J. . J. F.; CLARK, D. M.; RAFAL, M. *et al.* **Handbook of Aqueous Electrolyte Thermodynamics**. New York: AIChE, DIPPR, 1986.

ZHANG, X.; ZHANG, S.; HE, X. "Prediction of solubility of lysozyme in lysozyme–NaCl–H₂O system with artificial neural network". *Journal of Crystal Growth*, v. 264, pp. 409-416, 2004.

ZHAO, E.; YU, M.; SAUVE, R. E. *et al.* "Extension of the Wilson model to electrolyte solutions". *Fluid Phase Equilibria*, v. 173, pp. 161-175, 2000.

APENDICE A

Curva de Calibração

A seguir são apresentados os dados obtidos na realização da curva de calibração de BSA e de lisozima em tampão fosfato 0,02M e pH 7,0 no cromatógrafo *AKTA Purifier UPC 100* (GE Healthcare) a 280 nm.

Tabela A.1 – Resultados das curvas de calibração de BSA e lisozima

Experimento	Proteína	Concentração (g/L)	ABS (mAU)
Calib 1	BSA	25	2054,24
Calib 2	BSA	20	1920,24
Calib 3	BSA	15	1549,54
Calib 4	BSA	10	1118,76
Calib 5	BSA	7,5	866,03
Calib 6	BSA	5	572,75
Calib 7	BSA	2,5	289,08
Calib 8	BSA	1	126,19
Calib 9	BSA	0,5	71,77
Calib 10	Lisozima	6	2140,01
Calib 11	Lisozima	5	1921,08
Calib 12	Lisozima	3	1307,01
Calib 13	Lisozima	2,5	1090,72
Calib 14	Lisozima	2	872,81
Calib 15	Lisozima	1,5	665,26
Calib 16	Lisozima	1	446,77
Calib 17	Lisozima	0,5	214,63
Calib 18	Lisozima	0,25	109,42
Calib 19	Lisozima	0,15	91,49

Na faixa analisada os dados apresentaram uma tendência polinomial, sendo melhor representados nas Figuras A.1 e A.3. A região linear da curva de calibração é apresentada nas Figuras A.2 e A.4.

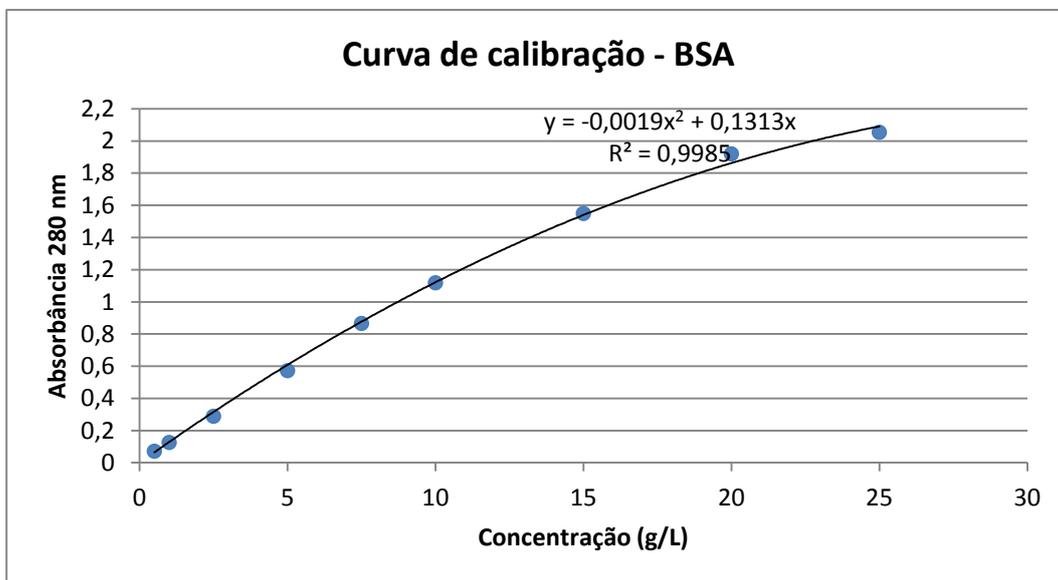


Figura A.1 – Curva de calibração de BSA – equação polinomial

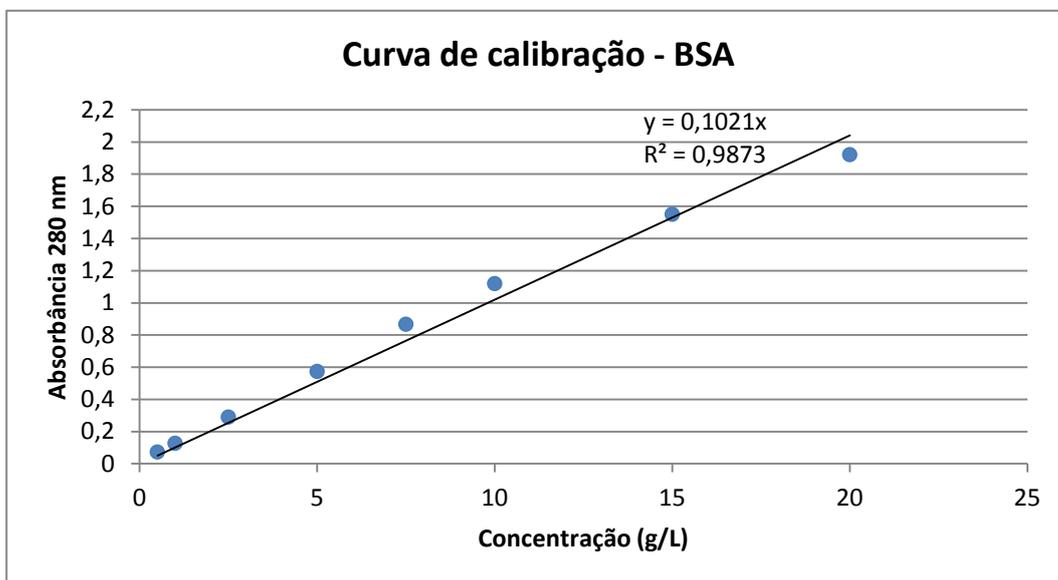


Figura A.2 – Curva de calibração de BSA – equação linear

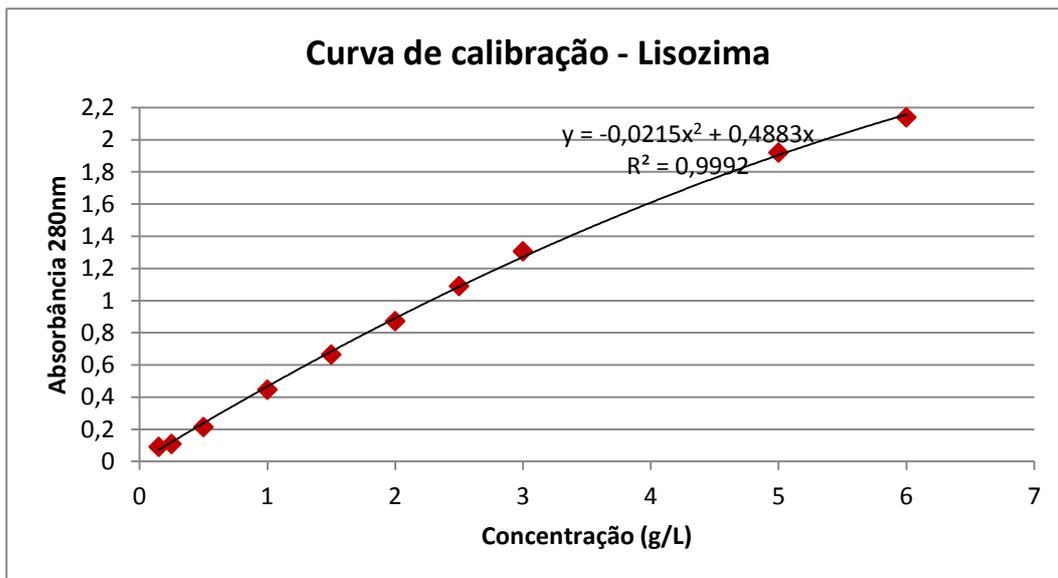


Figura A.3 – Curva de calibração de Lisozima – equação polinomial

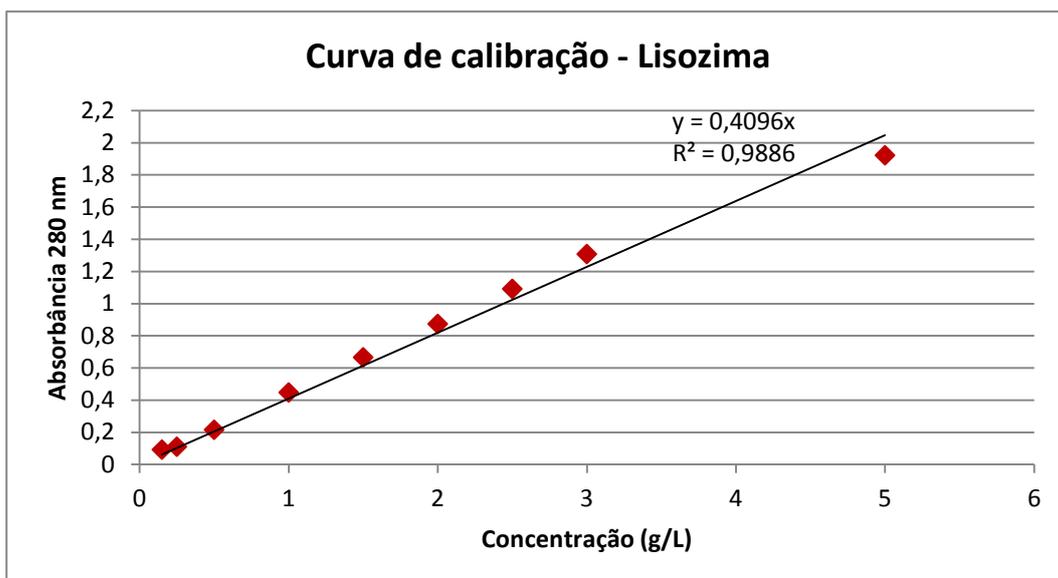


Figura A.4 – Curva de calibração de Lisozima – equação linear

APENDICE B

Determinação da porosidade

A porosidade total foi determinada por teste do tipo pulso de espécies não ligantes seguindo a metodologia de Pedersen (2002) utilizando as Equações B.1 e B.2. O volume morto do sistema é de 0,65 mL ($V_m = 0,65$ mL).

$$V_t = V_R - V_m \quad (\text{B.1})$$

$$\varepsilon_t = V_t/V_{\text{col}} \quad (\text{B.2})$$

A porosidade intersticial foi retirada de valores da literatura (UBIERA e CARTA, 2006) sendo utilizado $\varepsilon_b = 0,35$.

A porosidade da partícula adsorvente ε_p se relaciona pela Equação B.3 com a porosidade total ε_t e com a porosidade intersticial (porosidade da coluna) ε_b .

$$\varepsilon_p = (\varepsilon_t - \varepsilon_b)/(1 - \varepsilon_b) \quad (\text{B.3})$$

A fração volumétrica de vazios em uma partícula disponível para uma molécula é representada como $\varepsilon_p K_d$, onde K_d é o fator de exclusão que por definição é igual a 1 para sais e menor que 1 para moléculas grandes como proteínas. Assim, o experimento foi realizado com sal para garantir o fator de exclusão igual a 1.

O fator de exclusão K_d das proteínas foi determinado pelo volume de retenção de cada proteína em solução tampão com NaCl 1M para garantir que não haveria adsorção.

$$K_d = \frac{(V_{NA}/V_{col}) - \epsilon_b}{(1 - \epsilon_b)\epsilon_p} \quad (B.4)$$

O procedimento experimental consistiu em inicialmente equilibrar cada coluna com solução 1M NaNO₃ em tampão fosfato 0,02M pH 7,0 com 10 volumes de coluna (CV). Em seguida foi injetado 500µL de amostra através de amostrador automático. As amostras de proteína foram preparadas em condições não ligantes com solução NaCl 1M em tampão fosfato 0,02M pH 7,0. Também foi preparada uma amostra de solução NaNO₃ 0,75M em tampão fosfato 0,02M pH 7,0. O efluente da coluna foi monitorado a 280 nm e todos os dados foram armazenados.

A Tabela B.1 apresenta um resumo esquemático dos experimentos realizados.

Tabela B.1 – Planejamento de experimentos – porosidade

Experimento	Coluna	Amostra
Poros1 - Poros3	HiTrap TM Capto TM DEAE / 1 mL	0,75M NaNO ₃ / BSA / Lisozima
Poros4 - Poros6	HiTrap TM Capto TM Q / 1 mL	0,75M NaNO ₃ / BSA / Lisozima
Poros7 - Poros9	HiTrap TM SP FF / 1 mL	0,75M NaNO ₃ / BSA / Lisozima
Poros10 - Poros12	HiScreen TM Capto TM DEAE / 4,7 mL	0,75M NaNO ₃ / BSA / Lisozima
Poros13 - Poros15	HiScreen TM Capto TM Q / 4,7 mL	0,75M NaNO ₃ / BSA / Lisozima
Poros16 - Poros18	HiScreen TM SP FF / 4,7 mL	0,75M NaNO ₃ / BSA / Lisozima

Nas Tabelas B.2 e B.3 são apresentados os dados obtidos para a determinação da porosidade total e porosidade da partícula adsorvente.

Tabela B.2 – Porosidade total

Experimento	Coluna	Amostra	V _R (mL)	V _t (mL)	V _{col} (mL)	ε _t
Poros 1	HiTrap TM Capto TM DEAE	0,75M NaNO ₃	1,33	0,68	1	0,68
Poros 4	HiTrap TM Capto TM Q	0,75M NaNO ₃	1,36	0,71	1	0,71
Poros 7	HiTrap TM SP FF	0,75M NaNO ₃	1,43	0,78	1	0,78
Poros 10	HiScreen TM Capto TM DEAE	0,75M NaNO ₃	4,40	3,75	4,7	0,80
Poros 13	HiScreen TM Capto TM Q	0,75M NaNO ₃	4,62	3,97	4,7	0,84
Poros 16	HiScreen TM SP FF	0,75M NaNO ₃	4,79	4,14	4,7	0,88

Tabela B.3 – Porosidade da partícula e fator de exclusão

Experimento	Coluna	Amostra	V_R (mL)	V_{NA} (mL)	ϵ_p	K_d
Poros 2	HiTrap TM Capto TM DEAE / 1 mL	BSA	0,87	0,22	0,51	-0,39
Poros 3	HiTrap TM Capto TM DEAE / 1 mL	Lisozima	1,04	0,39	0,51	0,12
Poros 5	HiTrap TM Capto TM Q / 1 mL	BSA	0,81	0,16	0,55	-0,53
Poros 6	HiTrap TM Capto TM Q / 1 mL	Lisozima	0,96	0,31	0,55	-0,11
Poros 8	HiTrap TM SP FF / 1 mL	BSA	0,99	0,34	0,66	-0,02
Poros 9	HiTrap TM SP FF / 1 mL	Lisozima	1,26	0,61	0,66	0,60
Poros 11	HiScreen TM Capto TM DEAE / 4,7 mL	BSA	2,24	1,59	0,69	-0,03
Poros 12	HiScreen TM Capto TM DEAE / 4,7 mL	Lisozima	3,15	2,5	0,69	0,40
Poros 14	HiScreen TM Capto TM Q / 4,7 mL	BSA	2,20	1,55	0,75	-0,04
Poros 15	HiScreen TM Capto TM Q / 4,7 mL	Lisozima	2,87	2,22	0,75	0,25
Poros 17	HiScreen TM SP FF / 4,7 mL	BSA	3,04	2,39	0,82	0,30
Poros 18	HiScreen TM SP FF / 4,7 mL	Lisozima	4,12	3,47	0,82	0,73

Os resultados apresentados na Tabela B.3 indicam em alguns casos um fator de exclusão negativo. Fisicamente o fator de exclusão unitário representaria que toda a porosidade da partícula é acessível àquela molécula (é o caso de moléculas de sal). Um fator de exclusão nulo representaria que nenhum poro da partícula é acessível àquela molécula. O resultado encontrado, com valores sem significado físico, corrobora a interpretação que as resinas utilizadas, de agarose altamente reticulada, possuem uma característica mais típica de gel do que de partículas porosas rígidas esféricas.

A modelagem matemática de colunas cromatográficas com resinas do tipo gel foi abordada por alguns autores (WIBLIN *et al.*, 1995) e pode ser representada através da modelagem proposta do Capítulo 3 através da consideração de uma transferência de massa "efetiva" das moléculas na fase líquida da coluna para a fase estacionária em equilíbrio com a molécula adsorvida na resina.

Adicionalmente, os resultados encontrados na Tabela B.2 também não estão de acordo com o esperado. Na literatura, resinas altamente reticuladas possuem valores de porosidade total acima de 0,90, o que não foi encontrado em nenhum dos experimentos. Por fim, seria de se esperar que a mesma resina apresentasse valores de porosidade da partícula e fator de exclusão iguais independente do tamanho da coluna (o que também não ocorreu experimentalmente).

Assim, pode-se afirmar que o experimento não foi bem sucedido e que a solução de nitrato de sódio não é eficiente para ser utilizada na determinação da porosidade das resinas.

A fim de contornar este problema, os valores de porosidade da partícula e da coluna foram estimados a partir de dados da curva de eluição das moléculas não ligadas, i.e., BSA na resina catiônica e lisozima nas resinas aniônicas. O ajuste foi realizado de tal forma que a porosidade do leito fosse variável com a coluna, porém a porosidade da partícula fosse a mesma independente do tamanho da coluna.

Assumiu-se para a estimação uma busca dentre valores médios da literatura. Schulte e Epping (2005) apontam que a porosidade da partícula varia na faixa de 0,50 a 0,90 e a porosidade total varia na faixa de 0,65 a 0,80.

Os valores finais utilizados podem ser encontrados na Tabela B.4.

Tabela B.4 – Porosidade da partícula e fator de exclusão

Coluna	Proteína	ε_t	ε_b	ε_p	K_d
HiTrap TM Capto TM DEAE /1 mL	BSA	0,8272	0,37	0,7257	0,5957
HiTrap TM Capto TM DEAE /1 mL	Lisozima	0,8272	0,37	0,7257	0,6702
HiTrap TM Capto TM Q / 1 mL	BSA	0,8691	0,37	0,7922	0,9457
HiTrap TM Capto TM Q / 1 mL	Lisozima	0,8691	0,37	0,7922	0,4934
HiTrap TM SP FF / 1 mL	BSA	0,9326	0,37	0,893	0,8399
HiTrap TM SP FF / 1 mL	Lisozima	0,9326	0,37	0,893	0,9148
HiScreen TM Capto TM DEAE /4,7 mL	BSA	0,8052	0,29	0,7257	0,595
HiScreen TM Capto TM DEAE /4,7 mL	Lisozima	0,8052	0,29	0,7257	0,2233
HiScreen TM Capto TM Q / 4,7 mL	BSA	0,8525	0,29	0,7922	0,3014
HiScreen TM Capto TM Q / 4,7 mL	Lisozima	0,8525	0,29	0,7922	0,5391
HiScreen TM SP FF / 4,7 mL	BSA	0,9369	0,41	0,893	0,5375
HiScreen TM SP FF / 4,7 mL	Lisozima	0,9369	0,41	0,893	1,0000

APENDICE C

Validação das rotinas computacionais para estimação de parâmetros de modelos termodinâmicos

A fim de validar a rotina computacional para a estimação de parâmetros de modelos termodinâmicos para sistemas contendo biomoléculas, foi adotada a metodologia presente em Agena e colaboradores (1997). Cabe ressaltar que se trata da validação da rotina como um todo, uma vez que cada modelo de G^E e método de otimização implementado foi validado individualmente com dados da literatura de referência do modelo.

O modelo termodinâmico empregado é o modelo UNIQUAC original com escala simétrica para solventes e assimétrica para as biomoléculas.

