MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

SILVA JR, Willer Ferreira[1]; CARVALHO, Bruna Mara Aparecida[2]
willerseixas@gmail.com
[1]Centro de Pós-Graduação Oswaldo Cruz [2]Universidade Federal de Minas Gerais

Resumo: *A cromatografia de troca iônica é uma das operações mais convencionais na purificação de anticorpos monoclonais, tanto por sua capacidade de separar o produto de contaminantes, quanto pela separação de suas isoformas. Diversos modelos matemáticos, empíricos e fenomenológicos, têm sido desenvolvidos para descrever a adsorção de proteínas em resinas de trocadoras de íons, dos quais se destacam os modelos de ação de impedimento estérico, de deslocamento estequiométrico e Langmuir competitivo estendido. Junto a balanços de massa robustos, esses modelos são utilizados no desenvolvimento, otimização e escalonamento de processos, muitas vezes com o auxílio de softwares como CADET e ChromX.*

Palavras-chave: *Modelagem e Simulação de processo. Cromatografia. Anticorpo monoclonal*

Abstract: *Ion Exchange chromatography is one of the well stablished unit operations employed in monoclonal antibodies purification, both because of its capacity to separate the product from contaminants, and is variant charge separation. Many mathematical models, empirical and phenomenological have been developed to describe protein adsorption onto ion exchangers, from which one should note the steric mass action, stoichiometric displacement and extended competitive Langmuir models. Along with robust mass balance, such models are applied to process development, optimization and scale up, which counts with softwares such as CADET and ChromX, sometimes.*

Keywords: *Process modeling and simulation. Chromatography. Monoclonal antibody*

1 INTRODUÇÃO

A modelagem matemática de diferentes fenômenos, nas suas mais diversas complexidades, há muito vem sendo realizada como um meio de descrever, matematicamente, o processo analisado. Além de proporcionar uma compreensão, através da linguagem matemática, dos fatores determinantes no desencadeamento do fenômeno, a modelagem permite estudar o comportamento do sistema sob diferentes condições, através da simulação do processo em cenários variados. Na engenharia de processos, tal ferramenta é de grande valia, visto que possibilita o estudo de condições que otimizam o processo de transformação de matéria ou a operação unitária, assim como torna possível a análise da viabilidade econômica, gargalos de processo, impactos e riscos do processo, sem muito investimento econômico (PERLINGEIRO, 2005; BEQUETTE, 1998).

Dentre as operações unitárias mais importantes na produção de medicamentos biológicos em escala industrial, está a cromatografia líquida. Baseada em fenômenos físico-químicos, essa operação unitária é responsável pela separação do produto de contaminantes pela

interação diferenciada desses com a fase estacionária (resina) e fases móveis; a cromatografia é tida como processo fundamental na purificação final do produto, devido ao alto grau de pureza que se pode alcançar. Na purificação de anticorpos monoclonais (mAb, do inglês, *monoclonal antibody*), por exemplo – classe de biomolécula de suma importância no tratamento de diversos tipos de cânceres, doenças autoimunes e outras doenças degenerativas -, o consenso entre pesquisadores e profissionais da indústria biofarmacêutica propõe uma plataforma de purificação, para tais biomoléculas, composta de aproximadamente três etapas cromatográficas, a se saber: cromatografia por afinidade à proteína (AFC), cromatografia de troca iônica (IEXC) e cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) (HAGERTY *et al.*, 2009; GRÖNBERG *et al.*, 2007).

Enquanto o desenvolvimento de protocolos de purificação cromatográfica (geralmente) requer exaustivos trabalhos experimentais – hoje, grandemente reduzido pelo uso do planejamento experimental (DoE, do inglês *Design of Experiments*), o conhecimento da natureza das complexas interações intermoleculares que ocorrem nessa operação unitária, e das leis de transferência de massa e energia nela envolvida, é fundamental na racionalização do tempo e recursos empregados no desenvolvimento e melhoria de processos. Não obstante, a modelagem e simulação de processos cromatográficos tem papel estratégico no processamento de mAbs devido à intrínseca variabilidade em sua estrutura molecular, a qual se deve tanto às respostas das rotas biosintéticas celulares a estímulos do meio (cultivo celular em reator), quanto à termodinâmica que rege a estrutura do anticorpo frente às múltiplas interações intermoleculares que se dão ao longo das etapas de purificação (FEKETE *et al.*, 2015). Além disso, a modelagem de processos cromatográficos é de notável importância no escalonamento dessas operações unitárias, as quais sempre se apresentaram como um desafio para os profissionais envolvidos nessa tarefa (LIQUEO *et al.*, 2012)

Neste trabalho, os modelos matemáticos que descrevem os processos cromatográficos e as técnicas que dão suporte a tais modelos foram o foco do estudo; a cromatografia de troca iônica aqui receberam destaque, uma vez que é utilizada na purificação final (*polishing*) de anticorpos e oferece desafios na separação de proteínas de discretas diferenças estruturais entre si (p. ex. isoformas). Entretanto, visto a riqueza de trabalhos em outros campos de aplicação, estudos desenvolvidos em outros tipos de resinas cromatográficas e com outros adsorbatos (diversas proteínas, moléculas de baixo peso molecular) foram reunidos nesse artigo.

