

Desenvolvimento de pseudo formulações para soluções terapêuticas para avaliação de parâmetros de crioprocessamento à escala industrial

Sofia Duarte e Castro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química

Orientadores Professor Doutor Miguel Ângelo Joaquim Rodrigues Professor Doutor Vítor Manuel Geraldes Fernandes Doutor Rui de Brito Estrela

Júri

Professora Doutora Maria Filipa Gomes Ribeiro Professor Doutor Miguel Ângelo Joaquim Rodrigues Professor Doutor João Manuel Nunes Alvarinhas Fareleira

Dezembro de 2016

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Miguel, Vítor e Rui, por me aceitarem neste projeto. Agradeço todo o apoio e disponibilidade que demonstraram desde o primeiro dia. Agradeço, ainda, o incentivo, o conhecimento que me transmitiram e por todas as vezes que me ajudaram a ver tudo de uma forma mais simples.

Aos meus colegas de laboratório, por me receberem tão bem na equipa; ao Pedro, por me explicar tudo o que tinha que saber, sempre com muita paciência; à Andreia e à Ana Rita, pela companhia, pela paciência (especialmente para ouvir as minhas reclamações) e pela amizade.

Ao laboratório 7.6.12 e a todos os que lá trabalham, por me permitirem o acesso ao viscosímetro sempre que foi necessário.

Aos meus amigos, que me acompanham no dia-a-dia, que me ajudam a manter a "cabeça no sítio" e que são indispensáveis na minha vida.

Aos meus avós, por tudo.

E, por fim, aos meus pais, Isabel e Ângelo. Sem eles, nada faria sentido e nada seria possível!

iv

Resumo

Os anticorpos monoclonais (MAb) são proteínas terapêuticas que se armazenam e transportam em soluções congeladas para otimizar a produção e aumentar o tempo de vida útil. No entanto, este congelamento, armazenamento e descongelamento induz muito stress nas proteínas, o que pode comprometer a estabilidade física e, consequentemente, a conformidade das mesmas. Assim, os parâmetros inerentes ao congelamento e descongelamento devem ser muito bem definidos, de modo a evitar a degradação dos produtos durante o processo de criopreservação.

Por norma, os parâmetros são estudados em processos *scale-down* para otimização dos MAb que são muito dispendiosos, especialmente na fase inicial. Por esse motivo, surge a importância do desenvolvimento de pseudo-formulações utilizando proteínas menos dispendiosas, que possam reproduzir as propriedades reológicas e termodinâmicas das proteínas terapêuticas, sendo este o principal objetivo do trabalho.

Foi desenvolvido um estudo exaustivo da viscosidade de soluções com proteínas modelo e trealose em diferentes concentrações, numa gama de temperatura de - 7,5 a 25 °C. Foram estudados modelos matemáticos com o objectivo de correlacionar a viscosidade das proteínas modelo com as proteínas terapêuticas.

De entre os modelos estudados, selecionou-se o que melhor cumpria o objetivo e, através destes, determinou-se que uma solução com aproximadamente 4 g/dL de Ovalbumina e 10 g/dL de trealose, em pH = 4,6 ou uma solução com cerca de 12 g/dL de BSA e 10 g/dL de trealose, em pH = 4,7, pode replicar a variação da viscosidade com a temperatura do MAb estudado, na gama de temperaturas estudada.

Conclui-se que é possível mimetizar a viscosidade de soluções de MAb com as proteínas modelo estudadas.

Palavras chave: viscosidade, proteína, anticorpo monoclonal, criopreservação, temperatura

Abstract

Monoclonal antibodies (MAb) are therapeutic proteins that are ideally stored and transported in frozen solutions to optimize production and extend the shelf life. However, this cycle of freezing, storing and thawing induces much stress on the proteins, which can compromise the physical stability and consequently their compliance and market specifications. Thus, the parameters inherent in freezing and thawing must be well defined in order to avoid degradation of the products during the cryopreservation process.

Normally, the parameters are studied under scale-down conditions, especially for optimization of MAb which are very expensive proteins, especially during early stage trials. For this reason, emerge the importance of developing pseudo-formulations using relatively inexpensive proteins that can mimic the rheological and thermodynamic properties of the therapeutic proteins, which is the main goal of this work.

In this work, it was developed an exhaustive study of the viscosity of aqueous solutions containing model proteins and trehalose in different concentrations, in a temperature range of -7,5 to 25° C. Mathematical models were studied with the goal of correlating the viscosity of model proteins with therapeutic proteins.

Among the studied models, three were selected that best fulfilled the goal and, through these, it was determined that a solution with about 4 g/dL of Ovalbumin and 10 g/dL of trehalose, at pH = 4,6 or a solution with approximately 12 g/dL of BSA and 10 g/dL of trehalose, at pH = 4,7, is able to replicate the viscosity change with temperature of the studied MAb, in the studied temperature range.

It is concluded that it is possible to mimic the viscosity of MAb solutions with the model proteins studied.