Os autores propuseram a análise de dados experimentais de pressão osmótica convertidos para coeficiente de atividade através de uma expansão virial (WILLS *et al.*, 1993). Dessa forma o coeficiente de atividade é calculado utilizando o modelo UNIQUAC (após a realização de uma estimação de parâmetros) e comparado diretamente com o coeficiente de atividade “experimental”.

A modelagem é realizada com a representação de sal e solvente como um pseudossolvente de tal forma que os sistemas analisados sejam binários formados por um soluto (proteína) e um pseudossolvente. É importante ressaltar que para sistemas diferentes o parâmetro energético de interação u_{ij} , proteína-proteína é o mesmo quando

o pH e a temperatura dos sistemas são os mesmos.

C.1 Sistemas analisados

Em Agena e colaboradores (1997) foram analisados dados da literatura de quatro diferentes proteínas, em soluções de quatro tipos distintos de sais, concentração de proteína até 63 g/L, várias concentrações salinas e pH. Desses sistemas, foram selecionados para comparação da metodologia os dados presentes em Haynes e colaboradores (1992) referentes a medidas de pressão osmótica de soluções contendo α -quimotripsina totalizando sete sistemas distintos. Os dados dos sistemas estudados são sumarizados na Tabela C.1 e podem ser encontrados com mais detalhes no Apêndice D.

Tabela C.1 – Sistemas analisados - α -quimotripsina

Sistema	Temperatura	Faixa de concentração (g/L)	pH	Sal, tampão	Número de pontos experimentais
1	25°C	0,9 - 40	3	K ₂ SO ₄ , 0,03M *	9
2	25°C	0,9 - 40	3	K ₂ SO ₄ , 0,15M	9
3	25°C	0,9 - 40	3	K ₂ SO ₄ , 0,3M	9
4	25°C	0,9 - 40	5	K ₂ SO ₄ , 0,1M	6
5	25°C	0,9 - 9	12	K ₂ SO ₄ , 0,1M	6
6	25°C	0,9 - 9	5	Na ₃ PO ₄ , 0,1M	5
7	25°C	0,9 - 9	8,25	Na ₃ PO ₄ , 0,1M	6

*No artigo é indicada uma concentração de 0,05M porém os dados em Haynes *et al.* (1992) são a 0,03M.

Fonte: Agena *et al.* (1997)

C.2 Dados de entrada

Para o cálculo dos parâmetros de forma e volume (r , q) do modelo UNIQUAC, Agena e colaboradores (1997) desenvolveram a correlação apresentada nas Equações C.1 e C.2.

$$q_i = 0,0273MM_c \quad (C.1)$$

$$r_i = 0,0362MM_c \quad (C.2)$$

Onde: MM_c é massa molar da espécie em sua forma cristalina.

A massa molar considerada para a α -quimiotripsina foi de 24500g/mol e o volume específico foi de 0,736 cm³/g.

Os valores dos parâmetros da expansão virial de cada sistema estão indicados na Tabela C.2.

Tabela C.2 – Parâmetros dos modelos – resultados de Avena e colaboradores (1997)

Sistema	B_2 [(m ³ /mol)]	B_3 [(m ³ /mol) ²]	B_4 [(m ³ /mol) ³]	R^2
1	0,0022	0,0958	-	0,98
2	-0,4776	0,2234	-	0,98
3	-0,649	0,658	-0,2178	0,98
4	0,048	-0,2745	-	0,91
5	-0,7118	-	-	1,00
6	-0,2737	-	-	0,98
7	0,1995	-0,4547	-	0,94

Fonte: Avena *et al.* (1997)

Para os pseudossolventes foram adotadas as propriedades da água pura e os dados podem ser encontrados nas Tabelas 4.8 e 4.9.

C.3 Resultados

Inicialmente, utilizando os dados experimentais de Haynes e colaboradores (1992), realizou-se uma reestimação dos coeficientes viriais dos sistemas acima descritos para validar a metodologia. Na Tabela C.3 encontram-se os parâmetros da expansão do virial estimados. Foram encontrados valores similares aos de Avena e

colaboradores (1997) com valores de R^2 compatíveis.

Tabela C.3 – Parâmetros dos modelos – calculados neste trabalho

Sistema	B_2 [(m ³ /mol)]	B_3 [(m ³ /mol) ²]	R^2
1	-0,0479	0,1237	1,0000
2	-0,3714	0,1612	1,0000
3	-0,2162	0,08199	0,9998
4	-2,2055	4,7797	0,9945
5	-2,1023	0,9623	0,9978
6	-0,1128	-0,4916	1,0000
7	-0,3576	-0,0346	0,9999

Em seguida, a fim de validar a rotina computacional desenvolvida, os sistemas 1 a 7 tiveram os coeficientes de atividade calculados pelo modelo UNIQUAC original utilizando os parâmetros u_{ij} de interação energética presentes em Avena e colaboradores (1997).

Conforme pode ser visto na Tabela C.4, com os parâmetros u_{ij} reportados no artigo original o resultado calculado não fornece o mesmo desvio encontrado pelos autores. Acredita-se que esta diferença deve-se à unidade dos parâmetros reportada como (1/K). Não se sabe se os autores realmente usaram o modelo UNIQUAC original ou o modelo com os parâmetros energéticos modificados¹.

¹ Um dos coautores do artigo é o Prof. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, orientador desta pesquisa de doutorado. Ele desconfia que os parâmetros utilizados por Avena não tenham sido do modelo UNIQUAC original como reportado, uma vez que as rotinas computacionais que ela tinha não eram do UNIQUAC original. Devido a isso, a rotina computacional desta pesquisa foi considerada validada ao conseguir representar os mesmos sistemas com desvios equivalentes aos reportados, embora com parâmetros distintos.

Tabela C.4 – Resultados com parâmetros u_{ij} de Agena e colaboradores (1997)

Sistema	$u_{PSi/PSi}$ (1/K)	$u_{PSi/proteína}$ (1/K)	$u_{proteína/proteína}$ (1/K)	RMSD - artigo (%)	RMSD – este trabalho (%)
1	670,117	330,113	-102,052	0,08	8421
2	766,012	398,105	-102,052	0,31	8072
3	825,842	439,421	-102,052	1,65	4706
4	379,094	118,679	-127,334	0,07	102
5	404,658	156,541	-93,01	0,14	29
6	394,952	130,132	-127,334	0,05	146
7	-2717,82	-2820,68	-2488,63	0,19	174

Estimando os parâmetros u_{ij} dos sistemas 1 a 7 tendo utilizado os mesmos coeficientes viriais reportados no artigo original, obteve-se os resultados presentes na Tabela C.5. Verifica-se que os desvios são compatíveis com os resultados originais, embora os parâmetros sejam distintos. Na mesma tabela, encontram-se os resultados da estimação dos parâmetros u_{ij} utilizando os coeficientes viriais previamente estimados (reportados na Tabela C.3). Esses resultados foram obtidos utilizando o método de otimização Sublex que se mostrou menos dependente da estimativa inicial que o método Simplex e forneceu melhores resultados que os demais métodos de otimização.²

De forma geral, os desvios encontrados pelo modelo encontram-se dentro do erro experimental médio (2%). Entretanto, alguns resultados apresentam desvios altos em relação ao erro experimental. Os dois sistemas que apresentam tais desvios possuem o parâmetro $u_{proteína/proteína}$ fixo. Isso porque se considerou que em sistemas com o mesmo pH o parâmetro de interação proteína/proteína deveria ser o mesmo. O procedimento adotado para estimação desses parâmetros foi inicialmente realizar a estimação de três parâmetros de cada sistema independentemente um do outro. Em seguida, o parâmetro $u_{proteína/proteína}$ do sistema que apresentou menor desvio foi adotado como parâmetro correto e foi realizada uma nova estimação de apenas dois parâmetros de cada sistema. Os elevados desvios podem ser decorrentes de uma estimativa inicial

² Uma análise mais detalhada dos resultados encontrados com os diferentes métodos de otimização pode ser encontrada no Apêndice F.

ruim para o método de otimização ou ainda devido a uma má escolha do parâmetro de interação $u_{proteina/proteina}$.

Tabela C.5 – Resultados com parâmetros u_{ij} estimados

Sistema	$u_{PSi/PSi}$ (cal/mol)	$u_{PSi/proteina}$ (cal/mol)	$u_{proteina/proteina}$ (cal/mol)	RMSD (%)
1	-156,534	-325,171	22,965	0,05
2	1625,966	944,158	22,965	0,24
3	1123,596	597,853	22,965	21,01
4	1210,520	719,059	-227,598	0,43
5	437,384	97,078	-75,848	0,002
6	369,969	126,427	-227,598	0,21
7	-1379,734	-1874,186	-2368,635	0,87
1*	-377,491	-546,130	-198,520	0,05
2*	1354,242	688,151	-198,520	0,76
3*	827,535	324,984	-198,520	1,80
4*	2183,257	1255,807	-185,754	0,08
5*	790,664	353,540	-89,139	1,42
6*	1927,148	1080,121	-185,754	8,18
7*	797,386	340,505	-85,102	0,14

*Parâmetros encontrados utilizando os coeficientes viriais previamente estimados reportados na Tabela C.4.

A Figura C.1 traz o coeficiente de atividade experimental e calculado para os sete sistemas analisados. As linhas representam o coeficiente de atividade calculado e os símbolos o coeficiente de atividade experimental.

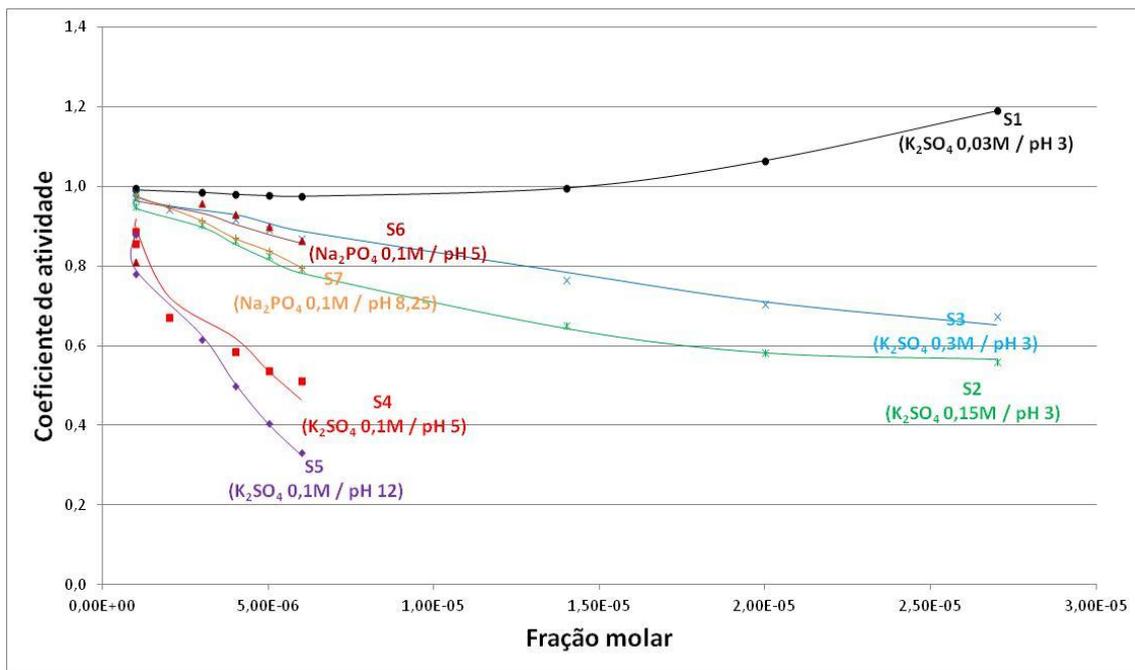


Figura C.1 – Coeficiente de atividade da α -quimotripsina nos diferentes sistemas analisados. Os símbolos representam os pontos experimentais e as linhas representam os resultados calculados.

C.4 Conclusões

A rotina computacional foi considerada validada tendo funcionado adequadamente para reproduzir o artigo de Avena e colaboradores (1997).

APENDICE D

Sistemas para estudos do comportamento termodinâmico

A seguir são apresentados os dados completos obtidos na literatura e alguns cálculos realizados dos sistemas utilizados para estudo do comportamento termodinâmico de soluções contendo biomoléculas.

Tabela D.1 – Dados de Haynes e colaboradores (1992) - α -quimiotripsina em solução aquosa de K_2SO_4

Sistema	C sal (M)	pH	C_{PTN} (g/L)	Pi (mmH ₂ O)	Gama molal
1	0,03	3	0,904	8,15	0,9989591
			1,808	16,45	0,9982151
			3,615	32,55	0,9976154
			5,423	48,30	0,9981981
			7,231	64,85	0,999966
			9,039	83,17	1,0029254
			19,610	184,00	1,0449078
			29,410	289,90	1,1254099
			39,220	419,10	1,2552403
2	0,15	3	0,904	8,55	0,9674062
			1,808	16,63	0,9366502
			3,615	31,65	0,8802543
			5,423	45,60	0,8299697
			7,231	59,95	0,7851544
			9,039	73,45	0,7452237
			19,610	143,80	0,5868759
			29,410	210,70	0,5203614
			39,220	285,00	0,5085638

Tabela D.1 – Continuação

Sistema	C sal (M)	pH	C _{PTN} (g/L)	Pi (mmH ₂ O)	Gama molal
3	0,30	3	0,900	8,10	0,9580532
			1,790	16,05	0,9203063
			3,584	31,35	0,8542865
			5,384	44,60	0,7998516
			7,187	57,25	0,7554861
			8,963	69,15	0,7204278
			19,610	144,40	0,6493044
			29,410	214,70	0,7761173
4	0,1	5	39,220	282,30	1,2071445
			0,903	7,15	1,0010377
			1,192	13,75	1,0012321
			3,535	26,80	1,0003422
			5,297	39,85	0,9967883
			6,961	51,70	0,991183
5	0,1	12	8,695	63,35	0,9830582
			0,944	7,35	0,9561555
			1,836	13,60	0,9165716
			3,710	23,90	0,8388914
			5,416	31,65	0,7741589
6	0,1	5	7,221	34,40	0,7113328
			9,042	37,60	0,653338
			1,835	15,20	0,9645311
			3,615	29,60	0,9314534
			5,423	43,50	0,8991387
7	0,1	8,25	7,231	57,10	0,8680639
			9,039	69,50	0,838178
			0,957	7,75	1,0101575
			2,209	17,10	1,0216082
			3,637	27,60	1,032039
			5,677	42,55	1,0419155
8	1	7,4	7,209	52,50	1,0453541
			9,366	66,50	1,0443399
			101,100	731,00	1,051929

Tabela D.2 – Dados de Wu e Prausnitz (1999) - BSA em solução aquosa de NaCl

Sistema	C sal (M)	pH	C _{PTN} (g/L)	Pi (mmH ₂ O)	Gama molal
8	1	7,4	19,500	85,00	0,830188
			44,600	224,00	0,749872
			55,800	282,00	0,753362
			84,500	515,00	0,877787
			101,100	731,00	1,051929

Tabela D.2 – Continuação

Sistema	C sal (M)	pH	C _{PTN} (g/L)	Pi (mmH ₂ O)	Gama molal
9	3	7,4	15,000	50,00	0,859448
			25,000	89,00	0,801181
			38,400	143,00	0,757946
			50,300	202,00	0,748751
			65,300	275,00	0,774867
10	5	7,4	33,400	127,00	0,769808
			68,900	283,00	0,787735
			100,100	435,00	1,038527
			133,500	615,00	1,820813
			150,000	892,00	2,659161
11	1	4,5	12,200	30,00	0,553612
			25,500	61,00	0,376708
			38,600	114,00	0,335961
			44,300	157,00	0,346961
			61,700	240,00	0,52073
12	3	5,4	34,500	93,00	0,695885
			55,200	175,00	0,641933
			73,500	295,00	0,651066
			89,800	393,50	0,70538
			93,500	405,00	0,724721
			122,800	692,00	1,008067
13	5	5,4	30,100	67,00	0,717351
			49,500	100,00	0,649671
			58,900	154,00	0,639618
			77,300	240,00	0,659579
			99,100	430,00	0,759731

Tabela D.3 – Dados de Yousef e colaboradores (2001) - ovoalbumina em solução aquosa de NaCl

Sistema	C sal (M)	pH	C _{PTN} (g/L)	Pi (psi)	Gama molal
14	0,01	7,000	52,200	1,10	0,930386913
			101,500	3,40	1,166785771
			155,600	7,70	2,07920782
			200,400	12,10	4,354532813
			247,200	17,90	12,13134901
			248,600	18,10	12,55871423
			273,700	22,40	24,29544144
			321,300	30,10	104,1033342
			356,200	35,70	358,430544
			358,700	36,60	393,7839953
			393,900	44,60	1601,009814
			441,000	59,50	13138,79365
			477,000	67,80	78298,98701
501,500	83,00	287883,0528			

Tabela D.3 – Continuação

Sistema	C sal (M)	pH	C _{PTN} (g/L)	Pi (psi)	Gama molal
15	0,15	7,000	20,400	0,20	0,935770703
			39,600	0,40	0,919331065
			51,100	0,50	0,92872463
			54,500	0,60	0,934302194
			102,000	1,50	1,171183417
			139,000	2,10	1,678788649
			190,300	3,90	3,610803549
			244,700	6,10	11,41059277
			268,300	8,30	20,94839112
			314,900	10,70	84,28632415
			336,360	14,20	174,3917798
			348,600	15,80	270,5042323
			379,100	21,70	872,0906207
			381,300	24,20	952,9525945
			406,500	25,10	2740,525849
			446,200	36,00	16843,58465
			452,300	41,00	22633,25835
			497,300	51,00	229139,7766
521,500	56,60	878149,3575			
527,700	58,30	1252766,929			
16	0,5	7,000	51,600	0,60	0,929463431
			105,800	1,50	1,206311434
			154,600	2,70	2,050702197
			191,300	3,90	3,676414437
			228,500	6,00	7,810501358
			247,600	6,40	12,25165883
			262,100	7,50	17,74509132
			310,500	10,00	73,10094834
			354,900	16,00	341,4190218
			410,600	23,14	3277,516622
			418,000	26,40	4549,663877
			461,500	33,50	35634,1255
464,100	33,80	40584,29177			

Tabela D.4 – Dados de Moon e colaboradores (2000b) - Lisozima em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Sistema	C sal (M)	pH	C_{PTN} (g/L)	Pi (psi)	Gama molal
17	1,00	4,00	4,12	4,50	1,061659
			6,31	6,80	1,07775
			8,31	8,90	1,081608
			10,36	11,20	1,074699
			12,47	13,20	1,056327
			14,46	15,30	1,029054
			16,49	17,40	0,992089
			18,56	19,60	0,945974
			20,71	21,50	0,890491
18	1,00	7,00	4,06	4,45	1,064299
			6,19	6,75	1,079358
			8,19	8,85	1,080766
			10,25	11,00	1,069455
			12,30	13,10	1,046086
			14,35	15,20	1,010476
			16,42	17,25	0,966085
			18,42	19,23	0,914295
			20,39	21,10	0,854165
19	1,00	8,00	4,06	4,40	0,994561
			6,13	6,50	0,991672
			8,18	8,65	0,988936
			10,42	10,75	0,986096
			12,26	12,55	0,983247
			14,26	14,55	0,980376
			16,31	16,30	0,977455
			18,38	18,35	0,974611
			20,44	20,15	0,971791
20	3,00	4,00	4,39	4,67	0,994237
			6,71	7,10	0,991208
			8,89	9,15	0,988262
			11,11	11,30	0,985264
			13,30	13,20	0,982311
			15,54	15,40	0,97932
			17,70	17,05	0,976348
			19,82	18,90	0,973325
			22,00	20,65	0,970438
21	3,00	7,00	4,30	4,63	0,978332
			6,53	6,90	0,967775
			8,68	8,90	0,957636
			10,85	10,90	0,946907
			12,97	12,75	0,938361
			15,10	14,70	0,92934
			17,20	16,55	0,920375
			19,32	18,30	0,911606
			21,33	20,17	0,903156
22	3,00	8,00	4,32	4,60	0,976988
			6,54	6,80	0,965722
			8,88	9,00	0,954244
			10,99	11,10	0,944234
			13,12	13,05	0,934448
			15,28	14,70	0,924844
			17,45	16,30	0,915511
			19,54	18,20	0,906814
			21,56	19,75	0,898675