2 MODELOS MATEMÁTICOS EM PROCESSOS ADSORTIVOS

2.1 Isotermas de adsorção

A adsorção de proteínas à superfície de resinas cromatográficas em um sistema em equilíbrio termodinâmico, a uma dada temperatura, pode ser representada através de isotermas de adsorção (DORAN, 1995). Cada modelo matemático pressupõe a presença de características constitutivas no sistema (resina, ligante, anticorpo, fase móvel), firmando hipóteses para validade dos modelos, conforme descrito abaixo:

Langmuir

A isoterma de Langmuir assume que uma única camada de adsorbato (proteína, no domínio de aplicação desse artigo) se forma sobre a superfície da resina, onde todos os ligantes possuem a mesma energia de adsorção, sem que haja interação das moléculas umas com as outras, e que cada molécula de proteína se liga à uma molécula de ligante. O modelo que descreve esse tipo de comportamento adsortivo é dado pela equação (1) (DORAN, 1995):

$$q = \frac{q_{\max}.C}{K_d + C} \quad (1)$$

Onde q é a concentração de proteína por volume ou massa de resina, q_{max} é a máxima quantidade de proteína ligada a cada unidade de quantidade de resina, C é a concentração proteica na fase líquida e K_d é a constante de dissociação do adsorbato do adsorvente (SILVA JR *et al.*, 2015)

Freundlich

A isoterma de Freundlich é um modelo empírico que relaciona a massa de proteína adsorvida na resina e sua concentração no meio líquido, conforme a equação (2):

$$q = K.C^{\eta} \quad (2)$$

Onde K é a constante de equilíbrio e η é a constante de capacidade (CARVALHO *et al.*, 2014). Esse modelo assume que η mols de proteína se liga a um mol de ligante e que a proteína é sempre o componente limitante do processo. Entretanto, isso só é verdade quando a quantidade de ligantes livres na resina é muito maior que a quantidade de proteínas na fase líquida.

Langmuir–Freundlich

A isoterma de Langmuir-Freundlich pode ser obtida através de um balanço de massa do sistema em estado estacionário com cinética de adsorção de ordem η. Sendo assim, as isotermas de Langmuir e de Freundlich são combinadas na equação (3):

$$q = \frac{q_{\max}.C^{\eta}}{K_d + C^{\eta}} \quad (3)$$

Onde q é a concentração de proteína por unidade de medida da quantidade de resina, q_{max} é a máxima concentração proteica na resina possível, C é a concentração proteica na fase líquida e K_d é a constante de dissociação aparente do adsorbato do adsorvente e η é o coeficiente numérico de Langmuir-Freundlich (CARVALHO *et al.*, 2014). Este modelo é bastante útil no estudo de interação de natureza heterogênea; se η está entre 0 e 1, diz-se que há uma cooperação negativa durante o processo adsortivo e a taxa de adsorção proteica diminui à medida que resina se torna cada vez mais saturada. Caso η seja igual a 1, o sistema obedece às premissas da isoterma de Langmuir, não havendo nenhuma forma de cooperação. Finalmente, caso η seja maior que 1, um efeito cooperativo ocorre ao longo do processo adsortivo.

Bi-Langmuir

A isoterma Bi-Langmuir descreve a adsorção heterogênea de proteínas em resinas cromatográficas por meio de dois mecanismos ou regiões de ligação diferentes, e é dado pela equação (4):

$$q = \frac{q_{\max 1}.k_{a1}.C}{1 + k_{a1}.C} + \frac{q_{\max 2}.k_{a2}.C}{1 + k_{a2}.C} \quad (4)$$

Onde k_{a1} e k_{a2} são as constantes de equilíbrio e q_{max1} e q_{max2} são as máximas quantidades de proteína adsorvida por unidade de resina relacionadas aos mecanismos 1 e 2, respectivamente (GRITTI; GUIOCHON, 2013). O sucesso da aplicação desse modelo reside no fato da maioria das resinas serem naturalmente heterogêneas, com sítios de ligação diferentes energias de ligação, o que supera as limitações teóricas do modelo de Langmuir.

Langmuir Competitivo

A isoterma de Langmuir competitivo (5) descreve a adsorção de adsorbato à adsorventes quando ela é afetada pela presença/adsorção de outros componentes do sistema (LIENQUEO *apud* CLOSE, 2015):

$$q_i = \frac{q_{\max}.k_{ai}.C_i}{1 + \sum k_{ai}.C_i} \quad (5)$$

Onde q_i é a quantidade da proteína analisada adsorvida por unidade de resina, C_i é a concentração dessa proteína e k_{ai} é a constante de equilíbrio associada à adsorção de cada componente. Embora isotermas de Langmuir multicomponente sejam termodinamicamente incorretas, caso o valor de q_{max} de cada componente seja diferente, esse modelo tem sido empregado com sucesso na descrição de cromatografia de troca catiônica de anticorpos monoclonais e de troca iônica de variantes (ou isoformas) de anticorpos (CLOSE, 2015). Análise frontal tem sido utilizada com sucesso na determinação de isotermas de adsorção do tipo Langmuir competitivo, utilizando-se sistemas de único componente, sistemas binários e terciários (LISEC; HUGO; SEIDEL-MORGENSTERN, 2001). Nesses estudos, evidenciou-se a discrepância das isotermas de adsorção obtidas em sistemas de único e múltiplos componentes, o que reforça a importância de se estudar sistemas complexos que mimetizem as condições reais dos processos cromatográficos.

Isoterma de Temkin

A isoterma de Temkin é aplicável à adsorção de moléculas a superfícies heterogêneas com energia de ligação uniforme. Esse modelo atende a lei de Henry e é dado pela equação (6):

$$q = q_T.\ln(1 + K_T.C) \quad (6)$$

Onde q_T é a capacidade diferencial de adsorção na superfície da resina, K_T é a constante de equilíbrio de ligação e C é a concentração de proteínas na fase líquida no equilíbrio.

Embora isotermas de adsorção tenham uma grande gama de aplicação (em diferentes processos de purificação), os parâmetros ajustados para o modelo são empíricos, tendo validade apenas para as condições nas quais o estudo foi desenvolvido. Modelos fenomenológicos, por outro lado, predizem o comportamento de um sistema em diversos cenários, dada a amplitude do espaço amostral no qual esse tipo de modelo é válido, além de fornecer informações sobre o mecanismo envolvido no processo, a nível molecular, conforme descrito nos modelos abaixo.