Keywords: viscosity, proteins, monoclonal antibody, cryopreservation, temperature

Índice

1	1 Introdução						
	1.1	Estrutura do trabalho	1				
	1.2	Proteínas terapeuticas	1				
	1.3	Viscosidade	2				
		1.3.1 Modelos matemáticos	3				
	1.4	Objetivos gerais	8				
2	I	Parte Experimental	9				
	2.1	Reagentes	9				
	2.2	Materiais e equipamentos	9				
	2.3	Métodos	10				
	2	2.3.1 Soluções	10				
	2	2.3.2 Técnicas	11				
	2	2.3.3 Métodos Numéricos	12				
3	I	Resultados	13				
	3.1	Estudo da viscosidade de soluções com proteínas modelo	13				
		3.1.1 Efeito da concentração de proteína	13				
		3.1.2 Efeito da concentração de trealose	15				
		3.1.3 Efeito da variação do pH	16				
4	I	Discussão	17				
	4.1	Impacto da concentração na viscosidade e efeito do pH	17				
	4.2	Modelos	20				
	4	4.2.1 Critérios de comparação e seleção	43				
	4	4.2.2 Modelo 2 ajustado à BSA	44				
	4	4.2.3 Aplicação a um MAb	46				
5	(Conclusões e perspetivas futuras	49				
6	I	Referências Bibliográficas	51				
Anexo I Viscosidade das soluções de Ovalbumina e de BSA53							
Anexo II Viscosidade das soluções de MAb55							
Anexo III Viscosidade da água pura							

х

Índice de Figuras

Figura 1.	Representação esquemática da transferência de momento linear entre camadas
	de um líquido2
Figura 2.	Representação gráfica de viscosidade em função da temperatura para líquidos
	"fortes" e "fracos"5
Figura 3.	Representação gráfica da viscosidade em função da temperatura, em soluções
	com 10 g/dL de trealose e diferentes concentrações de BSA em g/dL14
Figura 4.	Representação gráfica da variação da viscosidade com a temperatura, para
	soluções com 10g/dL de trealose e diferentes concentrações de Ovalbumina em
	g/dL14
Figura 5.	Representação gráfica da variação da viscosidade com a temperatura, em
	soluções com 20 g/dL de BSA e diferentes concentrações de trealose em g/dL .15
Figura 6.	Representação gráfica da variação da viscosidade com a temperatura, para
	soluções com 10 g/dL de Ovalbumina e diferentes concentrações de trealose em
	g/dL15
Figura 7.	Representação gráfica da viscosidade em função da temperatura em soluções
	com 10 g/dL de trealose e diferentes concentrações de BSA em g/dL, a pH=716
Figura 8.	Representação gráfica da viscosidade em função da concentração de proteína, em
	soluções com 10g/dL de trealose e diferentes concentrações de BSA a diferentes
	temperaturas (K), no pl17
Figura 9.	Representação gráfica da viscosidade em função da concentração da proteína, em
	soluções com 10 g/dL de trealose e diferentes concentrações de BSA a diferentes
	temperaturas (K), a pH=718
Figura 10). Representação gráfica da variação da viscosidade com a concentração de
	trealose, em soluções com 20g/dL de BSA e diferentes concentrações de
	trealose, a diferentes temperaturas (K)18

Figura 11. Avaliação do impacto do aumento da concentração de trealose na viscosidade
(em soluções com 10, 20 e 30 g/dL de trealose) na gama de temperaturas em
estudo19
Figura 12. Representação gráfica do parâmetro q $_0$ em função da temperatura21
Figura 13. Representação gráfica do parâmetro q_1 em função da temperatura21
Figura 14. Representação gráfica do parâmetro q_2 em função da temperatura22
Figura 15. Ajuste do Modelo 1 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)
Figura 16. Detalhe das duas curvas de menor concentração da Figura 15 (concentração em
g/dL)23
Figura 17. Representação gráfica do parâmetro A em função da temperatura24
Figura 18. Representação gráfica do parâmetro B em função da temperatura25
Figura 19. Ajuste do Modelo 2 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)
Figura 20. Detalhe das duas curvas de menor concentração da Figura 19 (concentração em
g/dL)26
Figura 21. Representação gráfica do parâmetro D em função da concentração de proteína27
Figura 22. Representação gráfica de T_0 em função da concentração de proteína28
Figura 23. Ajuste do Modelo 3 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)
Figura 24. Representação gráfica de C1 em função da concentração de proteína29
Figura 25. Representação gráfica de C ₂ em função da concentração de proteína30
Figura 26. Ajuste do Modelo 4 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)
Figura 27. Representação gráfica de η_0 em função da concentração de proteína31
Figura 28. Representação gráfica de γ em função da concentração de proteína32
Figura 29. Ajuste do Modelo 5 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)