Tabela D.5 – Dados de Lu e colaboradores (2009) - BSA em solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Sistema	C sal (M)	pH	C_{PTN} (g/L)	Pi (psi)	Gama molal
23	0,15	4,500	8,300	30,00	0,9015
			15,800	55,00	0,8340
			26,500	90,00	0,7662
			40,900	150,00	0,7177
			50,100	165,00	0,7087
			59,400	198,00	0,7161
24	0,15	4,800	8,700	32,00	0,8858
			13,500	53,00	0,8350
			26,700	97,00	0,7305
			38,300	135,00	0,6724
			50,000	165,00	0,6393
			55,300	187,00	0,6317
25	0,15	5,400	8,100	30,00	0,9184
			15,200	58,00	0,8624
			28,300	112,00	0,7900
			41,700	143,00	0,7505
			55,500	201,00	0,7412
			59,800	214,00	0,7446
26	0,15	7,400	7,800	29,00	0,9368
			15,500	55,00	0,8902
			28,300	98,00	0,8422
			42,700	157,00	0,8267
			55,400	210,00	0,8453
			63,000	228,00	0,8715
27	0,5	4,500	8,500	32,00	0,8994
			13,600	49,00	0,8519
			25,500	90,00	0,7713
			36,000	125,00	0,7292
			44,200	160,00	0,7126
			52,700	200,00	0,7091
28	0,5	4,800	8,200	30,00	0,8915
			13,000	48,00	0,8399
			26,300	90,00	0,7330
			38,600	135,00	0,6713
			48,700	170,00	0,6418
			56,500	198,00	0,6306

Tabela D.5 – Continuação

Sistema	C sal (M)	pH	C _{PTN} (g/L)	Pi (psi)	Gama molal
29	0,5	5,400	8,700	33,00	0,9132
			14,200	53,00	0,8695
			27,400	105,00	0,7939
			40,400	149,00	0,7530
			52,500	197,00	0,7406
			60,000	220,00	0,7448
30	0,5	7,400	9,500	35,00	0,9253
			13,800	50,00	0,8993
			29,200	108,00	0,8400
			41,700	156,00	0,8265
			54,400	217,00	0,8427
			67,200	272,00	0,8913
31	1	4,500	8,600	29,00	0,8984
			13,600	47,00	0,8519
			27,300	90,00	0,7623
			37,700	127,00	0,7247
			48,200	170,00	0,7092
			57,700	195,00	0,7135
32	1	4,800	8,100	26,00	0,8927
			14,300	45,00	0,8272
			25,300	78,00	0,7394
			36,100	104,00	0,6814
			42,900	125,00	0,6566
			50,500	140,00	0,6384
33	1	5,400	8,900	33,00	0,9114
			14,300	49,00	0,8688
			29,600	105,00	0,7848
			41,300	142,00	0,7512
			54,400	198,00	0,7408
			61,300	220,00	0,7465
34	1	7,400	8,200	34,00	0,9340
			14,200	50,00	0,8971
			29,900	117,00	0,8385
			40,500	148,00	0,8266
			53,000	203,00	0,8394
			65,100	240,00	0,8809

Tabela D.5 – Continuação

Sistema	C sal (M)	pH	C_{PTN} (g/L)	Pi (psi)	Gama molal
35	1,5	4,500	10,100	35,00	0,8836
			18,100	57,00	0,8168
			22,300	72,00	0,7892
			33,500	104,00	0,7371
			42,000	120,00	0,7157
			50,100	140,00	0,7087
36	1,5	4,800	9,600	32,00	0,8757
			14,700	48,00	0,8235
			24,600	75,00	0,7441
			31,800	86,00	0,7015
			41,000	100,00	0,6627
			45,300	113,00	0,6498
37	1,5	5,400	8,700	34,00	0,9132
			14,000	49,00	0,8710
			26,100	89,00	0,7997
			38,300	133,00	0,7576
			46,300	158,00	0,7440
			54,100	171,00	0,7408
38	1,5	7,400	8,500	36,00	0,9320
			13,300	51,00	0,9021
			27,300	95,00	0,8447
			37,600	125,00	0,8277

APENDICE E

Estudo de modificações de modelos de energia livre de Gibbs em excesso (G^E) para o cálculo do equilíbrio de sistemas contendo proteínas

Este apêndice apresenta os estudos realizados com modelos de energia livre de Gibbs em excesso para verificação de sua adequação na modelagem de dados de equilíbrio termodinâmico de proteínas. A partir dos resultados encontrados, optou-se no decorrer da pesquisa de tese pela utilização do modelo UNIQUAC com termo de longo alcance de Debye-Huckel para modelagem do coeficiente de atividade das espécies iônicas, e modelo UNIQUAC original para modelagem do coeficiente de atividade das proteínas.

E.1 Introdução

Na literatura, a discussão sobre os modelos para G^E costuma supor que sua expressão geral possa ser obtida da soma de diferentes termos. Cada termo corresponde à contribuição de um tipo de força entre as espécies, sendo no total cinco tipos. O primeiro termo são forças de longo alcance (LA) correspondente às interações eletrostáticas de longo alcance (G_l^E). O segundo, o terceiro e o quarto termos são forças de curto e médio alcance (CA e MA) onde, o segundo tipo corresponde às interações

das espécies não iônicas (G_{II}^E); o terceiro tipo corresponde às interações de curto alcance entre espécies iônicas (G_{III}^E); o quarto tipo corresponde às interações entre as espécies iônicas e não iônicas (G_{IV}^E). A quinta contribuição corresponde à variação da constante dielétrica com a concentração das espécies iônicas (G_V^E).

Somando cada um dos termos de contribuição, a energia livre de Gibbs em excesso pode ser representada pela Equação E.1.

$$G^E = G_I^E + G_{II}^E + G_{III}^E + G_{IV}^E + G_V^E \quad (E.1)$$

As contribuições de curto e médio alcance incluem as interações entre todas as espécies químicas. O modelo UNIQUAC (UNIversal QUAsi Chemical) possui vantagens na representação dessas contribuições (G_{II}^E e G_{IV}^E) devido aos seguintes aspectos (PESSOA, 2011):

- i. são aplicados para soluções contendo moléculas pequenas ou grandes (biomoléculas podem ser modeladas, portanto), pois a variável primária de concentração é a fração de superfície;
- ii. utilizam a escala de fração molar, podendo ser aplicado a soluções de alta concentração no soluto;
- iii. têm como base o conceito de composição local;
- iv. são algebricamente simples o suficiente para serem estendidos para sistema com características de sistemas contendo eletrólitos (sais em solução como ocorre nas correntes das operações unitárias de separação de biomoléculas);
- v. os parâmetros do modelo UNIQUAC têm, normalmente, uma fraca dependência de temperatura e apenas parâmetros de interação binária são empregados reduzindo o número de parâmetros que precisam ser obtidos;
- vi. têm uma grande aceitação industrial (apesar de ainda não ser aplicado na indústria de bioprocessos, em outras áreas industriais é bastante utilizado).

A contribuição do tipo cinco (G_V^E), algumas vezes é representada por modificações do modelo de Debye e McAulay (1925) que tem a forma da Equação E.2.

$$G_V^E = \frac{e^2 N_A}{2} \left(\frac{1}{\varepsilon} - \frac{1}{\varepsilon_s} \right) \sum_i^N \frac{n_i z_i^2}{r_i} \quad (\text{E.2})$$

Onde: n_i é o número de mols do componente i ; r_i é o raio efetivo do íon i ; ε_s é a constante dielétrica do solvente; ε é a constante dielétrica da solução.

A expressão E.2 representa modificações na constante dielétrica do solvente devido à presença de um solvente orgânico. Tal termo precisaria ser incluído na modelagem de sistemas contendo biomoléculas apenas se houvesse solventes orgânicos no sistema. Uma vez que os sistemas estudados nesta pesquisa não incluíram solventes orgânicos, a contribuição do tipo cinco não foi considerada.

Também existem expressões onde a força iônica da solução é geradora de modificação da constante dielétrica do solvente. Em sistemas contendo proteínas, tais expressões poderiam ter maior representatividade. Apesar disso, a contribuição do tipo cinco não foi explorada por nenhum autor em sistemas contendo biomoléculas.

Já para representar as contribuições do tipo G_I^E , utiliza-se amplamente para soluções com eletrólitos uma extensão do modelo proposto por Debye e Hückel (1923).

O modelo Debye-Hückel foi desenvolvido considerando os íons como esferas rígidas contendo cargas localizadas em seus centros em um meio de solvente simples contínuo e de constante dielétrica ε . A expressão para o coeficiente de atividade de uma espécie iônica i é dada na Equação E.3.

$$\ln \gamma^{DH} = -A \frac{|z_+ z_-| I^{1/2}}{1 + dI^{1/2}} \quad (\text{E.3})$$

$$A = \frac{1}{\ln(10)} \left[\frac{e}{(\varepsilon k T)^{0.5}} \right]^3 \left(\frac{2\pi d_o N_A}{1000} \right)^{0.5}$$

Onde: z_+ , z_- são as cargas iônicas do eletrólito (valência); d é o diâmetro dos íons; N_A é o número de Avogrado; e é a carga do elétron; T é a temperatura do sistema; k é a constante de Boltzmann; d_o é a densidade do solvente puro; ε é a constante dielétrica do

solvente; I é a força iônica da solução dada pela Equação E.4 sendo m_i a concentração do íon i expressa em molalidade.

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{NI} z_i^2 \cdot m_i \quad (\text{E.4})$$

Em soluções bem diluídas (concentrações iônicas até 0,001 molal) o termo $dI^{1/2}$ na Equação E.3 pode ser desprezado pois tem um valor muito pequeno. Para este caso, a equação se torna a conhecida lei limite de Debye-Hückel.

Em 1973, Pitzer propôs uma modificação do modelo DH ao considerar efeitos cinéticos do centro rígido do eletrólito dando origem ao modelo conhecido como Pitzer-Debye-Hückel (PDH) apresentado na Equação E.5.

$$G_i^E = I \frac{4A}{3B} \ln(1 + BI^{1/2}) \quad (\text{E.5})$$

Onde: $B = 1,2 \text{ (kg/mol)}^{1/2}$ para todos os eletrólitos em água.

Guggenheim (1935) estendeu o modelo de Debye-Hückel levando em conta o princípio de Brønsted de interações específicas passando a também representar o termo G_{III}^E .

Adicionalmente, baseado nos trabalhos anteriores de Guggenheim (1935) e Scarchard e colaboradores (1970), foi proposto um termo que considera as interações de curto alcance entre espécies iônicas na solução duas a duas e três a três, na forma da Equação E.6.

$$G_{III}^E = \sum_{ij} \beta_{ij}(I) m_i m_j + \sum_{ijk} \mu_{ijk} m_i m_j m_k \quad (\text{E.6})$$

Onde: β é o segundo coeficiente virial e depende da força iônica; m é a molalidade do eletrólito; μ_{ijk} é um parâmetro independente da força iônica que não é anulado quando as espécies iônicas tem o mesmo sinal.

Para modelagem de soluções contendo aminoácidos, os modelos NRTL, UNIQUAC e UNIFAC já foram associados ao modelo Debye-Hückel com bons resultados (CHEN *et al.*, 1989); (PINHO *et al.*, 1994); (KURAMOCHI *et al.*, 1997). Apenas um autor utilizou essa contribuição em sistemas contendo proteínas (COUTINHO e PESSOA, 2004). Para outros sistemas eletrolíticos, entretanto, este termo já foi empregado inúmeras vezes associados aos modelos NRTL, UNIQUAC e UNIFAC (por exemplo, (SANDER *et al.*, 1986); (MACEDO *et al.*, 1990); (PESSOA e RASMUSSEN, 1992)).

Em 1986, Sander e colaboradores propuseram o Modelo UNIQUAC Estendido para Eletrólitos (EUNI) através da simples soma do coeficiente de atividade do modelo UNIQUAC com o coeficiente de atividade do modelo Debye-Hückel original (SANDER *et al.*, 1986). Propôs-se também uma modificação no termo residual do modelo UNIQUAC de tal forma que este passasse a ser dependente tanto da concentração quanto da temperatura.

Macedo e colaboradores (1990) modificaram o modelo EUNI através da inclusão do termo Debye-Hückel modificado por Cardoso (1988).

Pessoa (1992) propôs a validade do princípio de Brønsted, ou seja, que íons de mesmo sinal estão longe o suficiente para só terem forças de longo alcance e com isso os valores dos parâmetros do modelo UNIQUAC para íons de mesmo sinal tornar-se-iam iguais a zero, dando origem ao modelo Revisado UNIQUAC Estendido para Eletrólitos (REUNI).

Outras modificações foram ainda propostas ao modelo UNIQUAC, contudo não serão mencionadas neste texto.

E.2 Objetivos

O objetivo deste apêndice é apresentar uma avaliação do desempenho de diferentes modelos de energia livre de Gibbs em excesso na correlação de dados experimentais de pressão osmótica de proteínas em soluções aquosas.

Foram estudadas modificações do modelo UNIQUAC para o cálculo do

coeficiente de atividade das proteínas.

O termo de longo alcance quando utilizado foi o termo de Debye-Huckel modificado por Cardoso (1988).

Foram avaliados os termos combinatoriais dos modelos: UNIQUAC original, Flory-Huggin, Flory-Huggins_Volume Livre e um termo de médio alcance.

Os modelos estudados serão brevemente descritos a seguir.

E.3 Modelos termodinâmicos

E.3.1 Modelo de Debye-Hückel modificado por Cardoso (1988)

O modelo de Debye-Hückel foi desenvolvido originalmente em 1923 (DEBYE e HUCKEL, 1923) a partir da hipótese fundamental que a não idealidade de soluções eletrolíticas poderia ser separada em contribuições independentemente calculadas (ALVES, 2008a). Assim, são calculadas as interações coulômbicas derivadas da interação solvente-íon e íon-íon, que são interações de longo alcance diferentes das forças de van der Waals que ocorrem entre espécies neutras. Tais interações de longo alcance levam a desvios do comportamento ideal inclusive em soluções diluídas. Os resultados originais são exatos somente no limite da diluição infinita (força iônica menor que 0,001 molal).

Ao longo dos anos, diversos autores ampliaram a aplicabilidade da equação de Debye-Hückel (ZEMAITIS *et al.*, 1986).

Apesar da larga aplicação dos modelos derivados de Debye-Hückel (DH), é possível encontrar uma inconsistência termodinâmica, usualmente despercebida. Isso acontece quando a expressão de DH, originalmente derivada com base na escala McMillan-Mayer (EMM), é adicionada a um modelo de composição local derivado na escala Lewis-Randall (ELR), por exemplo, os modelos UNIQUAC e UNIFAC. Dessa forma, o modelo tradicional de Debye-Hückel não pode simplesmente ser somado como um termo do modelo de energia livre de Gibbs.

Cardoso e O'Connell (1987) apresentaram a formulação matemática para conversão das quantidades termodinâmicas entre as escalas EMM e ELR. O modelo

corrigido com conversão das quantidades termodinâmicas entre as escalas McMillan-Mayer e Lewis-Randall é da forma da Equação E.7 para o solvente e Equação E.8 para as espécies químicas na escala assimétrica.

$$\ln(\gamma_n^{DH}) = \frac{2A}{B^3} MM_n \frac{\rho_s}{\rho_n} g_1(BI^{1/2}) \quad (E.7)$$

$$\ln(\gamma_i^*)^{DH} = -z_i^2 A \frac{\sqrt{I}}{1 + B\sqrt{I}} \quad (E.8)$$

Onde: n representa o solvente, i representa as espécies iônicas; s representa a mistura de solventes; MM_i é a massa molar da espécie química i ; z_i é a valência da espécie iônica; I é a força iônica dada pela Equação E.9 da espécie iônica; os termos g , A , B são dados respectivamente pelas Equações E.11, E.12 e E.13; n_i é o número de mols da espécie química i ; NI é o número de íons; NS é o número de solventes.

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{NI} m_i z_i^2 \quad (E.9)$$

$$m_i = \frac{n_i}{\sum_{j=1}^{NS} n_j MM_j} \quad (E.10)$$

$$g_1(x) = 1 + x - \frac{1}{1+x} - 2\ln(1+x) \quad (E.11)$$

$$A = \frac{1,327757 * 10^5 (\rho_s)^{1/2}}{(\epsilon T)^{3/2}} \quad (E.12)$$

$$B = \frac{6,359696 (\rho_s)^{1/2}}{(\epsilon T)^{1/2}} \quad (E.13)$$

Para o cálculo da densidade molar da mistura de solvente é usada Equação E.14.

$$\rho_s = \frac{1}{\sum_{m=1}^{NS} \frac{x'_m}{\rho'_m}} \quad (E.14)$$

Onde: x'_m é a fração molar de solvente m livre de sal na fase líquida; ρ'_m é a densidade do solvente m puro.

Para o cálculo da constante dielétrica ε da mistura de solventes é utilizada a regra de mistura de Oster, introduzida por Cardoso (1988) resultando na Equação E.15 para o caso de dois solventes.

$$\varepsilon = \varepsilon_2 + \frac{x_1'v_1}{x_1'v_1 + x_2'v_2} \left[\frac{(\varepsilon_1 - 1)(2\varepsilon_1 + 1)}{2\varepsilon_1} - (\varepsilon_1 - 1) \right] \quad (\text{E.15})$$

Onde: v é o volume molar da substância.

Para o cálculo do coeficiente de atividade das proteínas o valor de B utilizado foi o valor da Equação E.13 multiplicado por 10 conforme proposto em Coutinho e Pessoa (2004). Isso porque a constante B depende do tamanho dos íons. Íons inorgânicos (para os quais a expressão foi elaborada) possuem diâmetro de cerca de 4 Å, enquanto as proteínas tem diâmetro de cerca de 40 Å.

E.3.2 Modelo UNIQUAC

O modelo UNIQUAC foi desenvolvido originalmente por Abrams e Prausnitz (1975) a partir de uma extensão da teoria quase-química de Guggenheim (1935) para misturas não randômicas aplicada a soluções contendo moléculas de tamanho e forma diferentes. Nele a energia livre de Gibbs em excesso é modelada como uma composição de duas partes aditivas, uma combinatorial e outra residual.

A parte combinatorial ($G^{E(C)}$) corresponde a uma contribuição entrópica, que depende da composição, forma e tamanho das espécies, sendo necessários dados apenas das espécies puras. A contribuição residual ($G^{E(R)}$) contempla as forças intermoleculares responsáveis pela entalpia de mistura dependendo de parâmetros de interação binária ajustáveis. A forma geral do modelo UNIQUAC é, pois, dada pela Equação E.16, onde R é a constante universal dos gases e T é a temperatura.

$$\frac{G^E}{RT} = \frac{G^{E(C)}}{RT} + \frac{G^{E(R)}}{RT} \quad (\text{E.16})$$

A Equação E.17 apresenta o termo combinatorial do modelo UNIQUAC original.

$$\frac{G^{E(C)}}{RT} = \left[\sum_{i=1}^{nspec} x_i \ln \left(\frac{\phi_i}{x_i} \right) + \frac{z_i}{2} \sum_{i=1}^{nspec} q_i x_i \ln \left(\frac{\theta_i}{\phi_i} \right) \right] \quad (E.17)$$

Onde: z é o número de coordenação (considerado como igual a 10 para todas as espécies); ϕ_i é a fração de volume da espécie i calculada pela Equação E.18, θ_i é a fração de área superficial da espécie i calculada pela Equação E.19.

$$\phi_i = \frac{x_i r_i}{\sum_{k=1}^{nspec} x_k r_k} \quad (E.18)$$

$$\theta_i = \frac{x_i q_i}{\sum_{k=1}^{nspec} x_k q_k} \quad (E.19)$$

Onde: $nspec$ é o número das diferentes espécies presentes na solução; r_i é o volume de cada espécie i ; q_i é a área superficial de cada espécie i ; x_i é a fração molar da espécie i .