Isoterma de Stahlberg

O modelo de adsorção de Stahlberg é uma modificação da isoterma de Langmuir para sistemas onde a resina é passível de ser ionizada pelas condições das soluções em contato com ela. Trata-se de um modelo mais complexo e detalhado do fenômeno de adsorção a nível molecular, o qual é descrito pelas equações (7) e (8):

$$\Gamma = \Gamma_s \frac{K.\exp(-B.\Gamma).C}{1 + K.\exp(-B.\Gamma).C} \tag{7}$$

$$B = \frac{z^2.F}{\sqrt{2.I.\varepsilon_0.\varepsilon_r.R.T}} + \frac{z.F.\Psi_{carga_fixa}}{R.T} \tag{8}$$

Onde Γ_s é a capacidade de adsorção da resina quando a concentração de adsorbato (C) tende a infinito, Γ é a quantidade de adsorbato (em mol) por unidade de área de resina (em m²), K é a constante de equilíbrio¸ B é um parâmetro relacionado à força iônica da solução (I) e a sua energia térmica, z é a valência dos íons da solução, F é a constante de Faraday, $\varepsilon_0\varepsilon_r$ é a permissividade da solução, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura e $\psi_{carga\ fixa}$ é a constante de energia potencial da superfície da resina criada pelas cargas fixas na resina.

Modelo de ação de impedimento estérico (SMA)

O modelo de ação de impedimento estérico (SMA, *Steric Mass Action*) foi desenvolvido por Brooks e Cramer (1992) em meados de 1992 através da análise do equilíbrio adsortivo/dessortivo não linear de proteínas em resinas de troca aniônica. Tal modelo considera tanto o deslocamento estequiométrico de íons de carga oposta a da resina, quanto o impedimento estérico causado pela própria proteína, zonas de presença do ligantes, e a presença de contra íons, dentre outros, o que geralmente reduz a eficiência do processo (BROOKS; CRAMER, 1992; CARVALHO *et al.*, 2016). A equação (9) representa o modelo de ação de impedimento estérico, enquanto (10) é o modelo simplificado de (9) para sistemas que consideram soluções proteicas diluídas:

$$q = K.C.\left[L - (\sigma + n)q\right]^n \tag{9}$$

$$m = \frac{q}{C} = KL^n \tag{10}$$

Onde m é o coeficiente de partição da proteína entre a resina e a fase líquida, q é a quantidade de massa proteica adsorvida por unidade volumétrica de resina, C é a concentração proteica no meio líquido, K é a constante de equilíbrio, L é a densidade de ligantes na resina, σ é o fator estérico e n é o número característico de regiões de ligações (número de regiões da molécula que se ligam à resina). Embora esse modelo (5) assuma a condição de solução diluída ($C \rightarrow 0$), ele pode ser utilizado com considerável precisão em sistemas com concentração proteica maior, caso K seja calculado a partir de dados obtidos nessas condições (CARVALHO *et al.*, 2016).

A aplicabilidade de algumas dessas isotermas dependerá da composição e complexidade do sistema e natureza do processo adsortivo (troca iônica, formação de complexos de transição, bioafinidade, interações não específicas, interação hidrofóbica) (DORAN, 1995). Na purificação de IgY (imunoglobulina do tipo Y) através da sua adsorção em uma resina

macro porosa com Cu^{2+} imobilizado a IDA (ácido imidoacético), Silva Jr e colaboradores (2015) observaram que o modelo que melhor descreveu tal processo foi o de Langmuir–Freundlich ($R^2 \geq 0,97$), embora o modelo de Langmuir também tenha sido satisfatório. A isoterma de Langmuir–Freundlich também foi a que apresentou maior acurácia na predição da coordenação positivamente cooperativa da lactoferrina em resina de IDA-Cu^{2+} (CARVALHO *et al.*, 2014), o que indica que a redução dos graus de liberdade do estudo (quando comparado com a isoterma de Langmuir) pela adição da constante η é compensada pela melhora da estimativa do modelo, o que pode ser entendido como um refinamento da modelagem pelo detalhamento da teoria de cinética de ligação, a nível molecular, que resulta na isoterma de Langmuir–Freundlich.

Já nos experimentos realizados por Carvalho e colaboradores (2016), o modelo SMA foi empregado com sucesso em condições de concentração de lactoferrina próximas de 1 mg/ml e pH 8, onde teoricamente, interações eletrostáticas podem ter contribuído para o processo adsortivo no sistema analisado, ainda que a coordenação organometálica deva ter efeito majoritário na ligação proteína-quelante. Em casos como este, a isoterma Bi-Langmuir pode ser de extrema utilidade para o entendimento da contribuição de cada mecanismo de ligação na capacidade adsortiva final da resina (GRITTI; GUIOCHON, 2013). Gritti e Guiochon (2010), por exemplo, concluíram que o modelo Bi-Langmuir foi extremamente necessário para compreender o mecanismo adsortivo-dessortivo de nicotinato de sódio em resina BEH-C_{18} para cromatografia em fase reversa. Nesse modelo, o valor de q_{max1} foi maior quando solução de maior força iônica foi utilizada durante a injeção do nicotinato de sódio – adsorção dirigida pelo fenômeno de “salting-out” -, enquanto q_{max2} foi menor nessas mesmas condições, indicando a prevalência do efeito de impedimento da adsorção por formação de cargas.

Se por um lado vários modelos sofisticados de isoterma de adsorção são desenvolvidos à luz da cinética e do fenômeno adsortivo a nível molecular (levando em consideração as múltiplas interações em um sistema multicomponente e o princípio da interação em questão), por outro, muitas vezes tal sofisticação não vale o esforço experimental e computacional, uma vez que nem sempre são capazes de reduzir o desvio da estimativa. Nos estudos realizados por Lisec e colaboradores (2001), o uso no modelo Bi-Langmuir não resultou em uma melhora expressiva na descrição dos dados experimentais obtidos na adsorção de fenol, 2-feniletanol e 3-fenil-1-propanol em resina Kromasil 100-5C_{18} para cromatografia em fase reversa, quando comparado com o modelo de Langmuir. Nesse mesmo estudo, embora a teoria da solução adsorvida real (RAS, *Real Adsorbed Solution*) tenha sido mais eficaz que a teoria da solução adsorvida ideal (IAS, *Ideal Adsorbed Solution*) na predição dos dados experimentais, dado seu maior grau de liberdade, ela não se mostrou significantemente superior ao modelo de Langmuir competitivo, o qual é considerado bastante mais simples que a RAS e IAS.