A Equação E.20 apresenta o termo residual.

$$\frac{G^{E(R)}}{RT} = - \sum_{i=1}^{nspec} x_i q_i \ln \left(\sum_{k=1}^{nspec} \theta_k \psi_{ki} \right) \quad (E.20)$$

Onde: ψ_{ik} é calculado pela Equação E.21 com $a_{ik} = u_{ik} - u_{kk}$; u_{ik} e u_{kk} são os parâmetros de energia de interação binária independentes da temperatura e da concentração, tal que $a_{ik} \neq a_{ki}$, e $u_{ik} = u_{ki}$.

$$\psi_{ik} = \exp \left(- \frac{a_{ik}}{T} \right) \quad (E.21)$$

Sabendo que é válida a Equação E.22, se expressa o coeficiente de atividade segundo o modelo UNIQUAC pela Equação E.23.

$$\ln \gamma_i = \left[\frac{\partial \left(nG^E / RT \right)}{\partial n_i} \right]_{P,T,n_j} \quad (\text{E.22})$$

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i^C + \ln \gamma_i^R \quad (\text{E.23})$$

Onde:

$$\ln \gamma_i^C = \ln \left(\frac{\phi_i}{x_i} \right) + 1 - \frac{\phi_i}{x_i} - \frac{z_i}{2} q_i \left[\ln \left(\frac{\phi_i}{\theta_i} \right) + 1 - \frac{\phi_i}{\theta_i} \right] \quad (\text{E.24})$$

$$\ln \gamma_i^R = q_i \left[1 - \ln \left(\sum_{j=1}^{nspec} \theta_j \psi_{ji} \right) - \sum_{j=1}^{nspec} \frac{\theta_j \psi_{ij}}{\sum_{k=1}^{nspec} \theta_k \psi_{kj}} \right] \quad (\text{E.25})$$

É usual o emprego da normalização assimétrica para o cálculo do coeficiente de atividade das espécies iônicas (tanto do sal quanto biomolécula) seguindo a Equação E.26. Dessa forma, a solução tende à solução ideal quando a concentração da espécie iônica tende à diluição infinita.

$$\ln(\gamma_i^*) = \ln(\gamma_i) - \ln(\gamma_i^\infty) \quad (\text{E.26})$$

Os termos combinatorial e residual do modelo UNIQUAC na escala assimétrica ficam da forma das Equações E.27 e E.28.

$$\ln \gamma_i^{*C} = \left[\ln \left(\frac{\phi_i}{x_i} \right) - \frac{\phi_i}{x_i} - \ln \left(\frac{r_i}{r_{agua}} \right) + \frac{r_i}{r_{agua}} \right] - \frac{z_i}{2} q_i \left[\ln \left(\frac{\phi_i}{\theta_i} \right) - \frac{\phi_i}{\theta_i} - \ln \left(\frac{r_i}{r_{agua}} \frac{q_{agua}}{q_i} \right) + \frac{r_i}{r_{agua}} \frac{q_{agua}}{q_i} \right] \quad (\text{E.27})$$

$$\ln \gamma_i^R = q_i \left[-\ln \left(\sum_{k=1}^{nspec} \theta_k \psi_{ik} \right) - \sum_{k=1}^{nspec} \theta_k \frac{\psi_{ik}}{\sum_{k=1}^{nspec} \theta_k \psi_{ik}} + \ln(\psi_{i,agua}^\infty) + \psi_{i,agua}^\infty \right] \quad (\text{E.28})$$

As correlações para o cálculo dos parâmetros estruturais são as apresentadas nas Equações E.29 e E.30. Muitas moléculas possuem os valores já calculados sendo possível encontrá-los na literatura (valores tabelados).

$$q_i = \frac{V_{wi}}{15,17} \quad (\text{E.29})$$

$$r_i = \frac{A_{wi}}{2,5 \cdot 10^9} \quad (\text{E.30})$$

Onde: V_{wi} e A_{wi} são os volumes e área da espécie química obtidas em (BONDI, 1968).

Diversas vezes tais parâmetros foram também estimados em conjunto com os parâmetros do termo residual. Este foi o caso, por exemplo, em Thomsen (1997), cujos parâmetros de interação energética para íons foram utilizados nesta pesquisa de tese.

Agena e colaboradores (1997) desenvolveram correlações para o cálculo dos parâmetros estruturais de biomoléculas (Equações E.31 e E.32).

$$q_i = 0,0273MM_c \quad (\text{E.31})$$

$$r_i = 0,0362MM_c \quad (\text{E.32})$$

Onde: MM_c é massa molar da espécie em sua forma cristalina.

Os parâmetros de interação binária u_{ik} são estimados a partir de dados experimentais e podem ser encontrados na literatura para alguns sistemas. No caso de biomoléculas, existem poucos dados na literatura referentes aos parâmetros de interação binária. Para o caso de eletrólitos, pode-se considerar a validade do princípio de Brønsted de tal forma que os valores dos parâmetros de interação binária para íons de mesmo sinal são iguais a zero (PESSOA, 1992). Thomsen e Rasmussen (1999) consideraram apenas os parâmetros de interação energética água/água e cátion/cátion como sendo nulos.

E.3.3 Modelo Flory-Huggins

O modelo Flory-Huggins foi desenvolvido independentemente pelos dois pesquisadores para sistemas poliméricos. A grande dissimilaridade entre o tamanho das moléculas do polímero e do solvente é levada em consideração através de uma adaptação da expressão usual para a entropia de mistura.

A contribuição combinatorial do sistema também corresponde à entropia de mistura, mas despreza as variações de volume de mistura. Apenas a composição, o tamanho e a forma das moléculas afetam o arranjo das moléculas (ou segmentos poliméricos).

A Equação E.33 apresenta o termo combinatorial do modelo Flory-Huggins que foi empregado por Coutinho e Pessoa (2004) na modelagem de sistemas contendo α -quimotripsina. Os autores realizaram a substituição do termo combinatorial do modelo UNIQUAC pelo termo de Flory-Huggins mantendo o termo residual do modelo UNIQUAC original. Justifica-se que no modelo UNIQUAC original, o termo combinatorial é da forma de Staverman-Guggenheim e não produziria bons resultados para sistemas com grande assimetria em tamanho e forma sendo, por isso substituído pelo termo Flory-Huggins.

$$\frac{G^{E(C)}}{RT} = \left[\sum_{i=1}^{n_{spec}} x_i \ln \left(\frac{\phi_i^{Flory}}{x_i} \right) \right] \quad (E.33)$$

Onde: n_{spec} é o número das diferentes espécies presentes na solução; x_i é a fração molar da espécie i ; ϕ_i^{Flory} é a fração de volume da espécie i calculada pela Equação E.34 para o termo original de Flory-Huggins

$$\phi_i^{Flory} = \frac{x_i V_i}{\sum_{j=1}^{n_{spec}} x_j V_j} \quad (E.34)$$

O coeficiente de atividade combinatorial é expresso pela Equação E.35.

$$\ln \gamma_i^C = \ln \left(\frac{\phi_i}{x_i} \right) + 1 - \frac{\phi_i}{x_i} \quad (E.35)$$

O termo combinatorial de Flory-Huggins na escala assimétrica (para espécies iônicas) é apresentado na Equação E.36.

$$\ln \gamma_i^{*C} = \left[\ln \left(\frac{\phi_i}{x_i} \right) - \frac{\phi_i}{x_i} - \ln \left(\frac{r_i}{r_{agua}} \right) + \frac{r_i}{r_{agua}} \right] \quad (E.36)$$

E.3.4 Modelo Flory-Huggins_Volume Livre

A fim de melhorar os resultados de modelagem dos sistemas que vinham sendo estudados, diversos autores incluíram a compreensão de volume livre em seus modelos. Exemplos são os trabalhos de Oishi e Prausnitz (1978), Iwai e Arai (1989), Elbro e colaboradores (1990) e Kontogeorgis e colaboradores (1993).

Em 1968, Bondi já ponderava que o termo volume livre, que teoricamente é o volume disponível até o centro de massa de uma molécula, é complicado de ser descrito matematicamente e varia bastante entre diferentes autores. Nesta tese, adotou-se a formulação de Kontogeorgis e colaboradores (1993) tal qual apresentada na Equação E.37.

$$V^{FV} = \bar{V} - V^{vw} \quad (E.37)$$

Onde: \bar{V} é o volume específico; V^{vw} é o volume de Van der Waals da espécie, calculado pelo método de Bondi (1968)

Em relação às equações do modelo FH original, a única modificação encontra-se no cálculo da fração de volume que é realizada com base no volume livre sendo apresentada na Equação E.38.

$$\phi_i^{Flory_FV} = \frac{x_i V_i^{FV}}{\sum_{j=1}^{nspec} x_j V_j^{FV}} \quad (E.38)$$

E.3.5 Modelo de Médio Alcance

O equacionamento do termo de médio alcance é apresentado pelas Equações E.39, E.40 e E.41 como uma expressão do segundo coeficiente virial. Esse equacionamento foi utilizado por diversos autores ao incluir um termo de médio alcance na modelagem dos sistemas de interesse (JAWORSKI *et al.*, 2011) (WANG *et al.*, 2002).

$$\ln(\gamma_w^{MA}) = \sum_i \sum_j x_i x_j B_{ij}(I_x) - \sum_i \sum_j x_i x_j \frac{\partial B_{ij}(I_x)}{\partial n_k} - 2 \sum_i x_i B_{iw}(I_x) \quad (E.39)$$

Onde: $I_x = -\frac{1}{2} \sum_i x_i z_i^2$ (E.40)

$$B_{ij}(I_x) = b_{ij} + c_{ij} \exp(-\sqrt{I_x + a_1}) \quad (E.41)$$

O coeficiente de atividade na escala assimétrica (para espécies iônicas) é dado pela Equação E.42.

$$\begin{aligned} \ln(\gamma_k^*)^{MA} = & \sum_i \sum_j x_i x_j B_{ij}(I_x) - \sum_i \sum_j x_i x_j \frac{\partial B_{ij}(I_x)}{\partial n_k} \\ & - 2 \sum_i x_i B_{ik}(I_x) - 2(b_{wk} + c_{wk} \exp(-\sqrt{a_1})) \end{aligned} \quad (E.42)$$

E.4 Sistemas Analisados – Dados de Entrada

Foram estudados dados experimentais disponíveis na literatura de pressão osmótica de biomoléculas em soluções salinas.

Adicionalmente à BSA e lisozima que são as proteínas empregadas na parte experimental desta tese, o estudo de modelos termodinâmicos abarcou também a avaliação dos parâmetros das proteínas ovoalbumina e α -quimotripsina. Isso ocorreu porque por um lado na motivação inicial da tese pretendia-se realizar experimentos também com ovoalbumina. Por outro lado, no artigo de validação das rotinas computacionais da modelagem termodinâmica (AGENA *et al.*, 1997) foram analisados dados da literatura de quatro diferentes proteínas, em soluções de quatro tipos distintos de sais, várias concentrações salinas e pH. Desses sistemas, foram selecionados para comparação da metodologia os dados presentes em Haynes e colaboradores (1992) referentes a medidas de pressão osmótica de soluções contendo α -quimotripsina totalizando sete sistemas distintos. Manteve-se, assim, o estudo de tal proteína até o final da modelagem termodinâmica.

Portanto, foram analisados sistemas contendo as proteínas α -quimotripsina, BSA, lisozima e ovoalbumina em ampla faixa de pH e força iônica.

Dentre os dados descritos na revisão bibliográfica do Capítulo 3, foram selecionados 13 sistemas agrupando dados experimentais de mesma proteína e pH. Os dados dos sistemas estudados são sumarizados na Tabela E.1 podendo ser encontrados com mais detalhes no Apêndice D.

Uma vez que alguns sistemas possuíam poucos dados experimentais (em alguns casos 5 ou 6 pontos apenas), todos os sistemas foram ampliados de tal forma que a estimação de parâmetros ocorreu sempre com um número de pontos experimentais igual a 105 para cada pH. Isso foi realizado gerando novos pontos dentro da faixa de concentração de proteína dos dados originais utilizando os coeficientes viriais previamente estimados. Essa abordagem foi realizada para garantir alguma significância estatística aos parâmetros dos modelos, uma vez que (como será visto futuramente) em alguns casos foram estimados até 28 parâmetros simultaneamente.

Tabela E.1 – Sistemas estudados

Sistema	Proteína	Temp (°C)	Faixa de concentração (g/L)	pH	Sal, tampão	Número de pontos experimentais
A ¹	α -quimotripsina	25	0,9 - 40	3	K ₂ SO ₄ , 0,03M / 0,15M / 0,3M	27
B ¹	α -quimotripsina	25	0,9 - 40	3	K ₂ SO ₄ , 0,03M / 0,15M	18
C ²	BSA	25	15 - 150	7,4	NaCl, 1 M / 3M / 5M	15
D ²	BSA	25	12 - 62	4,5	NaCl, 1M	5
E ²	BSA	25	30 - 123	5,4	NaCl, 3 M / 5M	10
F ³	Ovoalbumina	25	20 - 527	7,0	NaCl, 0,01M / 0,15M / 0,5M	47
G ⁴	Lisozima	25	4 - 21	4,0	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1M / 3M	18

Fonte: ¹ (HAYNES *et al.*, 1992)² (WU e PRAUSNITZ, 1999)³ (YOUSEF *et al.*, 2001)⁴ (MOON *et al.*, 2000b); ⁵ (LU *et al.*, 2009)

Tabela E.1 – Continuação

Sistema	Proteína	Temp (°C)	Faixa de concentração (g/L)	pH	Sal, tampão	Número de pontos experimentais
H ⁴	Lisozima	25	4 – 21	7,0	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1M / 3M	18
I ⁴	Lisozima	25	4 – 22	8,0	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1M / 3M	18
J ⁵	BSA	25	8 – 59	4,5	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,15M / 0,5M / 1M / 1,5M	24
K ⁵	BSA	25	8 – 56	4,8	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,15M / 0,5M / 1M / 1,5M	24
L ⁵	BSA	25	8 – 61	5,4	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,15M / 0,5M / 1M / 1,5M	24
M ⁵	BSA	25	8 – 67	7,4	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,15M / 0,5M / 1M / 1,5M	24

Fonte: ¹ (HAYNES *et al.*, 1992)² (WU e PRAUSNITZ, 1999)³ (YOUSEF *et al.*, 2001)⁴ (MOON *et al.*, 2000b); ⁵ (LU *et al.*, 2009)

A pressão osmótica de uma solução é calculada pela Equação E.43, onde V_s é o volume molar do solvente.

$$\pi = \frac{-RT}{V_s} \ln a_s = \frac{-RT}{V_s} \ln \gamma_s x_s \quad (\text{E.43})$$

A utilização do dado primitivo de pressão osmótica para comparação de resultados contém menos erros acumulados, entretanto muitas vezes tal abordagem não é viável. Devido a isso, é comum encontrar na literatura a aplicação da expansão do virial (Equação E.44) para sistemas binários para relacionar a pressão osmótica com o coeficiente virial (WILLS *et al.*, 1993). Embora seja possível empregar qualquer equação de estado para essa relação, a formulação utilizando os coeficientes viriais é considerada nestes casos como a que fornece o coeficiente de atividade “experimental”.

$$\frac{\pi}{RT} = c_p \left(1 + B_2 c_p + B_3 c_p^2 + \dots \right) \quad (\text{E.44})$$

O coeficiente de atividade molal do soluto ($\gamma_{p(m)}$) é dado pela Equação E.45.

$$\ln \gamma_{P(m)} = 2C_2 m_p + \frac{3}{2} C_3 m_p^2 + \dots \quad (\text{E.45})$$

Os coeficientes C_k relacionam-se com os coeficientes viriais B_k através das Equações E.46 e E.47.

$$C_2 = (B_2 - \bar{v}_p MM_p) \rho \quad (\text{E.46})$$

$$C_3 = (B_3 - 2B_2 \bar{v}_p MM_p + (\bar{v}_p MM_p)^2) \rho^2 \quad (\text{E.47})$$

Onde: \bar{v}_p e MM representam, respectivamente, o volume parcial específico e a massa molar do soluto e ρ é a densidade do solvente.

A partir de dados experimentais originais de pressão osmótica, foram então, obtidos os coeficientes viriais e, em seguida, os coeficientes de atividade "pseudo-experimentais". Os dados experimentais utilizados encontram-se compilados no Apêndice D.

Os sistemas foram considerados quaternários formados de proteína/anion/cátion/pseudossolvente conforme metodologia de Coutinho e Pessoa (2004).

Os dados de entrada dos modelos empregados são apresentados na Tabela E.2. Para os pseudossolventes foram adotadas as propriedades da água pura.

O Quadro E.1 apresenta os valores dos parâmetros u_{ij} dos eletrólitos obtidos da literatura.

Quadro E.1 – Parâmetros U_{ij} utilizados

	H ₂ O	Na	K	NH ₄	SO ₄	Cl
H ₂ O	0,000 ¹	733,286 ¹	535,023 ¹	540,297 ²	752,879 ²	1523,390 ¹
Na	-	0,000 ¹	-46,194 ¹	375,977 ²	845,135 ²	1443,230 ¹
K	-	-	0,000 ¹	184,288 ²	913,824 ²	1465,180 ¹
NH ₄	-	-	-	0,000 ²	677,178 ²	1385,310 ²
SO ₄	-	-	-	-	1265,830 ²	2036,060 ²
Cl	-	-	-	-	-	2214,810 ¹

Fonte: ¹(THOMSEN *et al.*, 1996); ²(THOMSEN e RASMUSSEN, 1999)

Tabela E.2 – Dados de entrada dos modelos termodinâmicos

Componente	MM (g/mol)	\bar{V} (cm ³ /g)	Parâmetros do modelo UNIQUAC	
			q	r
Pseudossolventes ¹	18,015	1	1,40	0,92
α -quimiotripsina	29540,09 ¹	18879	700,27 ³	928,57 ³
BSA	66500 ²	0,734 ²	1815,45 ³	2407,33 ³
Ovoalbumina	43500 ⁴	0,750 ⁵	1187,55 ³	1574,73 ³
Lisozima	17000 ⁶	0,734 ⁷	464,13 ³	615,43 ³
Na ⁺	22,990	-	1,1998 ⁸	1,4038 ⁸
Cl ⁻	35,450	-	10,1978 ⁸	10,3868 ⁸
NH ₄ ⁺	18,038	-	4,6039 ⁹	4,8159 ⁹
SO ₄ ²⁻	96,063	-	12,4449 ⁹	12,7949 ⁹
K ⁺	39,098		2,431 ⁸	2,230 ⁸

Fonte: ¹Dados da água pura. ²Referência: (BOWEN *et al.*, 1998). ³Correlação de (AGENA *et al.*, 1997). ⁴Referência: (RAJE e PINTO, 1998). ⁵Referência: (YOUSEF *et al.*, 2001). ⁶Referência: (MOON *et al.*, 2000b). ⁷Referência: (SASAHARA *et al.*, 1999). ⁸Referência: (THOMSEN *et al.*, 1996). ⁹Referência: (THOMSEN e RASMUSSEN, 1999)

E.5 Resultados

Os estudos de modificações no modelo UNIQUAC para representação de sistemas contendo proteínas foi realizado em cinco etapas tais quais serão apresentadas subsequentemente.

E.5.1 Avaliações de modificações no modelo UNIQUAC – termo combinatorial e termo de longo alcance

Foi avaliada a influência de diferentes termos combinatoriais e a inclusão de um termo da contribuição de longo alcance na modelagem de dados de pressão osmótica de sistemas contendo as proteínas de interesse. Foram avaliadas as seguintes combinações:

- i. Uniquac original (termo combinatorial e termo residual);
- ii. Uniquac original + termo de Debye Huckel;
- iii. termo combinatorial de Flory + termo residual do UNIQUAC;

- iv. termo combinatorial de Flory + termo residual do UNIQUAC + termo de Debye Huckel;
- v. termo combinatorial de Flory_Volume livre + termo residual do UNIQUAC;
- vi. termo combinatorial de Flory_Volume livre + termo residual do UNIQUAC + termo de Debye Huckel.

Foram estimados quatro parâmetros de interação energética ($u_{pseudosolente/ptm}$, $u_{ptm/ptm}$, $u_{ptm/anion}$, $u_{ptm/cation}$).

Para não sobrecarregar o texto os resultados serão apresentados de forma resumida. De forma geral, os resultados podem ser divididos em quatro tipos apresentados a seguir.

Resultados do tipo I são aqueles onde todos os modelos avaliados funcionaram bem. Exemplo deste tipo de resultado são os sistemas formados por Lisozima + $(NH_4)_2SO_4$ em pH 7 e pH 8 e força iônica 1M e 3M. O desvio médio quadrático máximo encontrado nesses sistemas foi menor que 1,3%. Um desses sistemas é apresentado graficamente na Figura E.1.

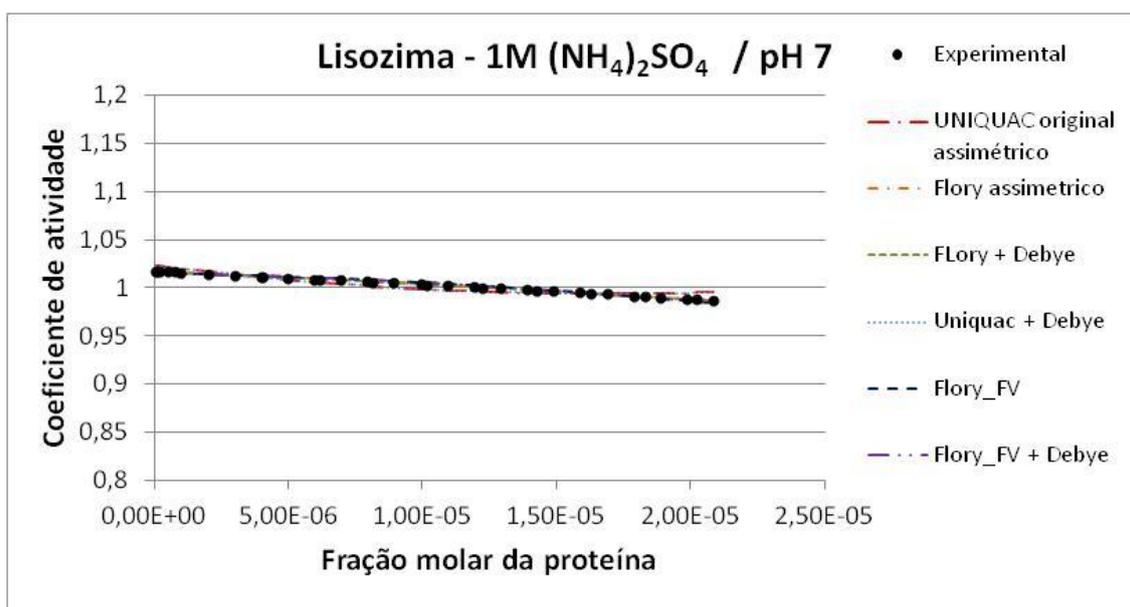


Figura E.1 – Coeficiente de atividade da lisozima em solução salina de $(NH_4)_2SO_4$ em pH 7,0 e força iônica 1M – dados experimentais de Moon e colaboradores (2000b).

Resultados do tipo II são aqueles onde o modelo UNIQUAC original e Uniquac + Debye não funcionam enquanto todos os demais modelos avaliados funcionaram bem. Exemplo deste tipo de resultado são os sistemas formados por BSA + NaCl em pH 7,4 e força iônica 1M e 3M; α -quimotripsina + K_2SO_4 em pH 8,25 e força iônica 0,1M; BSA + $(NH_4)_2SO_4$ em pH 4,5 / 4,8 / 5,4 / 7,4 e força iônica 0,15M e 0,5M. Um desses sistemas é apresentado graficamente na Figura E.2.

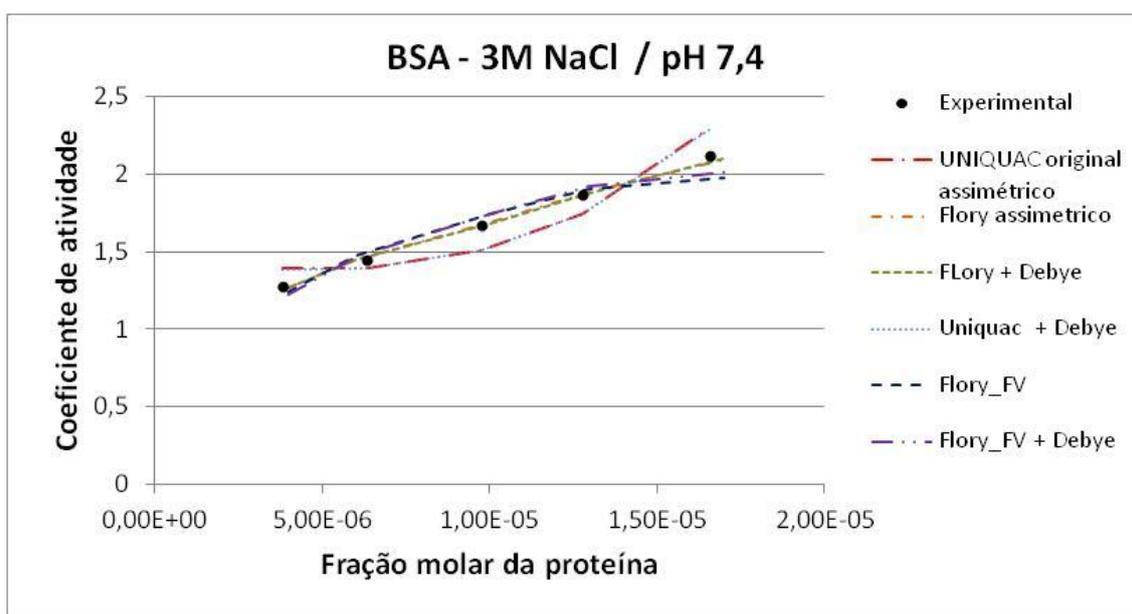


Figura E.2 – Coeficiente de atividade da BSA em solução salina de NaCl em pH 7,4 e força iônica 3M – dados experimentais de Wu e Prausnitz (1999).

Resultados do tipo III são aqueles onde o modelo com termo combinatorial de Flory não funcionou bem enquanto todos os demais modelos avaliados funcionaram bem. Exemplo deste tipo de resultado são os sistemas formados por BSA + NaCl em pH 7,4 e 5,4 e força iônica 5M; α -quimotripsina + K_2SO_4 em pH 3 e força iônica 0,03M. Um desses sistemas é apresentado graficamente na Figura E.3.

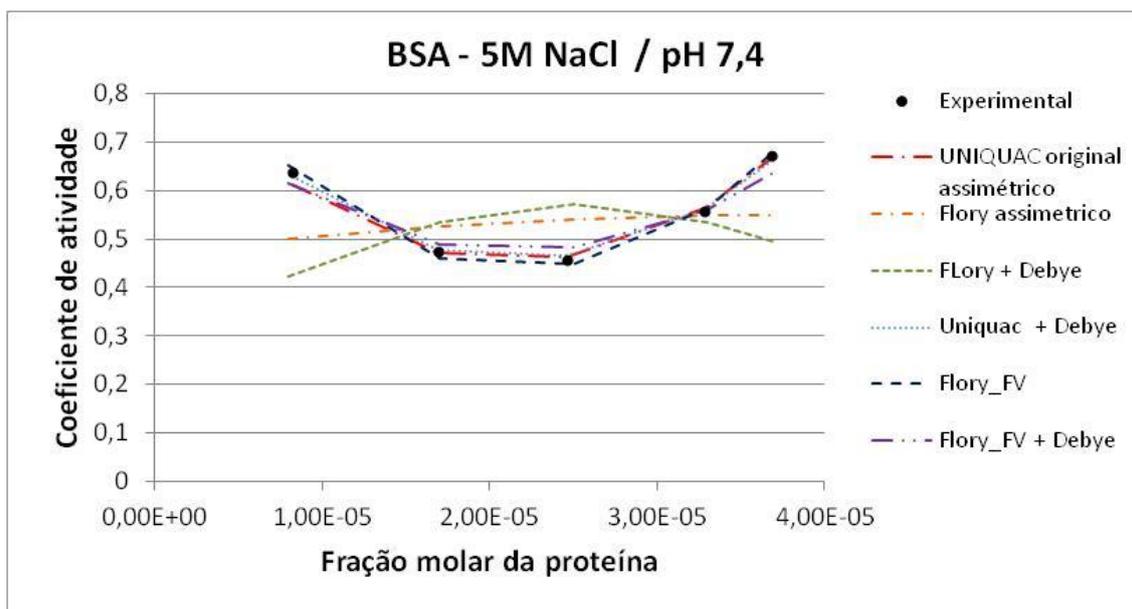


Figura E.3 – Coeficiente de atividade da BSA em solução salina de NaCl em pH 7,4 e força iônica 5M – dados experimentais de Wu e Prausnitz (1999).

Resultados do tipo IV são aqueles onde nenhum modelo conseguiu representar satisfatoriamente os dados experimentais. Exemplo deste tipo de resultado é o sistema formado por α -quimiotripsina+ K_2SO_4 em pH 8,25 e força iônica 0,1M apresentado graficamente na Figura E.4.

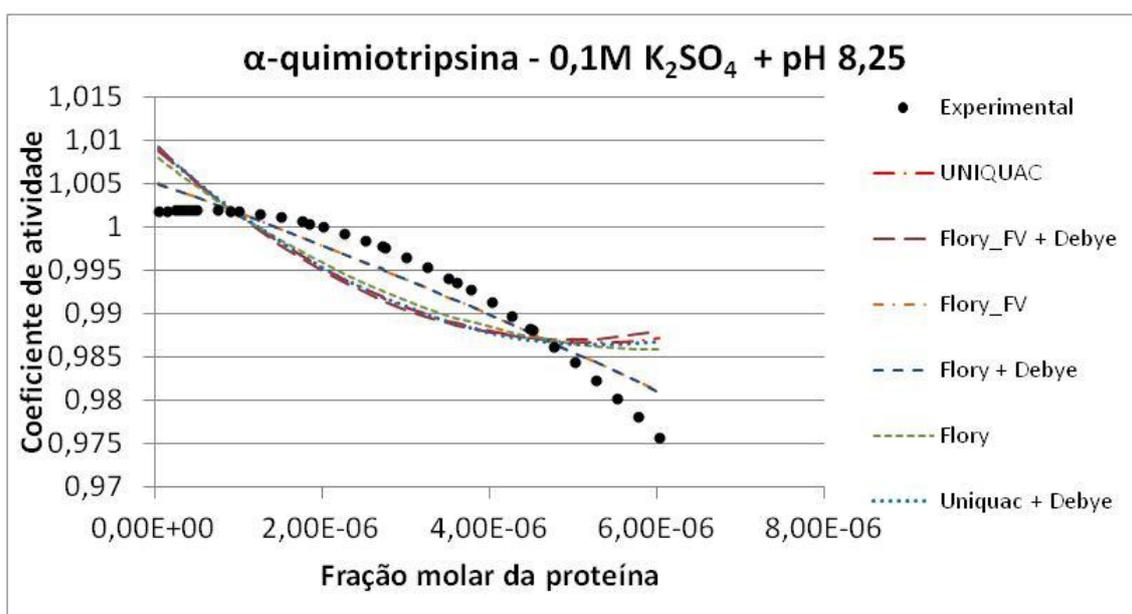


Figura E.4 – Coeficiente de atividade da α -quimiotripsina em solução salina de K_2SO_4 em pH 8,25 e força iônica 0,1M – dados experimentais de Haynes (1992).

Conclusões parciais: Os resultados parciais desta análise nos permitem chegar às conclusões a seguir em relação ao modelo de energia livre de Gibbs em excesso.

- O modelo contendo o termo combinatorial de Flory-Huggins com volume livre se mostrou o mais robusto apresentando os menores desvios em todos os sistemas estudados.
- A presença do termo de longo alcance não influenciou os resultados não tendo sido identificados benefícios por sua inclusão no modelo. Entretanto, cabe ressaltar que a carga líquida da proteína foi considerada nula nesta primeira análise. Acredita-se que o termo de longo alcance pode ter importância na modelagem de pontos experimentais em concentrações mais diluídas de proteína.
- Foi possível estimar um conjunto de parâmetros para cada sistema, onde sistema é considerado composto de mesmo pH, mesma proteína, mesmo sal e mesma força iônica.

Foi realizada em seguida uma tentativa para predição em toda a faixa de força iônica. Para isto foi considerado um sistema como composto de mesmo pH, mesmo sal e mesma proteína. Foram estimados os quatro parâmetros de interação energética para cada sistema ($u_{ps/ptm}$, $u_{ptm/ptm}$, $u_{ptm/anion}$, $u_{ptm/cátion}$).

A Figura E.5 apresenta um sistema de lisozima em solução salina de $(NH_4)_2SO_4$ em pH 4,0. Os dados de força iônica são todos na faixa de *salting-in* da proteína não tendo grandes diferenças, especialmente qualitativas, nos dados entre uma força iônica e outra. Pode-se verificar pela figura que nenhum modelo foi capaz de representar bem os dados experimentais.

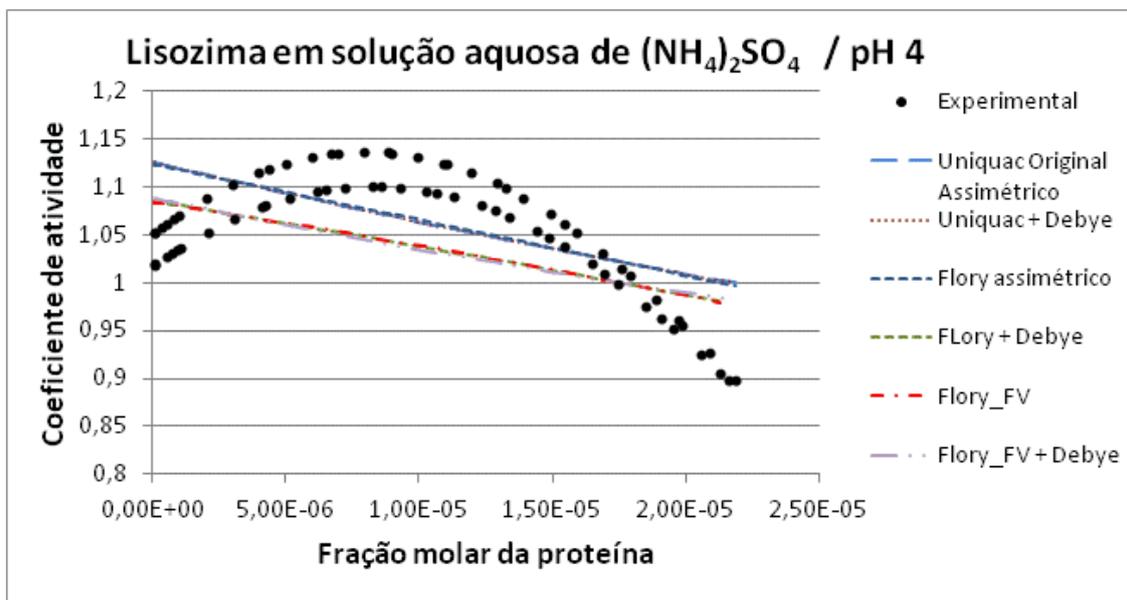


Figura E.5 – Coeficiente de atividade da lisozima em solução salina de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 4,0.

A Figura E.6 traz um sistema onde os dados de coeficiente de atividade da BSA em solução salina de NaCl em pH 7,4. Os dados experimentais estão em faixas diferentes de *salting-in/ salting-out* da proteína apresentando comportamentos distintos para a faixa de força iônica analisada. Pode-se verificar novamente que nenhum modelo foi capaz de representar bem os dados experimentais.

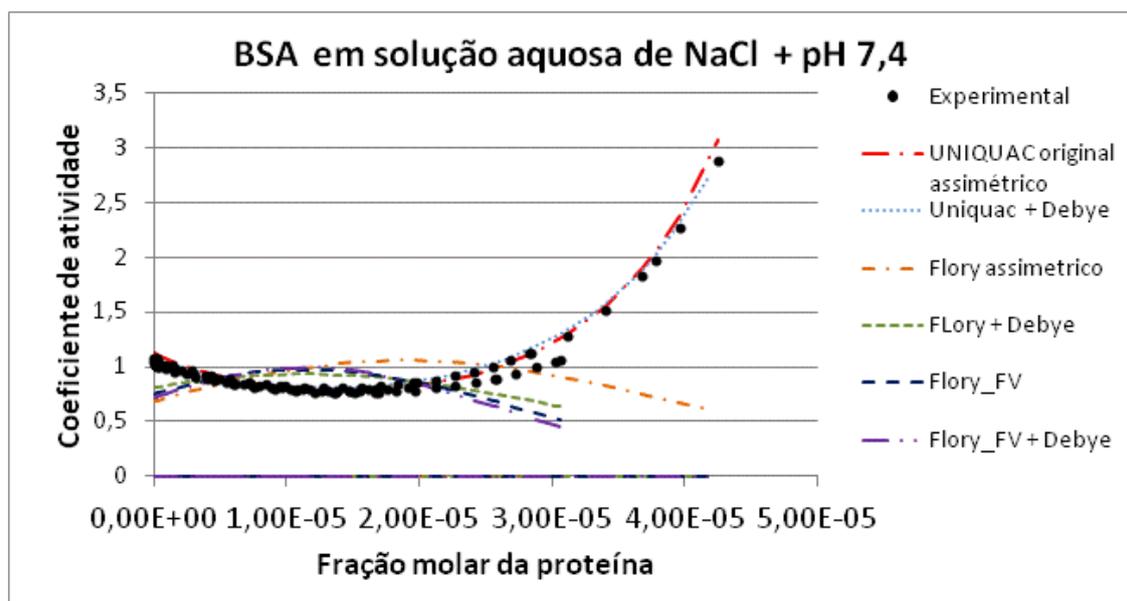


Figura E.6 – Coeficiente de atividade da BSA em solução salina de NaCl em pH 7,4.

Conclusões parciais: os modelos avaliados são puramente correlativos não sendo possível fazer a predição dos dados em toda a faixa de força iônica utilizando um mesmo conjunto de parâmetros de interação do termo residual. Isso poderia ser um indicativo da dependência dos parâmetros com a força iônica.

E.5.2 Estimação da carga iônica da proteína

Foi avaliada a possibilidade de realizar uma estimativa da carga iônica da proteína.

Primeiramente, seguiu-se a mesma metodologia proposta por Coutinho e Pessoa (2004). Empregou-se apenas o modelo contendo termo residual do UNIQUAC original, termo combinatorial de Flory-Huggins e termo de longo alcance de Debye-Huckel. Foi realizada a estimativa de parâmetros do termo residual ($U_{ps/ptn}$, $U_{ptn/ptn}$, $U_{ptn/anion}$, $U_{ptn/cation}$) em um sistema em pH no ponto isoelétrico da proteína. Tais parâmetros estimados no PI foram mantidos constantes e utilizados para estimar a carga líquida da proteína em outros pH (considerando sistemas com mesma força iônica).

A Figura E.7 apresenta o coeficiente de atividade residual e combinatorial da α -quimotripsina. Ambos os termos serão sempre constantes independente do pH, uma vez que os parâmetros de interação são mantidos constantes e estão sendo avaliados sistemas com mesma força iônica.