Dorkó e colaboradores (2016) utilizaram a simulação de Monte Carlo para descobrir qual a precisão necessária para que os dados de isotermas de adsorção obtidos pelo modelo de Freundlich e Bi ou Tri- Langmuir sejam significativamente distintos. Os valores de q resultantes da simulação através das isotermas de Freundlich, Bi e Tri- Langmuir em valores equidistantes de C foram similares, apresentando um desvio máximo de 7% entre as estimativas resultantes das isotermas de Freundlich e Bi- Langmuir, enquanto o mesmo erro foi de 1,1% entre os valores simulados através das isotermas de Freundlich e Tri- Langmuir. A despeito da evidência de que isotermas de Langmuir, Bi- Langmuir e Tri- Langmuir podem ser utilizadas com sucesso para prever dados de adsorção de sistemas com comportamento *freundlichiano*, as constantes desses modelos apresentam grande variabilidade em um mesmo sistema submetido a condições diferentes de adsorção, o que não é desejável, visto que essa característica confere baixa reprodutibilidade ao modelo.

Quanto ao método experimental empregado na obtenção de dados de adsorção de proteínas em resinas cromatográficas, os mais comuns são os sistemas em tanque agitado e a

análise frontal. Embora a análise de isotermas obtidas de experimentos realizados em batelada e sistema de tanque agitado tenha grande relevância na determinação das melhores condições de adsorção/dessorção de proteínas nas resinas em estudo, além de possibilitar o entendimento do efeito desses parâmetros na termodinâmica do processo com um planejamento experimental de baixo custo, seu emprego na predição de processos cromatográficos em escala industrial é limitado. Isso decorre do fato das constantes das isotermas (q_{max}, por exemplo) serem obtidas em condições de equilíbrio termodinâmico e de transferência de massa geralmente não atingidos no processo dinâmico da cromatografia líquida (MILLIPORE, 2015), devido ao tempo de residência dos fluidos utilizados nessa operação unitária serem menores que o tempo para se atingir o equilíbrio, a presença da dispersão axial e pressão do sistema cromatográfico.

Uma alternativa para a obtenção de isotermas mais realísticas, é o emprego da técnica de análise frontal, onde o adsorbato é injetado na coluna em pulsos, diversas vezes – cada qual a uma concentração diferente, mas com volume de injeção igual – seguido de dessorção do adsorbato. As isotermas são então derivadas dos resultados obtidos das curvas BTC (*breakthrough curve*) e de equações que correlacionam q com a concentração do soluto e o volume ou tempo levado para se atingir a condição de BTC (LISEC; HUGO; SEIDEL-MORGENSTERN, 2001). O método da área equivalente é geralmente utilizado para se estimar este tempo (t_{eq}) e os valores de q a diferentes valores de C, conforme o balanço de massa descrito pela equação (11):

$$q(C) = Q.C.\frac{t_{eq} - t_0 - t_{ex}}{V_c - Q.t_0} \tag{11}$$

Onde Q é a vazão utilizada no método cromatográfico, C é a concentração de adsorbato na amostra injetada, t_{eq} é o tempo para se atingir a condição de área equivalente na BTC, t_0 é o tempo morto da coluna, t_{ex} é o tempo referente ao deslocamento do fluido nas tubulações exteriores à coluna (das bombas ao detector de UV) e V_c é o volume da coluna (GRITTI; GUIOCHON, 2010).

Recentemente, Wang e colaboradores (2017) propuseram o uso de redes neurais artificiais para a obtenção de parâmetros de isotermas de adsorção e de transferência de massa em cromatografia, como uma alternativa aos métodos puramente experimentais, os quais são geralmente dispendiosos. Nesse trabalho, os autores utilizaram o algoritmo de Levenberg–Marquardt para estimar os parâmetros do modelo de isoterma de deslocamento estequiométrico (SDM, *Stoichiometric Displacement Model*) – o qual relaciona a quantidade de sal adsorvido na resina com a sua capacidade iônica, a carga característica e quantidade de cada molécula adsorvida à resina (uma aplicação particular do SMA) – e uma estrutura topológica de multicamadas na rede neural artificial criada no MATLAB® (18 neurônios na camada oculta e 3 neurônios na camada de saída). O treinamento da rede neural nos experimentos *in silico* forneceu valores de constante de equilíbrio, coeficiente de transferência de massa e carga característica para as proteínas IgG, citocromo C e lisozima, que resultaram em modelos com grande acurácia, o que foi evidenciado pela comparação entre os cromatogramas simulados a partir dos modelos de transporte dispersivo e de isoterma de deslocamento estequiométrico utilizando os parâmetros estimados mencionados acima, com os cromatogramas advindos da purificação do sistema ternário composto pelas três proteínas descritas anteriormente.

3.2 Modelos de estado transiente

Embora modelos que levem em conta o equilíbrio termodinâmico na descrição do perfil de eluição de adsorbatos, em baixas concentrações, sejam eficientes em seus propósitos, eles falham em prever o efeito cinético no processo cromatográfico (LISEC; HUGO; SEIDEL-MORGENSTERN, 2001). O adequado balanço de massa das moléculas de proteína em um sistema adsortivo de leito fixo resulta na equação (12) (DORAN, 1995; DEEMTER, 1956; GHOSH *et al*, 2014):

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \upsilon \frac{\partial c}{\partial z} = D_a \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial q}{\partial t} \tag{12}$$

Onde c e q são as concentrações de proteína nos meios líquido e sólido (adsorvente), respectivamente, t e z denotam tempo e a distância da entrada da coluna cromatográfica até o ponto da resina onde o processo é analisado, D_a é o coeficiente de dispersão axial efetivo, ε é a fração vazia da resina e υ é a velocidade intersticial do fluido. ε pode ser obtido pela equação (13), ao passo que υ é obtido pela equação (14) e D_a pela relação (LISEC; HUGO; SEIDEL-MORGENSTERN, 2001) (15):

$$\varepsilon = \frac{V_T - V_S}{V_T} \tag{13}$$

$$\upsilon = \frac{Q}{\varepsilon . A} \tag{14}$$

$$D_a = \frac{\upsilon . L}{2 . N_p} \tag{15}$$

Onde V_T é o volume total da coluna cromatográfica, V_S é o volume de resina (o qual pode ser calculado através da massa e densidade do adsorvente), Q é a vazão volumétrica do fluido, A é a área croseccional da coluna, L o seu comprimento e N_p é o número de pratos teóricos da coluna.

Enquanto o primeiro e segundo termo do lado esquerdo da equação (12) correspondem à taxa variação de soluto na fase líquida nos interstícios da resina em relação ao tempo e ao longo da coluna, respectivamente, o primeiro termo da direita representa a dispersão axial do soluto. O segundo termo do lado direito representa a taxa de adsorção da proteína na superfície da fase estacionária; nesse caso as equações de isoterma de adsorção (1 a 10) podem ser utilizadas para descrever a concentração proteica na resina cromatográfica em função do tempo (DORAN, 1995). Outros modelos mais detalhados levam em consideração o transporte da molécula (proteína, por exemplo) através do filme que circunda as partículas de resina e de seus poros juntos (como no modelo de transporte dispersivo), ou separados (no caso do modelo de taxas genérico – GRM, *Generic Rate Model*), o que faz com que estes modelos difiram da equação (12) basicamente pelo termo que representa a taxa de adsorção da proteína na fase estacionária (KUMAR; RATHORE, 2017). Segundo Lienqueo (2011) e colaboradores, o modelo de taxas genérico – equação (16) - é o mais completo e vem sendo utilizado com sucesso na descrição de processos de cromatografia de troca iônica, de afinidade, de interação hidrofóbica, embora alguns autores tenham utilizado esse modelo em cromatografia por exclusão molecular.

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + \upsilon \frac{\partial c_i}{\partial z} = D_{a,i} \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2} - \varepsilon_{p,i} \frac{(1-\varepsilon_b)}{\varepsilon_b} k_{f,i} . \frac{3}{R_p} [c_i - q_i (r = R_p)] \tag{16}$$

Onde c_i é a concentração do componente i, $D_{a,i}$ é o coeficiente efetivo de dispersão axial para o componente i, $\varepsilon_{p,i}$ é a porosidade da partícula de resina para o componente i, ε_b é a porosidade da resina, $k_{f,i}$ é o coeficiente de transferência de massa do componente i, R_p é o raio da partícula e q_i é a concentração do componente i na resina, dado pela isoterma de adsorção selecionada.

Conhecidos os valores de D_a, ε, k_f, υ e as constantes intrínsecas da isoterma de adsorção que melhor descreve o sistema cromatográfico em estudo (tipo de resina e cromatografia, características da proteína em solução, número de componentes do sistema), a concentração da proteína purificada no eluído que sai da coluna pode ser estimada, resolvendo a equação diferencial (12) de forma analítica ou numérica - no caso da equação (16). Entretanto, a determinação de alguns parâmetros pode requerer inúmeros experimentos, o que torna a calibração do modelo mais onerosa. Para superar tais impasses, coeficientes de transferência de massa são estimados através de correlações com números adimensionais. Schwellenbach e colaboradores (2016) por exemplo, durante a modelagem da purificação de anticorpos monoclonais em membrana de troca catiônica, utilizaram a correlação entre o número de Schmidt e Reynolds proposta por Wilson e coautores para calcular o número de Sherwood, do qual se calculou o coeficiente de transferência de massa externo (deslocamento da molécula da fase móvel para a camada de hidrogel). O coeficiente de transferência de massa interno foi determinado através do coeficiente de difusão molecular efetivo dentro da fase estagnante e utilizado junto ao coeficiente de transferência de massa externo para especificar o coeficiente efetivo (ou global) de transferência de massa.

Considerando-se uma coluna ideal (sem dispersão axial) e uma adsorção *langmuiriana*, a solução da equação (12) (sem o termo de fluxo difusivo), por exemplo, é dada pela equação (17):

$$C(t) = \frac{1}{K_{eq}}\left[\sqrt{\frac{k_0 . t_0}{t - t_p - t_0}} - 1\right] \tag{17}$$

Onde K_{eq} é a constante de equilíbrio adsortivo-desortivo de Langmuir, t, t_p e t_0 denotam tempo, o tempo de injeção e o tempo morto da coluna, k_0 representa o fator de retenção do adsorbato, sendo que $(t-t_p-t_0)/(k_0.t_0)$ equivale ao tempo adimensional τ e C é a concentração do adsorbato na saída da coluna cromatográfica (GRITTI; GUIOCHON, 2013).

A consideração de idealidade do processo, onde apenas aspectos puramente termodinâmicos são levados em consideração na solução da equação (12), geralmente é uma premissa adotada. Tais considerações possibilitaram Gritti e Guiochon (2013) chegar a uma solução algébrica de (12), para um sistema adsortivo de comportamento *bi-langmuiriano*, o que resultou na redução de esforço computacional, de consumo de reagentes e de tempo na determinação de parâmetros da isoterma de adsorção de fenol em coluna Poroshell C_{18}, quando comparado com o método de análise frontal. Segundo Golshan-Shirazi e Guiochon (1992), em colunas com número de pratos teóricos maior que 100 e cinética de transferência de massa não demasiadamente baixa, a solução analítica Van Deemter e colaboradores (uma equação do tipo de distribuição de probabilidade de variância populacional de Gauss) para a equação (12) é válida. A acurácia dessa solução, entretanto, é reduzida quando sistemas multicomponentes e de adsorção de caráter não-linear são considerados.