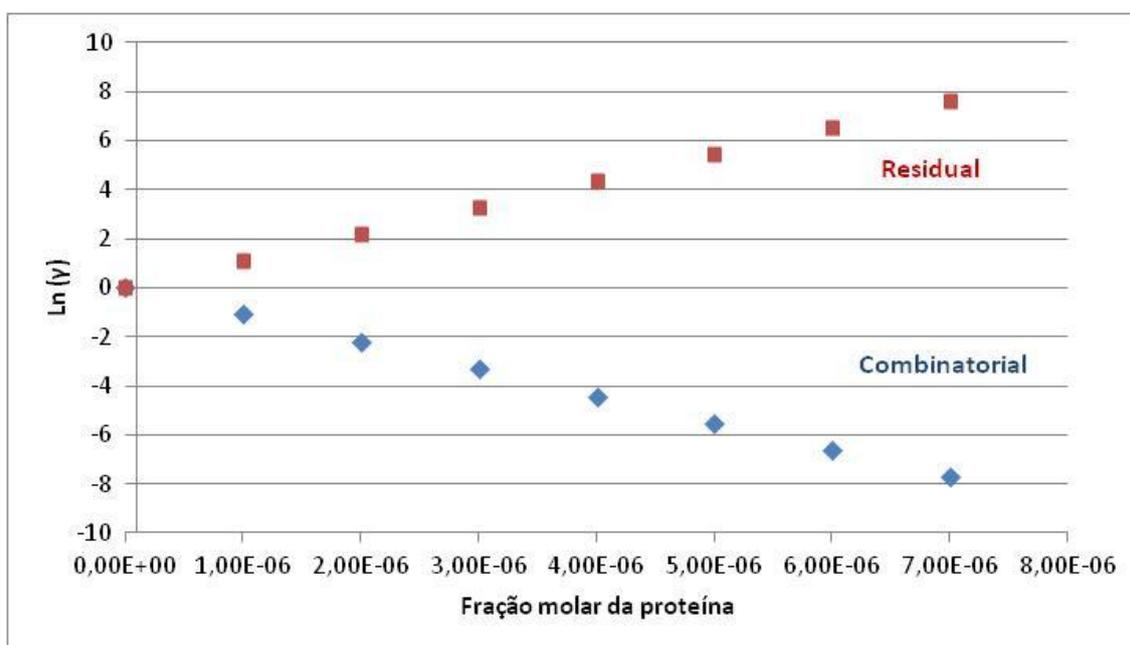


Figura E.7 – Reprodução dos resultados dos termos combinatorial e residual do coeficiente de atividade da da α -quimotripsina com parâmetros descritos em Coutinho e Pessoa (2004).

Fonte: Elaborado nesta pesquisa de tese

A Figura E.8 foi retirada de Coutinho e Pessoa (2004) para comparação dos resultados.

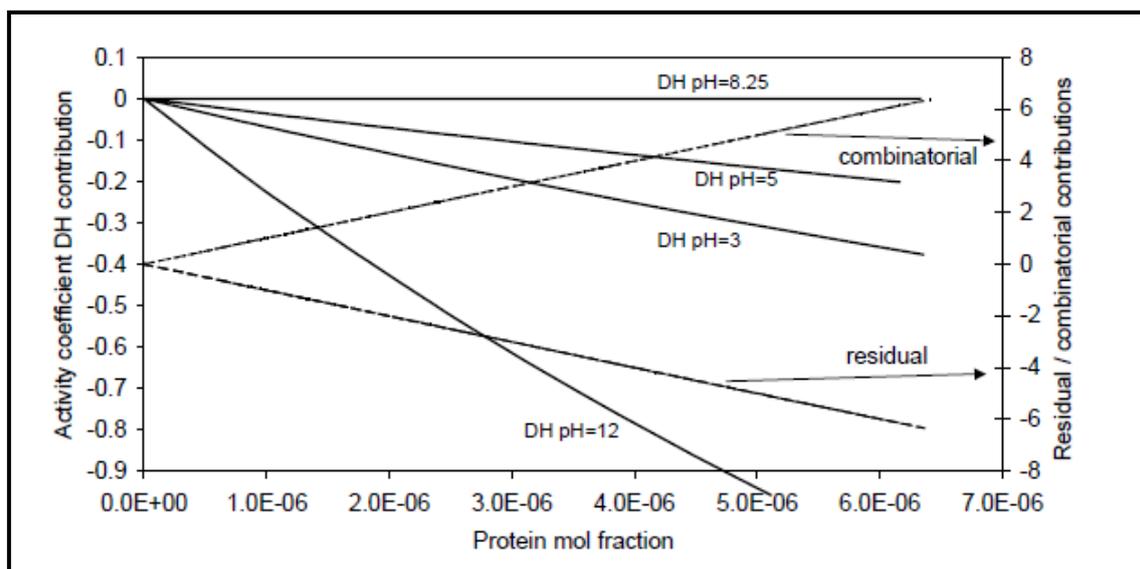


Figura E.8 – Coeficiente de atividade da α -quimotripsina em solução salina 0,1M de sulfato de potássio

Fonte: Coutinho e Pessoa (2004)

Verifica-se que os resultados dos termos combinatorial e residual são equivalentes aos apresentados por Coutinho e Pessoa (2004). Entretanto, as curvas apresentadas só puderam ser geradas considerando concentração de sal nula. Utilizando concentração de sal de 0,1M, conforme os dados experimentais, as curvas apresentam valores distintos. Não se conseguiu, todavia, reproduzir as curvas apresentadas para o termos de Debye-Huckel.

Avaliando a Equação E.48 verifica-se que para uma carga de proteína $z = 10$, $z = 20$, $z = 30$ (o que acontece na prática) o termo $\frac{\sqrt{I}}{1 + B\sqrt{I}}$ deve ser bastante pequeno.

Para que isso aconteça B tem que ter um valor muito grande. B é uma constante dada pela Equação E.49. Para sistemas aquosos o valor de B é de cerca de $\sim 1,5$ (kg/mol)^{1/2}. Coutinho e Pessoa (2004) afirmam que utilizaram $B = 15$ (kg/mol)^{1/2}. Com este valor não foi possível reproduzir os resultados dos autores. Questiona-se o uso de um valor

para esta constante diferente daquela calculada pela Equação E.49, apesar de alguns autores fazerem isso.

$$\ln(\gamma_i^*)^{DH} = -z_i^2 A \frac{\sqrt{I}}{1 + B\sqrt{I}} \quad (\text{E.48})$$

$$B = \frac{6,359696(\rho_s)^{1/2}}{(\epsilon T)^{1/2}} \quad (\text{E.49})$$

Não foi possível, portanto, estimar a carga líquida da proteína conforme metodologia proposta por Coutinho e Pessoa (2004) utilizando parâmetros de interação do termo residual estimados no ponto isoelétrico da proteína.

Para as análises seguintes, a carga líquida da proteína foi, então, calculada utilizando a Equação E.50. Dessa forma, viabilizou-se o emprego mais efetivo do termo de longo alcance.

$$PNC = \sum_{i+} n_{i+} \frac{10^{pK_{i+} - pH}}{10^{pK_{i+} - pH} + 1} + \sum_{i-} n_{i-} \frac{10^{pH - pK_{i-}}}{10^{pH - pK_{i-}} + 1} \quad (\text{E.50})$$

A sequência de aminoácidos de cada proteína foi retirada do banco de dados “Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb/)”. O valor de pKa dos aminoácidos é apresentado na Tabela E.3.

Tabela E.3 – Valores de pKa dos aminoácidos

Aminoácido	pKa
Arginina	12,48
Histidina	6,04
Lisina	10,54
Nh2	9,69
Tirosina	10,46
Cisteína	8,37
Ac. Glutâmico	4,07
Ac. Aspartico	3,9
COOH terminal	2,34

Fonte: Nelson e Cox (2002)

Os valores de carga líquida das proteínas calculados para cada pH encontram-se na Tabelas E.4, E.5, E.6 e E.7.

Tabela E.4 – Carga líquida da BSA

pH	4,5	4,8	5,4	7,4
PNC	23,54	12,80	0,66	-19,70

Fonte: Calculado nesta pesquisa

Tabela E.5 – Carga líquida da ovoalbumina

pH	7
PNC	-11,52

Fonte: Calculado nesta pesquisa

Tabela E.6 – Carga líquida da lisozima

pH	4	7	8
PNC	13,19	7,77	5,57

Fonte: Calculado nesta pesquisa

Tabela E.7– Carga líquida da α -quimiotripsina

PH	3	4	5	6	8	8,25	10	11	12
PNC	18,78	12,69	7,02	5,13	0,96	-0,43	-10,62	-20,56	-25,41

Fonte: Calculado nesta pesquisa

Conclusões parciais: não foi possível realizar a estimação simultânea da carga líquida das proteínas com os parâmetros de interação energética. Nas análises seguintes do estudo a carga líquida da proteína foi mantida fixa para cada pH tendo sido calculada como uma contribuição dos pKas dos aminoácidos que compõe a proteína.

E.5.3 Avaliação da influência de cada parâmetro no termo residual

Nesta etapa, foi realizada uma avaliação da influência de cada parâmetro de interação energética no termo residual. Buscou-se primeiramente, sem êxito contudo, uma possível relação entre os parâmetros obtidos. Em seguida foi realizada uma

avaliação da sensibilidade dos parâmetros não sendo possível determinar uma faixa de valores para os mesmos.

Por fim, foi realizada uma análise de consistência dos parâmetros. Para isso, foram estimados todos os parâmetros do termo residual de cada sistema (cada pH), ou seja, 10 parâmetros de interação energética ($u_{ps/ptm}$, $u_{ptn/ptm}$, $u_{ptn/anion}$, $u_{ptn/cátion}$, $u_{ps/ps}$, $u_{ps/cátion}$, $u_{ps/anion}$, $u_{anion/cátion}$).

Os resultados obtidos foram similares aos encontrados anteriormente para a estimação de apenas quatro parâmetros, não tendo sido verificada nenhuma melhoria.

A Figura E.9 apresenta os mesmos dados experimentais anteriormente visualizados na Figura E.4. Pode-se perceber, que a estimação de mais parâmetros não representou diminuição do desvio do modelo.

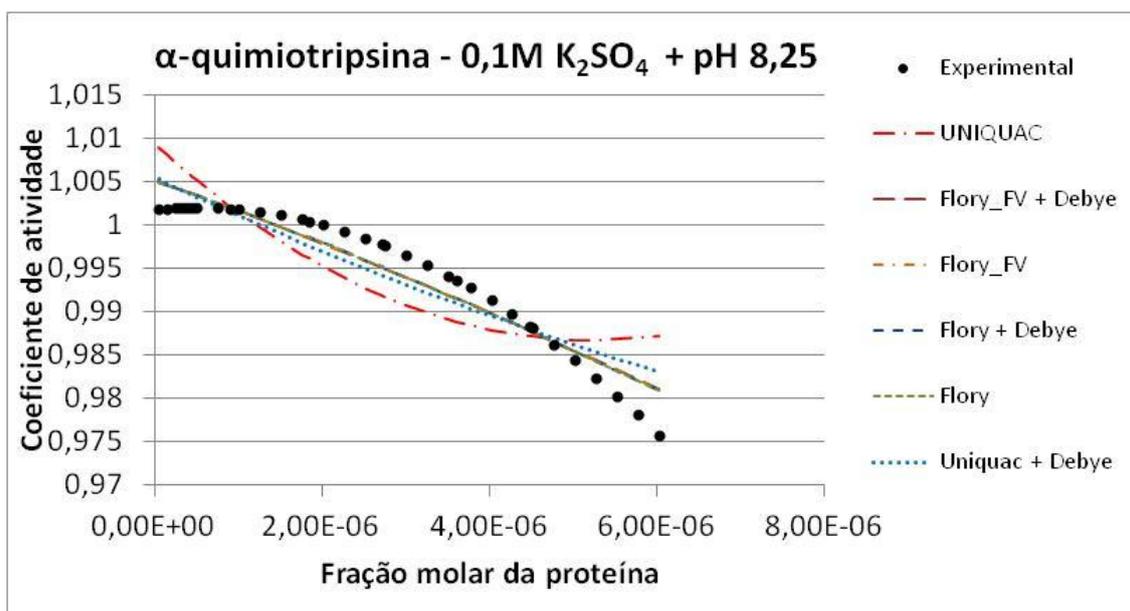


Figura E.9 – Coeficiente de atividade da α -quimiotripsina em solução salina de K_2SO_4 em pH 8,25 e força iônica 0,1M – dados experimentais de Haynes e colaboradores (1992) – Estimação de 10 parâmetros de interação energética.

A Figura E.10 traz os resultados do mesmo conjunto de pontos experimentais com a estimação de 10 parâmetros de interação energética, mas com a consideração da carga líquida da proteína conforme a Tabela E.7. Verifica-se novamente que não houve diminuição do desvio do modelo em relação à metodologia simplificada (estimação de 4 parâmetros + carga líquida da proteína nula).

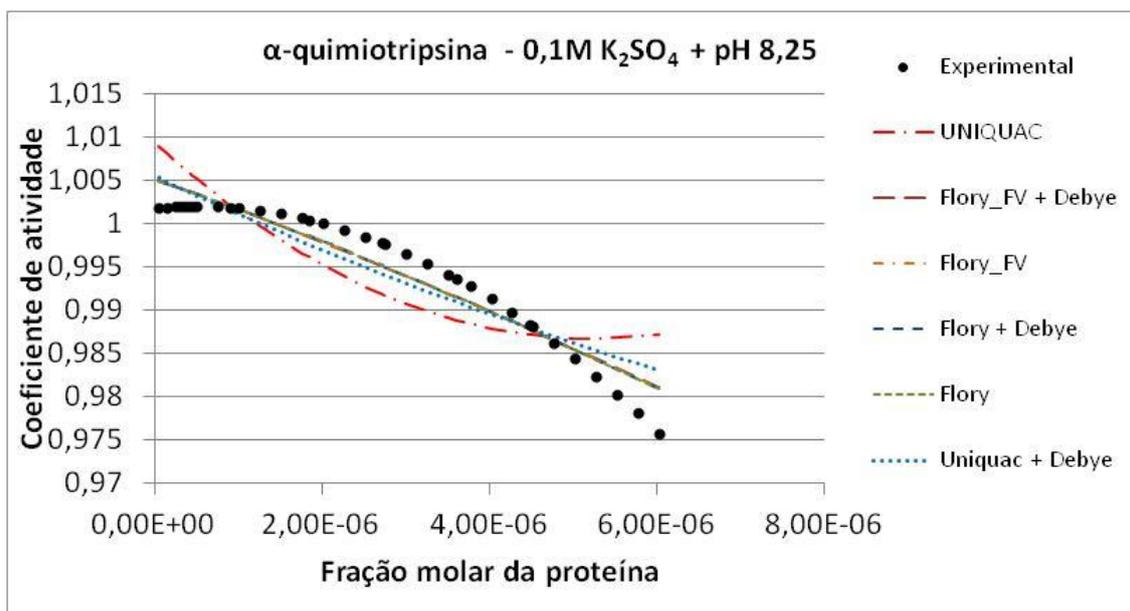


Figura E.10 – Coeficiente de atividade da α -quimiotripsina em solução salina de K_2SO_4 em pH 8,25 e força iônica 0,1M – dados experimentais de Haynes e colaboradores (1992) – Estimação de 10 parâmetros de interação energética – Carga líquida da proteína = -0,43.

Conclusões parciais: a estimação de 4 parâmetros forneceu resultados similares à estimação de 10 parâmetros. Optou-se por seguir o estudo realizando a estimação de apenas 4 parâmetros a fim de simplificar o modelo e o custo computacional.

E.5.4 Avaliação da influência de um termo de médio alcance na modelagem

A avaliação da influência de um termo de médio alcance na modelagem foi realizada em duas etapas.

Primeiramente, todas as alternativas analisadas na seção 1 deste estudo foram acrescidas do termo de médio alcance considerando nos cálculos a carga líquida da proteína. Para cada sistema foram estimados 10 parâmetros u_{ij} ($u_{ps/ptn}$, $u_{ptn/ptn}$, $u_{ptn/anion}$, $u_{ptn/cation}$, $u_{ps/ps}$, $u_{ps/cation}$, $u_{ps/anion}$, $u_{anion/cation}$), 6 parâmetros b_{ij} ($b_{ps/ptn}$, $b_{ptn/anion}$, $b_{ptn/cation}$, $b_{ps/cation}$, $b_{ps/anion}$, $b_{anion/cation}$) e 6 parâmetros c_{ij} ($c_{ps/ptn}$, $c_{ptn/anion}$, $c_{ptn/cation}$, $c_{ps/cation}$, $c_{ps/anion}$, $c_{anion/cation}$)

Os resultados foram semelhantes aos encontrados sem a adição do termo de médio alcance, não tendo sido verificada nenhuma melhoria. O resultado é ilustrado na Figura E.11.

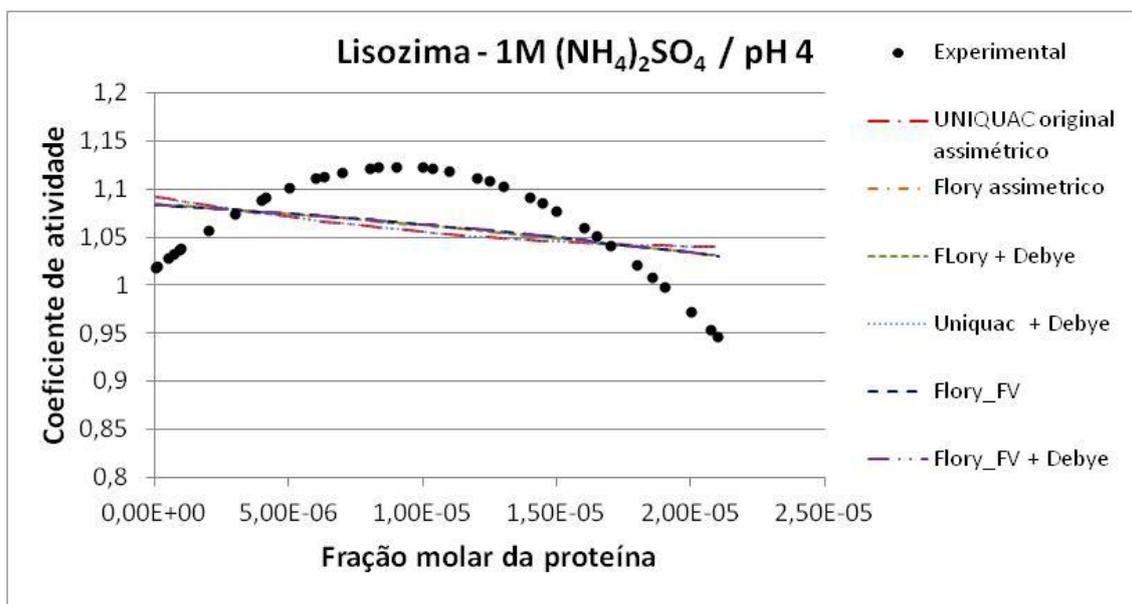


Figura E.11 – Estimação de parâmetros de dados de Lisozima em solução salina de (NH₄)₂SO₄ –pH 4,0. Dados experimentais de Moon e colaboradores (2000b). RMSD=4,42%

Na segunda etapa desta análise, avaliou-se o comportamento da inclusão do termo de médio alcance nos sistemas contendo dados experimentais em toda faixa de força iônica.

Uma vez que os parâmetros de médio alcance são dependentes de força iônica, esperava-se que o modelo fosse capaz de ser preditivo para toda faixa de força iônica. Além disso, ao invés de estimar 4 ou 10 parâmetros, passa-se a estimar 22 parâmetros fato que poderia contribuir para uma melhor correlação entre os dados experimentais e os calculados. Entretanto, a adição do termo de médio alcance a todos os modelos previamente analisados não apresentou nenhuma contribuição aos resultados anteriores, especialmente no que diz respeito ao caráter preditivo do modelo.

O resultado pode ser visualizado nas Figuras E.12, E.13 e E.14 para os sistemas compostos de lisozima e soluções de (NH₄)₂SO₄ em diversas forças iônicas para três diferentes valores de pH. Comportamento semelhante ocorreu com as demais proteínas/sistemas.