Embora algumas soluções analíticas do modelo de equilíbrio dispersivo estejam disponíveis, suas aplicações são limitadas pelas simplificações que são feitas para possibilitar a solução da equação diferencial. Desse modo, soluções numéricas utilizando métodos como o de elementos finitos e de diferenças finitas são utilizados para simular processo cromatográficos para diferentes sistemas. Segundo Horvátha e colaboradores (2010), embora

o método de colocação ortogonal em elementos finitos seja mais acurado que o método de diferenças finitas e tenha sido empregado na solução da equação (12), ele é mais moroso que o segundo método. No trabalho desenvolvido pelos mesmo autores, o algoritmo de Martin-Synge - modelo que idealiza a coluna cromatográfica como vários tanques contínuos em série, onde os produtos de um tanque (também chamado de prato) alimentam os subsequentes – foi utilizado para resolver a equação diferencial do modelo de equilíbrio dispersivo em cada prato, através do código Runge-Kutta-Fehlberg para solução de EDOs. Tal método se mostrou robusto e rápido, bem como eficaz na simulação do perfil de eluição de componentes únicos e múltiplos componentes, o qual foi descrito pelas equações (18) e (19):

$$c[t] = \frac{1}{\tau}.e^{\frac{1}{\tau}}.\left(\frac{t}{\tau}\right)^{(N-1)}.\frac{1}{(N-1)!} \tag{18}$$

$$\tau = \frac{L.(1+k)}{\upsilon.N} \tag{19}$$

Onde $c[t]$ é a concentração da molécula eluída, N é o número de pratos teóricos, t é o tempo, τ é o tempo de residência da molécula na coluna de comprimento L, k é o fator de retenção da molécula e υ é a velocidade linear do fluido pela coluna.

O modelo de pratos mencionado acima foi desenvolvido por Martin e Synge e possui como premissa, uma adsorção linear. Esse modelo teórico não leva em consideração o mecanismo de adsorção, mas a situação ideal em que os compostos de maior e menor afinidade à resina se separam a cada prato. A altura equivalente a cada prato teórico (HETP, *height equivalent to a theoretical plate*) é uma importante medida resultante dessa teoria, através da qual pode-se medir o efeito de parâmetros operacionais na separação de misturas e a reprodutibilidade de características de colunas empacotadas em diferentes escalas (VAN DEEMTER; ZUIDERWEG, KLINKENBERG, 1956). Embora esse modelo – equação (20) - tenha sido empregado na modelagem da purificação cromatográfica de diferentes proteínas, incluindo anticorpos monoclonais, ele não é adequado para cromatografia preparativa ou adsorções do tipo *langmuiriana* (LIENQUEO, *et al.* 2011).

$$\frac{dC_i}{d\tau} = \frac{N_p.(C_{i-1} - C_i) - C_i..H.\dfrac{dK(C_i.I_i)}{dI}\dfrac{dI}{d\tau}}{1 + H.\left[K.(C_i.I_i) + C_i\dfrac{dK(C_i.I_i)}{dC_i}\right]} \tag{20}$$

Onde C_i é a concentração proteica em cada prato, N_p é o número de pratos teóricos, H é a razão entre a fase estacionária e a fase móvel em cada prato, K é o coeficiente de distribuição da proteína, I_i é a força iônica em cada prato e τ é o tempo adimensional.

4 MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Conforme descrito anteriormente, o modelo de estado transiente mais completo e amplamente utilizado é GRM. No que tange o termo que descreve a adsorção de anticorpos monoclonais (e outras proteínas), as isotermas de Freundlich e de Temkin são raramente utilizadas para modelagem da purificação cromatográfica de anticorpos monoclonais; essas isotermas pressupõem uma adsorção linear ou próximo da linearidade, o que não é factível em cromatografia preparativa. Os modelos SMA, SDM, Langmuir competitivo e Langmuir tem

sido utilizados na modelagem de cromatografia de troca iônica, sendo o SMA e SDM os de maior relevância, por suas naturezas fenomenológicas intrínsecas do processo de troca iônica. Em cromatografia de troca iônica, por exemplo, a constante de equilíbrio $k_{a,i}$, definida como igual à constante de adsorção dividida pela constante de dessorção é relacionada à força iônica da fase móvel pela equação (21) (ORELLANA; SHENE; ASENJO, 2009):

$$\log_{10}(k_{a,i}) = \alpha_i - \beta_i I_m \tag{21}$$

Onde α_i e β_i são constantes empíricas características de cada proteína que, segundo Yamamoto (FORRER, 2008), estão relacionadas à partição de proteína entre as fases estacionária e móvel, e o número de cargas envolvidas na adsorção, respectivamente; por outro lado, I_m é a força iônica do modulador na solução em contato com a resina.

São de notória relevância os trabalhos desenvolvidos por Yamamoto e seus colaboradores no campo da modelagem de cromatografia de troca iônica de proteínas. Tais pesquisadores desenvolveram um método conciso de determinação de α e β correlacionando-os com a força iônica no pico da proteína eluída e, a taxa do gradiente linear padronizado de eluição (GH) e o modelo SMA, pelas equações (22) e (23). Pela análise gráfica de log(GH)xlog(I_m), as constantes mencionadas acima podem ser facilmente calculadas (FORRER, 2008):

$$GH = \frac{I_m^{(\beta+1)}}{[\alpha.(\beta+1)]} \tag{22}$$

$$\alpha = K..\Lambda^{\beta} \tag{23}$$

Onde $GH = g$ (taxa do gradiente, em mol/mL).($V_t - V_0$), onde V_t é o volume total de resina e V_0 é o seu volume morto, K é a constante de equilíbrio e Λ é a capacidade de ligação da resina (apresentada no item 3.1 como L).

Ishihara, Kadoya e Yamamoto (2007), propuseram um método de escalonamento para cromatografia de troca catiônica baseado na taxa do gradiente linear padronizado e mantendo o adimensional O [equação (24)] constante, o que possibilita a variação da altura da coluna e a velocidade linear utilizada, os quais são mantidos constantes em métodos clássicos de escalonamento de processos cromatográficos, trazendo o inconveniente de limitação do sistema por aumento de pressão da coluna, instabilidade do leito, distribuição não homogênea do líquido ao longo da resina e indisponibilidade de colunas em tamanhos específicos no mercado.

$$O = \frac{Z.I_a}{[G.HTPE_{LEG}]} \tag{24}$$

Onde Z é a altura da coluna, I_a é um número dimensional igual a 1, G é a taxa do gradiente linear normalizado com o volume morto da coluna e $HTPE_{LEG}$ é a altura de um prato teórico equivalente alcançado na eluição por gradiente linear, o qual pode ser correlacionado com a velocidade linear para propiciar a escolha adequada do fluxo. No trabalho desenvolvido pelos autores, o escalonamento da escala analítica, preparativa para a piloto, tanto para cromatografia de troca aniônica quanto catiônica, levou a resoluções iguais, durante a separação de β-lactoglobulina A e B e material parcialmente purificado contendo a proteína recombinante recP, mesmo quando diferentes valores de altura da coluna, fluxo, e gradiente de eluição foram selecionados para as diferentes escalas (ISHIHARA, KADOYA E YAMAMOTO, 2007).

Além de compreender melhor o fenômeno envolvido na adsorção para o sistema escolhido, a modelagem do processo tem como aplicação direta a simulação da operação, de modo que se possa estimar o perfil de eluição e resolução da purificação em diversos cenários. Com o apoio da simulação, pode-se também encontrar os valores das variáveis que otimizam a função objetivo. Kumar e Rathore (2017) dão um bom exemplo do passo a passo de como realizar experimentos *in silico* para otimização da cromatografia de troca iônica de isoformas de anticorpo monoclonal. Primeiramente, eles idealizaram o sistema de purificação como um sistema de reatores em série: um reator contínuo de tanque agitado (CSTR, *Continuous Stirred Tank Reactor*), um reator tubular (PFR, *Plug Flow Reactor*), dois CSTRs, uma coluna de leito fixo, um CSTR e um PFR no fim. CSTRs, nessa conceptualização são os misturadores e zonas de expansão da tubulação, como no caso das câmaras de sensores; os PFRs, por outro lado, representam as tubulações do sistema cromatográfico. Tal modelo é importante para se medir o *delay* e dispersão do anticorpo nos componentes do sistema cromatográfico e tem sido comumente utilizado, como nos estudos desenvolvidos por Ghosh e colaboradores (2014) para modelagem e escalonamento de cromatografia em membrana de troca aniônica (Sartobind®, Sartorius). Para descrever a migração das isoformas na coluna de leito fixo, Kumar e Rathore escolheram o modelo de taxas genérico com a isoterma de Langmuir modificada, a qual leva em consideração o sal do tampão de eluição como modulador. Após a determinação dos parâmetros do sistema cromatográfico e da coluna, os coeficientes de transferência de massa e constantes do modelo de adsorção foram estimados através de correlações com a difusividade e gráficos de Henry. Tanto a modelagem quanto a validação do modelo foram feitas no software CADET, levando a um erro residual de estimativa de 0,01. Após o passo de validação experimentos *in silico* são executados em diferentes condições operacionais para que rendimento, pureza, custo e/ou produtividade sejam otimizados.

A simulação de processos cromatográficos tem sido realizada através de diferentes ferramentas; dentre os softwares adequados para cromatografia não linear estão Aspen Chromatography, pcs, CADET, ChromWorks, Chromulator, gProms e ChromX, cada qual com suas facilidades e limitações, como dependência de licenças para uso (Aspen Chromatography, pcs, ChromWorks e gProms) e interface interativa (Chromulator, ChromX) (HANH, *et al.* 2015). ChromX (GoSilico, Karlsruhe, Germany) tem sido utilizado em diversos estudos para a simulação de processos cromatográficos. Hanh e colaboradores (2015) fornecem uma boa descrição das ferramentas e aplicações do software. Segundo eles, é possível estimar parâmetros do modelo de equilíbrio dispersivo e da isoterma selecionada para o tipo de cromatografia (Langmuir, SMA, dentre outras) através do ajuste dos parâmetros à curva do cromatograma e sistema de componente único ou múltiplo componente, simular cromatografias em paralelo, quando se deseja avaliar diferentes perfis de eluição, por exemplo, além de otimizar o processo, selecionando uma função objetivo (rendimento, pureza, dentre outros). Esse software vem sendo utilizado pelos autores para fins pedagógicos, dadas as suas funcionalidades, coerência teórica e interatividade.

2 CONCLUSÃO

Embora muitos modelos de isotermas de adsorção estejam disponíveis, a seleção de uma delas para a pesquisa a ser desenvolvida deve estar de acordo com as características do sistema em estudo, sendo que muitas vezes, modelos mais simples - como o de Langmuir – fornecem resultados satisfatórios. A modelagem da cromatografia de troca iônica tem sido feita majoritariamente através do modelo de taxas genérico com isotermas de Langmuir competitivo, modelo de ação de impedimento estérico ou de deslocamento estequiométrico, através de soluções numéricas, muitas vezes realizadas com o apoio de softwares para

cromatografia, como o CADET, ChromX, ChromWorks e Aspen Chromatography. O método mais utilizado para a calibração desses modelos são análise frontal com testes de transferência de massa em sistema cromatográfico, embora o uso de redes neurais artificiais tenham se mostrado eficientes para estes fins. Finalmente, os estudos de compreensão da cromatografia de troca iônica desenvolvidos recentemente por Yamamoto e seus colaboradores têm sido de grande importância na modelagem desse tipo de operação unitária.