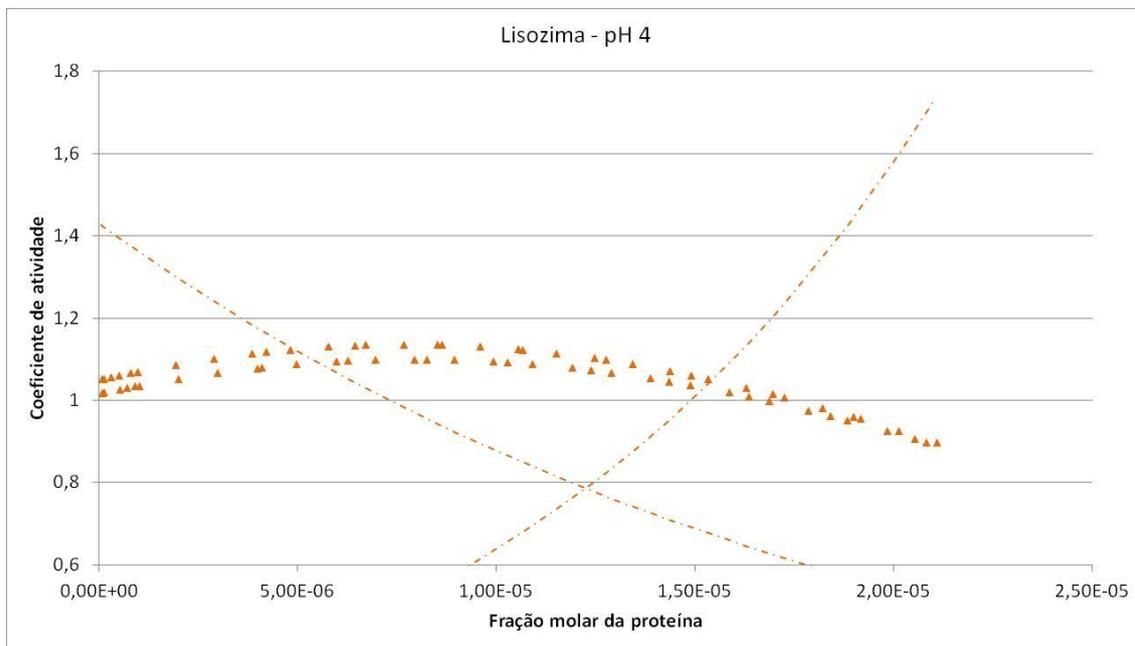


Figura E.12 – Estimação de parâmetros de dados com diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – Sistema de lisozima em pH 4,0. Dados experimentais de Moon e colaboradores (2000b). RMSD=44,11%

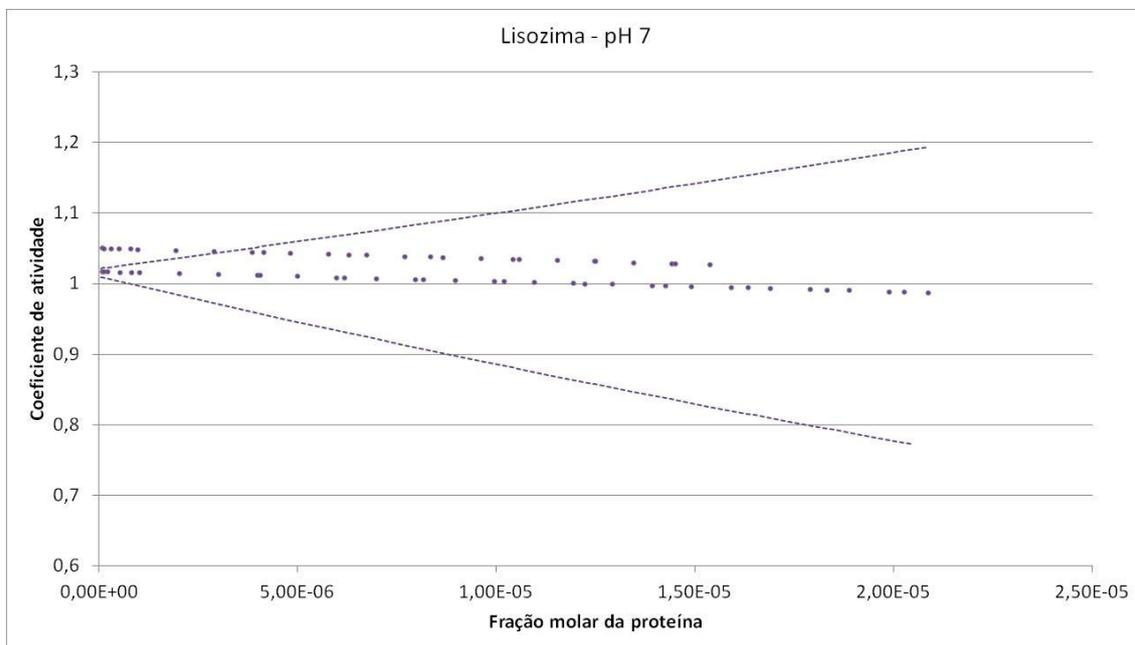


Figura E.13 – Estimação de parâmetros de dados com diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – Sistema de lisozima em pH 7,0. Dados experimentais de Monn e colaboradores (2000b). RMSD=13,52%

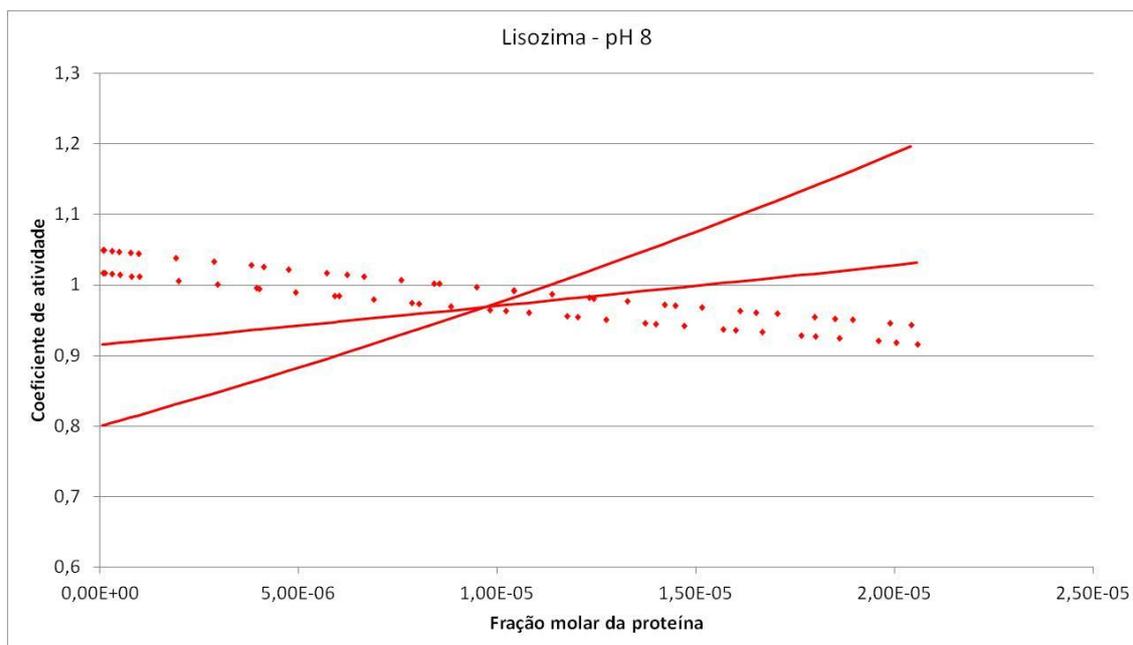


Figura E.14 – Estimação de parâmetros de dados com diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – Sistema de lisozima em pH 8,0. Dados experimentais de Moon e colaboradores (2000b). RMSD=12,31%

Conclusões parciais: o termo de médio alcance não forneceu contribuições aos resultados que justificassem mantê-lo no modelo. Adicionalmente, a inclusão deste termo no modelo implica uma adição de 12 parâmetros a serem estimados.

E.5.5 Avaliação da influência da dependência de composição nos parâmetros de interação do modelo UNIQUAC

A conclusão parcial da primeira etapa indicou uma possível dependência dos parâmetros do modelo com a força iônica da solução. O termo de médio alcance, apesar de ter parâmetros dependentes de força iônica não foi capaz de contribuir para a diminuição do desvio do modelo. Assim, nesta etapa foi empregado o modelo REUNI (UNIQUAC estendido revisado).

Este modelo foi proposto por Pessoa (1992) e apresentado por Pessoa e Rasmussen (1992) tendo sido utilizado com sucesso na modelagem de sistemas de eletrólitos fortes e fracos. Neste modelo é empregado o termo de longo alcance de Macedo e colaboradores (1990) e para expressar as forças de curto alcance o modelo UNIQUAC com parâmetros de interação energética dependentes de temperatura e composição (SANDER *et al.*, 1986).

No presente estudo, foi considerada apenas a dependência de composição nos parâmetros, uma vez que não foram avaliados sistemas em diferentes temperaturas. A dependência com a composição é da forma da Equação E.51.

$$u_{ik} = u_{ik}^0 + \theta_i \sum_{j \neq i} \delta_{ij,k} \theta_j \quad (\text{E.51})$$

Onde: u_{ik}^0 e $\delta_{ij,k}$ são parâmetros a serem estimados; $u_{ik} = u_{ki}$; $\delta_{ij,k} = \delta_{ji,k}$.

Nota-se que é necessário realizar a estimação do dobro de parâmetros em relação ao modelo sem dependência com composição. Adicionalmente, não são tantos os sistemas que já foram estudados utilizando-se este modelo de tal forma que há significativamente menos parâmetros u_{im}^0 e $\delta_{ij,m}$ tabelados. Para nossos sistemas foi necessária realizar a estimação de 10 parâmetros u_{ik}^0 e 10 parâmetros $\delta_{ij,k}$.

Nesta avaliação foi empregado o termo combinatorial Flory_FV por ter sido considerado mais robusto nas conclusões da seção E.5.1 de modo a alterar o modelo REUNI estudado por Pessoa e Rasmussen (1992) que utilizava o termo combinatorial do UNIQUAC sem modificações.

O modelo foi composto por: termo combinatorial Flory_FV + Termo residual UNIQUAC com parâmetros dependentes de composição + Termo de longo alcance DH (carga líquida da proteína diferente de zero).

Alguns resultados podem ser visualizados nas Figuras E.15, E.16 e E.17. Percebe-se que foi possível obter desvios satisfatórios (menores que 2%) da correlação de dados em toda a faixa de força iônica analisada para apenas alguns sistemas. Para alguns sistemas, por exemplo o apresentado na Figura E.15, apesar do desvio ser de 21% o resultado qualitativo é bastante satisfatório. Há, entretanto, sistemas onde o desvio é superior a 80%.

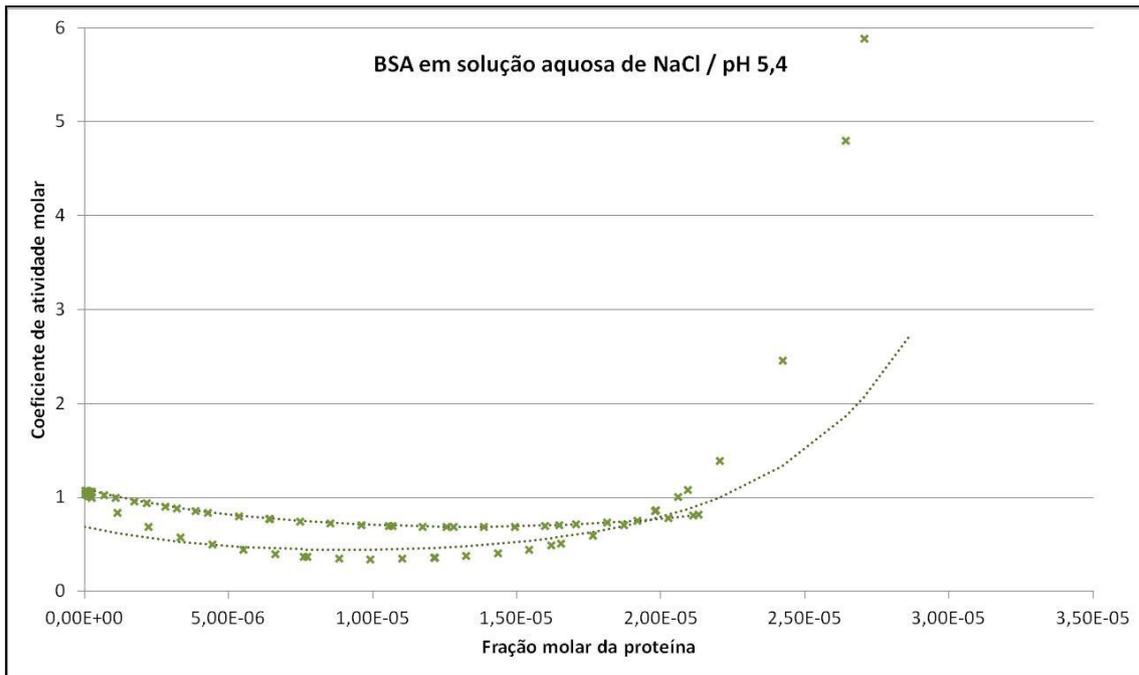


Figura E.15 – Estimação de parâmetros de dados de BSA em pH 5,4 com diferentes concentrações de NaCl. RMSD =21,13%

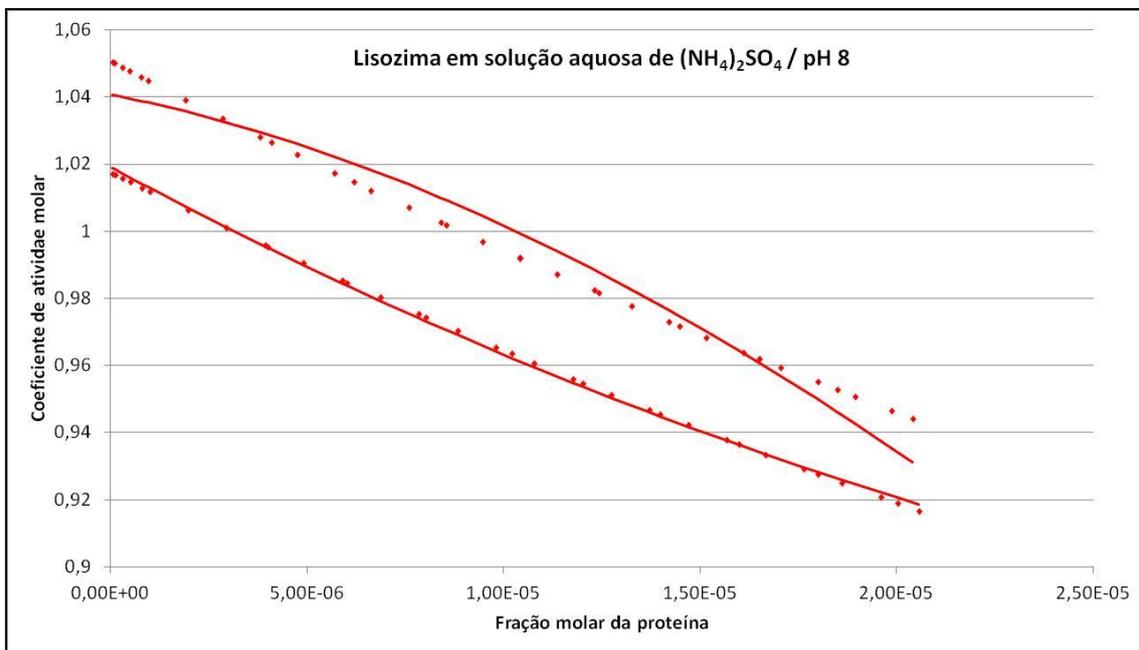


Figura E.16 – Estimação de parâmetros de dados de Lisozima em pH 8,0 com diferentes concentrações de (NH₄)₂SO₄. RMSD =0,47%

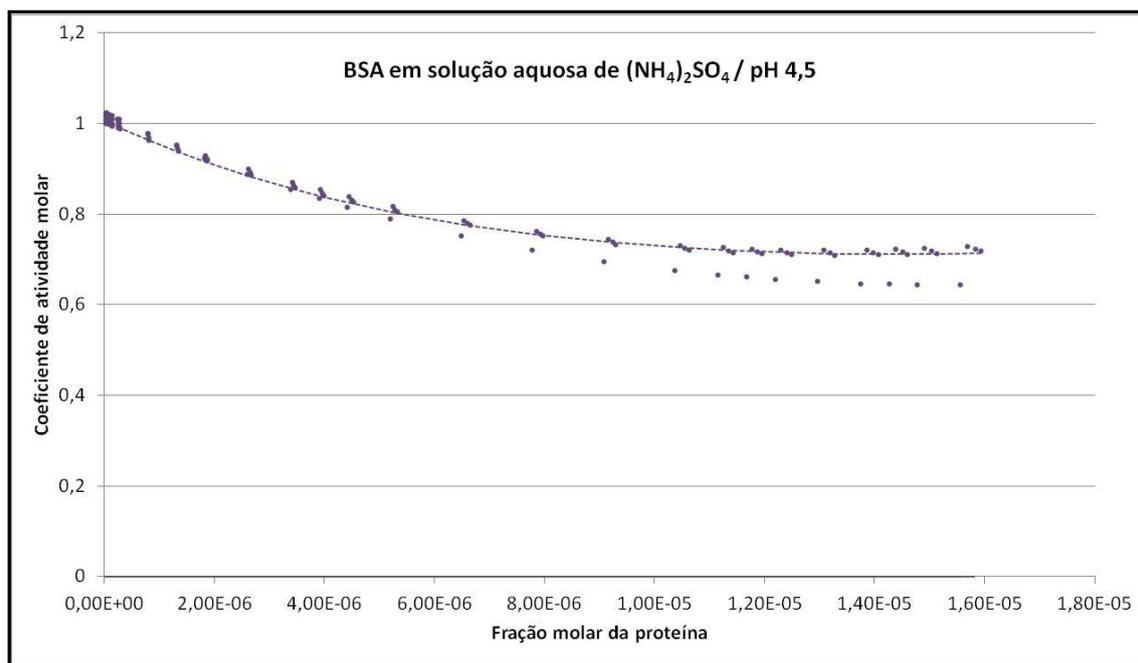


Figura E.17 – Estimação de parâmetros de dados de BSA em pH 4,5 com diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. RMSD = 86,60%

Conclusões parciais: a utilização de parâmetros de interação energética com dependência de composição possibilita a predição dos valores de coeficiente de atividade de sistemas de soluções salinas com proteínas para toda a faixa de força iônica avaliada, apenas em alguns casos com desvios satisfatórios. Em contrapartida, o dobro do número de parâmetros precisa ser estimado (u_{ik}^0 e $\delta_{ij,k}$ ao invés de apenas u_{ij}).

E.5.6 Avaliação da influência dos parâmetros de forma e volume do modelo UNIQUAC

A última análise realizada foi relativa à influência dos parâmetros de forma e volume do modelo UNIQUAC. Para tal avaliação os parâmetros r e q de todos os componentes foram estimados simultaneamente à estimação dos parâmetros de interação energética.

A influência dos parâmetros foi avaliada em dois modelos:

- i. Termo combinatorial UNIQUAC + Termo residual UNIQUAC + Termo Longo Alcance DH;

- ii. Termo combinatorial UNIQUAC + Termo residual UNIQUAC modificado com parâmetros dependentes de composição + Termo Longo Alcance DH.

Foram avaliadas a influência individual e combinada dos parâmetros conforme esquema apresentado na Figura E.18 em um total de sete avaliações para cada modelo.