REFERÊNCIAS

BEQUETTE, B. W. **Process dynamics: modeling, analysis and simulation**. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1998, 621 p.

BROOKS, C. A., CRAMER, S. M. Steric Mass-Action Ion Exchange: Displacement Profiles and Induced Salt Gradients. **AIChE Journal,** v. 38, n. 12, p. 1969 – 1978, 1992.

CARVALHO, B. M. A. *et al*. Interaction of Whey Lactoferrin with Copper Immobilized in Polyacrylamide Cryogel. **J Bioproces Biotech,** v. 4, n. 7, p. 1-7, 2014.

CARVALHO, B. M. A. *et al.* Steric mass action model for lactoferrin adsorption in cryogel with immobilized copper ions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 1, p. 215 - 223, 2016.

CLOSE, E. J. **The derivation of bioprocess understanding from mechanistic models of chromatography**. 2015. 207 f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Departamento de Engenharia Bioquímica, University College London, Londres, 2015.

DORAN, M. P. **Bioprocess Engineering Principles**. 2. ed. Sidney: Elsevier Science & Technology Books, 1995.

DORKÓ, Z., SZAKOLCZAI, A., TÓTH, B., HORVAI, G. Relationship between commonly used adsorption isotherm equations impedes isotherm selection. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v. 61, n. 1, p. 10-14, 2017.

FEKETE, S., BECK, A., FEKETE, J., GUILLARME, D. Method development for the separation of monoclonal antibodycharge variants in cation exchange chromatography, Part I: Saltgradient approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 33–44, 2015.

FORRER, N. **Antibody purification with ion-exchange chromatography**. 2008. 179 f. Tese (Doutorado em Ciência) - ETH Zurich, Zurich, 2008.

GHOSHA, P. *et al.* Model-based analysis and quantitative prediction of membrane chromatography: Extreme scale-up from 0.08 ml to 1200 ml. **Journal of Chromatography A**, v. 1332, p. 8–13, 2014.

GOLSHAN-SHIRAZIG, S., GUIOCHON, G. The Equilibrium-Dispersive Model of Chromatography. In: DONDI, F., GUIOCHON, G. **Theoretical Advancement in Chromatography and Related Separation Techniques**. Netherlands: Springer Science & Business Media, 1992.

GRITTI, F., GUIOCHON, G. Comparison between heterogeneous multi-Langmuir and homogeneous electrostatically modified Langmuir models in accounting for the adsorption of small organic ions in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5584–5594, 2010.

GRITTI, F., GUIOCHON, G. Analytical solution of the ideal model of chromatography for a bi-Langmuir adsorption isotherm. **Anal Chem**, v. 85, n. 18, p. 8552-8558, 2013.

GRÖNBERG, A., MONIÉ, E., MURBY, M., RODRIGO, G., WALLBY, E., JOHANSSON, H. J. A strategy for developing a monoclonal antibody purification platform. **BioProcess International**, 2007. Disponível em: <http://www.bioprocessintl.com/wp-content/uploads/2014/05/070105ar06_76597a.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2018.

HAGERTY, T., MENSAH, P., GLYNN, J., PABST, T., ANNATHUR, G., RAMASUBRAMANYAN, N., JOHNSON, P., THOMAS, K. The Development and Application of a Monoclonal Antibody Purification Platform. **BioPharm International**, v. 2009, n. 7, p. 1-4, 2009.

HAHN, T., HUUK, T., HEUVELINE, V., HUBBUCH, J. Simulating and Optimizing Preparative Protein Chromatography with ChromX. **J. Chem. Educ.**, v. 92, p. 1497−1502, 2015.

HORVÁTH, K., FAIRCHILD, J. N., KACZMARSKI, K., GUIOCHON, G. Martin-Synge algorithm for the solution of equilibrium-dispersive model of liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 8127–8135, 2010.

KUMAR, K., RATHORE, A. S. Mechanistic Modeling of Preparative Ion-Exchange Chromatography. **BioPharm International**, v. 30, n. 4, p. 1-3, 2017.

LIENQUEO, M. E., MAHN, A., SALGADO, J. C., SHENE, C. Mathematical Modeling of Protein Chromatograms. **Chem. Eng. Technol.**, v. 35, n. 1, p. 46–57, 2012.

LISEC, O., HUGO, P., SEIDEL-MORGENSTERN, A. Frontal analysis method to determine competitive adsorption isotherms. **Journal of Chromatography A**, v. 908, p. 19–34, 2001.

MILLIPORE. **Determination of Dynamic Binding Capacity for ProSep-vA Media**: Technical Brief. Massachusetts: Millipore Corporation Billerica, 2005, p. 1-6.

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, n. 3, p. 572-581, 2009.

PERLINGEIRO, C. A. G. **Engenharia de processos: análise, simulação, otimização e síntese de processos químicos**. São Paulo: Blucher, 2005, 198 p.

SCHWELLENBACH, J., ZOBEL, S., TAFT, F., VILLAIN, L., STRUBE, j. Purification of monoclonal antibodies using a fiber based cation-exchange stationary phase: parameter determination and modeling. **Bioengineering**, v. 3, n. 24, p. 1-20, 2016.

SILVA JR, W. F. da *et al*. Adsorption of immunoglobulin Y in supermacroporous continuouscryogel with immobilized Cu^{2+}ions. **Journal of Chromatography A**, v. 1395, p. 16-22, 2015.

VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. **Chem. Engng Sci.**, v. 5, p. 271-289, 1956.

WANGA, G., BRISKOT, T., HAHN, T., BAUMANN, P., HUBBUCH, J. Estimation of adsorption isotherm and mass transfer parameters in protein chromatography using artificial neural networks. **Journal of Chromatography A**, v. 1487, p. 211-217, 2017.