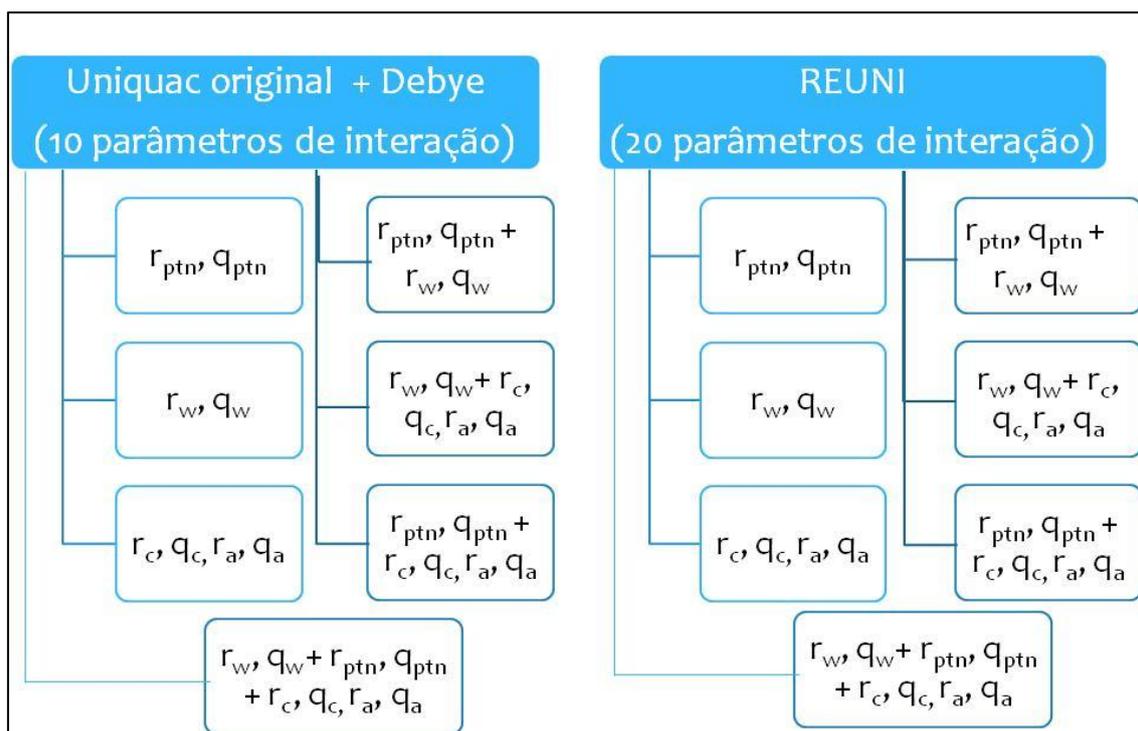


Figura E.18 – Esquema da avaliação da influência dos parâmetros de forma e volume

Os melhores resultados encontrados foram com a utilização do modelo UNIQUAC original com termo de longo alcance de DH reestimando os parâmetros de forma e volume da proteína, do cátion e do ânion simultaneamente o que significa no total estimar 16 parâmetros. Todavia resultados satisfatórios foram encontrados com a utilização do mesmo modelo e reestimação apenas dos parâmetros de forma e volume da proteína correspondendo a uma estimacão de 12 parâmetros.

Conclusões parciais: A avaliação apresentou resultados satisfatórios utilizando o modelo UNIQUAC original com parâmetros r e q da proteína modificados + termo de

longo alcance DH. Foi possível encontrar um modelo parcialmente preditivo dentro das regiões de *salting-in* e *salting-out*.

A partir desse resultado, buscou-se reduzir o número de parâmetros a serem estimados. Para isso procurou-se manter o mesmo valor de r_{pm} e q_{pm} para todos os sistemas (independentemente do pH). Os parâmetros de interação $u_{a/a}$, $u_{a/c}$, $u_{c/c}$, $u_{ps/ps}$ foram retirados da literatura (segundo a conclusão parcial da seção E.5.3).

Primeiramente, foi realizada a estimação de 4 parâmetros u_{ij} , r_{pm} e q_{pm} para todos os sistemas. Em seguida, buscou-se valores fixos para alguns parâmetros. Os desvios encontrados mantendo parâmetros fixos para sistemas com diferentes pH foram satisfatórios e similares aos desvios encontrados anteriormente com a vantagem da estimação de menos parâmetros.

Essa avaliação é apresentada no corpo da Tese no capítulo de Resultados Teóricos, seção 6.1. Nesta seção, a carga líquida das proteínas utilizadas é nula, e considera-se apenas a carga dos íons. Isso se deve, especialmente ao cálculo do coeficiente de atividade do sal, visto que os parâmetros u_{aa} , u_{ac} , u_{cc} retirados da literatura foram estimados utilizando este modelo. Caso fosse empregado outros modelos, deveriam ser utilizados dados experimentais próprios para que o desvio do coeficiente de atividade do sal não fosse elevado.

Outra modificação da seção 6.1 em relação ao apresentado neste Apêndice E se deve ao estado de referência da proteína. Ao longo do estudo de avaliação de modelos apresentado neste Apêndice empregou-se como estado de referência para o sal e para a proteína o estado de diluição infinita, de tal forma que era válida a Equação E.26. Com os dados experimentais disponíveis para o estudo termodinâmico, a escolha de um estado de referência distinto não era necessária. Entretanto, o conjunto de experimentos de eluição cromatográfica possui dados com concentrações extremamente diluídas de proteínas, mas não necessariamente diluídas de sal, de tal forma que a utilização de um estado de referência distinto fez-se necessária.

E.6 Conclusões

A partir do estudo realizado foi possível definir um modelo de energia livre de

Gibbs em Excesso para ser empregado em sistemas de soluções contendo proteínas. O modelo que se mostrou mais eficaz foi o modelo UNIQUAC original acrescido de um termo de longo alcance do tipo Debye-Huckel. O modelo é parcialmente preditivo podendo ser utilizado dentro das regiões de *salting-in* e *salting-out*. Para o modelo é necessário realizar a estimação dos parâmetros de interação energética do termo residual do UNIQUAC com exceção dos parâmetros de interação íon/íon, água/íon e água/água, que podem ser retirados da literatura. Os parâmetros de forma e volume dos ânions e cátions são retirados da literatura e os parâmetros do solvente são iguais aos da água pura. Já os parâmetros de forma e volume das proteínas precisam ser estimados para uma nova proteína. Como resultado deste estudo foram estimados os valores de forma e volume (r_{pm} e q_{pm}) da ovoalbumina, BSA, lisozima e α -quimiotripsina.

APENDICE F

Estimação de parâmetros de modelos termodinâmicos para o equilíbrio de soluções proteicas com sais

Uma breve discussão sobre diferentes métodos de otimização utilizados para a estimação de parâmetros do modelo termodinâmico empregado nesta pesquisa de tese de doutorado foi realizada e apresentada no congresso “22nd European Symposium on Computer Aided Process Engineering – Escape 22” realizado em junho de 2012 em Londres.

É importante ressaltar que a análise dos diferentes métodos de otimização foi realizada para todos os sistemas estudados nesta pesquisa de tese de doutorado tendo sido obtidos resultados similares, apesar de os mesmos não serem apresentados.

Parameter Estimation of Thermodynamic Models for Equilibrium of Proteins Solutions with salts

Joana L. Borges,^a André L. H. Costa,^b Tito L. M. Alves,^a Fernando L. P. Pessoa^c

^aPEQ/COPPE/Federal University of Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos 149- Bl.G- sl.115, Rio de Janeiro, Brazil

^bDOPI/IQ/University of the State of Rio de Janeiro, R. São Francisco Xavier 524 - Rio de Janeiro, Brazil

^cDEQ/EQ/Federal University of Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos 149- Bl.E- sl.201, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

The main challenges of biomolecules production on an industrial scale can be divided into challenges in the upstream processes, which involve the product synthesis, and challenges in downstream processes involving the separation and purification of biomolecules. Among the unit operations employed in biotechnological processes, many of them need the knowledge of thermodynamic properties of the solutions, such as solubility and phase equilibrium of the system. In fact, the simulation of unit operations involved in protein purification, and therefore the prediction of the behavior of proteins in each unit operation, requires the understanding of both the phase behavior of systems and the chemical behavior of fluids in the processes. To do this, it is necessary the calculation of phase equilibrium, which can be quite complex, since it is possible to find systems with multiple phases in equilibrium, multiple chemical species distributed in phases, the presence of chemical reactions and the presence of partially or totally dissociated electrolytes. The accuracy of the results depends on model parameters that must be estimated and is fundamental for the correct process design. Usually, the numerical problem resulting of the resolution of the phase equilibrium equations corresponds to a nonlinear programming problem (NLP). In this context, the proposed paper presents an analysis of the utilization of different optimization methods for the problem of parameter estimation for the calculus of the equilibrium of solutions of proteins with salts. This optimization problem may present some particularities which difficult the utilization of traditional algorithms (e.g. multiple local optima). In this work more modern numerical techniques are employed to circumvent these obstacles.

Keywords: proteins, equilibrium, parameter estimation, optimization method

1. Introduction

Among the unit operations employed in biotechnological processes, many of them need the knowledge of thermodynamic properties of the solutions, such as solubility and phase equilibrium of the system. The accuracy of phase equilibrium calculation depends on model parameters that must be estimated and is fundamental for the correct process design. For example, the simulation of the chromatographic profile of proteins solutions involves the description of adsorption equilibrium of the system protein/ chromatographic resin. To do that, there is a need for appropriate models to represent the nonideality of the phases in equilibrium, especially the mobile phase. Therefore, there is a need of thermodynamic models able to predict satisfactorily the activitycoefficient of proteins and salts which were not well explored in adsorption modeling yet.

Literature has some attempts to describe biomolecules behavior in solution, although in most cases the works just deals with amino acids and simple peptides. Less numerous are the works modeling protein solutions. Most of it is based on the potential strengths and equations of state with interaction potential of hard spheres. These models are related to complex structures with a lot of parameters to be determined and have been applied only in narrow range of experimental conditions. Gibbs free energy models have been employed only in a few studies (Agena et al., 1997; Agena et al., 1998; Coutinho and Pessoa, 2004). This paper presents an optimization analysis of the problem of parameter estimation for the calculus of the equilibrium of proteins with salts solutions using an excess Gibbs free energy model. The optimization problem may present some particularities which difficult the utilization of traditional algorithms (e.g. multiple local optima).

2. Thermodynamic Problem

The experimental data analyzed are osmotic pressure measurements of an aqueous solution containing a protein converted to activity coefficient through a virial expansion (Wills *et al.*, 1993), as done by Agena

et al. (1997) and Coutinho and Pessoa (2004). The modeling is performed considering a binary system composed of the solute (protein) and a pseudo solvent (saline solution). The thermodynamic model used is the original UNIQUAC model with symmetrical convention for solvent and unsymmetrical convention for proteins.

2.1. System analyzed

The data are available from different system conditions from Moon *et al.* (2000) resulting in six systems. The measurements are of lysozyme in ammonium sulfate solutions over an ionic strength of 1.0 and 3.0M at pH 4, 7, and 8. Protein concentrations vary in a range from 4 to 20 g/L and temperature is always 25°C.

2.2. UNIQUAC original model

The UNIQUAC model, originally developed by Abrams and Prausnitz (1975) is an excess Gibbs free energy model composed of two additive parts: a combinatorial and a residual. The combinatorial part corresponds to an entropic contribution, which depends on the composition, shape and size of the species and only need data of pure species. The residual contribution includes the intermolecular forces responsible for the enthalpy of mixing and depends on adjustable binary interaction parameters (u_{ij}). Such parameters are estimated from experimental data and can be found in the literature for some systems. In the case of biomolecules, there are few literature data concerning the binary interaction parameters, and, therefore, these must be estimated. It is important to notice that for different systems the protein/protein interaction parameter is the same when pH and temperature are the same.

2.3. Input data

The application of the virial expansion for binary systems to link the osmotic pressure with virial coefficients is very common in literature. Although it is possible to use any equation of state to perform this relationship, the formulation using the virial coefficients is considered as the one that provides the “experimental” activity coefficient.

To calculate the parameters of shape and volume (r , q) of UNIQUAC model, Avena *et al.* (1997) developed a correlation presented in Equations 5 and 6 where M_c is the crystal molecular weight of proteins.

$$q_i = 0,0273M_c \quad (5)$$

$$r_i = 0,0362M_c \quad (6)$$

The employed properties of lysozyme are MW=1700 g/mol; $V_s=0.734\text{cm}^3/\text{g}$; $q=464.1$; and $r=615.4$. The properties of the pseudosolvents were adopted as the same as pure water (MW=18.015g/mol; $V_s=1.003\text{cm}^3/\text{g}$; $q=1.40$; $r=0.92$).

2.4. Optimization

The optimization procedure seeks the minimization of the objective function of Equation 7.

$$F_{obj} = \sum_{NDP} \left(\frac{\gamma_{exp} - \gamma_{calc}}{\gamma_{exp}} \right)^2 \quad (7)$$

where NDP is the number of data points, and the subscripts exp e calc refer to the experimental and calculated points, respectively. The estimated parameters (decision variables) are the interaction parameters.

The optimization problem is solved using a set of local optimization methods and a set of stochastic global optimization methods. The first set is composed of the methods Simplex (Press et al., 1986), Subplex (Rowan, 1990), Powell (Press et al., 1986) and BFGS (Press et al., 1986). The second set of methods contains Simulated Annealing, Particle Swarm (Kennedy and Eberhart, 1995) and Genetic Algorithm (Carroll, 1996). The tolerance of almost all methods was 10^{-8} . The maximum number of iteration of the methods was 10000. For the simulated annealing the number of moves per temperature level was 200, the temperature cooling parameter was 0.9, the maximum number of moves without acceptance was 20. For the genetic algorithm the number of individuals was 200, the number of chromosomes per individual was 30 and the maximum number of generations was 500. For Particle Swarm the number of particles was 200.

3. Results

3.1. Different optimization methods evaluation

The objective function of the parameter estimation problem generates several local optimum. Optimization methods that are very dependent of initial estimative (usually the deterministic methods like simplex) might be stuck in local optimums and give bad results.

For a specific system with salt concentration equal to 3 M and pH 8, Table 1 presents a comparison between results obtained with different optimization methods and different initial estimative. Due to

space limitations in presenting the results, Table 1 does not present all results but just the better for each method.

First, three different initial guesses were used ($u_{ij}=0$, $u_{ij}=1000$, $u_{ij}=-1000$). Such initial guesses were randomly chosen and do not represent any particular physical state. All deterministic methods couldn't effectively perform a good search and remained stuck in the initial guess since the topologic analysis of the optimization search space shows great extension of many flat areas. The same result was found with the use of Simulated Annealing. Subplex method was the only method dependent of initial estimative that in all cases was able to find optimum results.

Then, an initial guess near an optimum found by subplex method was given as initial parameters for all methods. In such scenario, BFGS and Simulated Annealing still didn't present any improved results but Powell's method and simplex method were able to reach an optimum (presented in Table 1). Wiling that BFGS and Simulated Annealing gave a better result an exhausting search for initial estimative had to be performed and is not presented here.

For the stochastic methods, Particle Swarm (PSO) and Genetic Algorithm (GA), the routine was run three times and just the best result is presented.

Table 1 – Results of different optimization methods

Method	Initial estimative			Final results			RMSD (%)
	U_p	U_p	U_p	U_p	U_p	U_p	
	s_{ps} (cal/mol)	s_{prot} (cal/mol)	$rot/prot$ (cal/mol)	s_{ps} (cal/mol)	s_{prot} (cal/mol)	$rot/prot$ (cal/mol)	
Subplex	1000	1000	1000	1093.26	800.36	952.17	0.006
Subplex	-1000	-1000	-1000	-906.73	-1199.64	-1047.82	0.006
Subplex	0	0	0	93.26	-199.64	-47.82	0.006
Powell	1000	800	900	1138.32	7424.60	5739.56	0.43
Simplex	1000	800	900	1471.35	1177.08	1324.22	0.008
GA	-	-	-	3095.24	2936.51	3730.16	13.16
PSO	-	-	-	1822.99	1415.46	1234.90	0.25

It can be observed that the best results are obtained with the subplex method. The simplex method is extremely dependent from the initial estimative but is more robust than conjugated direction methods and quasi-newton methods when the initial estimative is near an optimum. Between the stochastic methods, particle swarm shows to be better with results similar to subplex. Figure 1 shows graphically the best results of each method and the experimental data of this system.

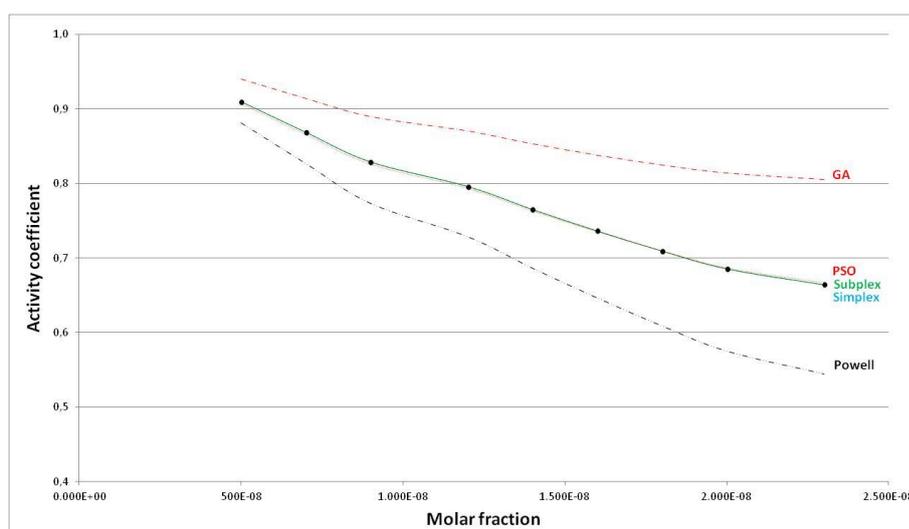


Figure 1 – Best results of activity coefficient of the system analysed for each method where the dot marks represent the experimental data and the lines represent the calculated results

3.2. Different systems results with the same optimization methods parameters

In this second part, it is presented an analysis of all six systems (Moon *et al.*, 2000) comparing subplex and PSO results which was the two method that presented better results in the first section of this

analysis. The subplex initial estimate was $u_{ij}=0$. It can be seen that subplex method has a better performance in general.

Table 2 – Root mean square deviation for the six systems studied (%)

System	Subplex	PSO
S1	0.62	0.70
S2	0.004	0.82
S3	0.005	0.07
S4	0.003	0.48
S5	1.07	1.07
S6	0.006	0.17

4. Conclusions

The numerical problem resulting from the resolution of the phase equilibrium equations for biosystems corresponds to a nonlinear programming problem (NLP). This work analyzed the use of different optimization methods for the problem of parameter estimation for the calculus of the equilibrium of solutions of proteins with salts. It could be seen that the subplex method has a better performance than the others for the optimization of the system. Although it is a method that depend on initial estimative it is very robust and not so dependent. Future investigations should extend the procedure for analyzing ternary and quaternary systems without the consideration of pseudo solvents.

5. Acknowledgments

The authors thank CNPq for the research founding.

References

- S. M. Agena; I. D. L. Bogle; F. L. P. Pessoa, 1997, "An activity coefficient model for proteins", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 55, n. 1, pp. 65–71.
- S. M. Agena; M. L. Pusey; I. D. L. Bogle, 1998, "Protein Solubility Modeling", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 64, n. 2, pp. 144-150.
- D. L. Carrol, 1996, "Chemical Laser Modeling with Genetic Algorithms". *AIAA Journal*, v. 34, n.2, pp. 338-346.
- J. A. P. Coutinho; F. L. P. Pessoa, 2004, "A Modified Extended UNIQUAC Model for Proteins", *Fluid Phase Equilibria*, v. 222-223, pp. 127–133.
- J. Kennedy, R. Eberhart, 1995, "A discrete binary version of the particle swarm algorithm", In: Proc. IEEE International Conference on Neural Networks, Perth, Australia, pp. 1942-1948.
- Y. U. Moon; C. O. Anderson; H. W. Blanch *et al.*, 2000, "Osmotic pressures and second virial coefficients for aqueous saline solutions of lysozyme", *Fluid Phase Equilibria*, v. 168, pp. 229-239.
- W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling *et al.*, 1986 **Numerical Recipes in Fortran**. Cambridge: Cambridge University Press.
- T. Rowan, 1990, Functional Stability Analysis of Numerical Algorithms. Ph.D. Thesis, University of Texas, Austin.
- P. R. Wills; W. D. Comper; D. J. Winzor, 1993, "Thermodynamic Nonideality in Macromolecular Solutions: Interpretation of Virial Coefficients", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 300, n. 1, pp. 206-212.