Figura 30. Representação gráfica de m em função da concentração de proteína34
Figura 31. Representação gráfica de b em função da concentração de proteína34
Figura 32. Ajuste do Modelo 6 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)
Figura 33. Representação gráfica de m em função da temperatura (°C)
Figura 34. Ajuste do Modelo 7 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)
Figura 35. Detalhe das duas curvas de menor concentração da Figura 34 (concentração em
g/dL)37
Figura 36. Representação gráfica de a em função da concentração molar
Figura 37. Representação gráfica de b em função da concentração molar
Figura 38. Ajuste do Modelo 8 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)
Figura 39. Detalhe das duas curvas de menor concentração da Figura 20 (concentração em
g/dL)40
Figura 40. Representação gráfica de a em função da concentração de ovalbumina41
Figura 41. Representação gráfica de b em função da concentração de ovalbumina41
Figura 42. Representação gráfica de c em função da concentração de ovalbumina41
Figura 43. Representação gráfica de d em função da concentração de ovalbumina42
Figura 44. Ajuste do Modelo 9 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)
43
Figura 45 Representação gráfica do parâmetro A em função da temperatura45
Figura 46 Representação gráfica do parâmetro B em função da temperatura45
Figura 47. Ajuste do Modelo 2 aos dados experimentais da Figura 3 - BSA - (concentração
em g/dL)46
Figura 48. Viscosidade da solução do MAb e viscosidades determinadas pelos modelos
aplicados, em função da temperatura48

Índice de Tabelas

Tabela 1. Valores dos coeficientes do Modelo 121
Tabela 2. Equações utilizadas no Modelo 122
Tabela 3. Valores dos coeficientes do Modelo 224
Tabela 4. Valor dos parâmetros da Equação 1325
Tabela 5. Valores obtidos para os coeficientes do Modelo 3
Tabela 6. Equações utilizadas no Modelo 328
Tabela 7. Valores dos coeficientes do Modelo 429
Tabela 8. Equações utilizadas no Modelo 430
Tabela 9. Valores dos coeficientes do Modelo 531
Tabela 10. Equações utilizadas no Modelo 532
Tabela 11. Valores dos coeficientes do Modelo 634
Tabela 12. Equações utilizadas no Modelo 635
Tabela 13. Valor dos parâmetros da Equação 1536
Tabela 14. Valores dos parâmetros da Equação 16 39
Tabela 15. Valores dos coeficientes do Modelo 940
Tabela 16. Valores dos parâmetros da Equação 1642
Tabela 17. Critérios de comparação entre os modelos44
Tabela 18. Valores dos coeficientes do Modelo 2 aplicado à BSA44
Tabela 19. Valores dos parâmetros da Equação 1845
Tabela 20. Valores de viscosidade (mPa.s) do MAb, a diferentes temperaturas47
Tabela 21. Valores de concentração de proteína determinados pelo Modelo 2 e erro
absoluto máximo associado47
Tabela 22. Valores de viscosidade (mPa.s) da soluções de Ovalbumina (g/dL), a diferentes
temperaturas53
Tabela 23. Valores de viscosidade (mPa.s) da soluções de BSA (g/dL), a diferentes
temperaturas53

Tabela	24.	Valores	de	viscosidade	(mPa.s)	da	soluções	de	MAb	(g/dL),	а	diferentes
	1	temperatu	uras									55

Tabela 25. Valores da viscosidade (mPa.s) da água, medidos a diferentes temperaturas ...57

Abreviaturas

- HCI Ácido Clorídrico
- BSA Albumina do soro bovino
- MAb Anticorpo monoclonal
- DSC Calorímetro de varrimento diferencial
 - pl Ponto isoelétrico
- Tris Tris(hidroximetil)aminometano

Símbolos

- r_h Raio hidrodinâmico
- T Temperatura
- T_g Temperatura de transição vítrea
- **n** Viscosidade

1 Introdução

1.1 Estrutura do trabalho

A presente dissertação encontra-se divida em seis partes distintas.

O primeiro capítulo, consiste numa introdução onde é apresentada uma revisão bibliográfica do tema e um enquadramento geral ao trabalho. O segundo capítulo refere-se à parte experimental, descrevendo os materiais e procedimentos utilizados. O terceiro, corresponde aos resultados obtidos experimentalmente e, o quarto capítulo apresenta todo o trabalho realizado com base nos resultados e a discussão destes. No quinto capítulo apresentam-se as principais conclusões obtidas, assim como algumas perspetivas que poderiam complementar o trabalho realizado. No capítulo seis, pode encontrar-se a bibliografia consultada e referenciada. Por fim, existem alguns anexos que complementam a dissertação.

1.2 Proteínas terapeuticas

O estudo das proteínas é considerado uma importante área de investigação na ciência e na tecnologia. Neste meio, as proteínas terapêuticas - tais como os anticorpos monoclonais (MAb) - têm um lugar de destaque na indústria farmacêutica e biotecnológica com um rápido crescimento no mercado (Miller, M. A., et al 2013) e com custos de produção bastante elevados, rondando valores como 1 000 000 €/kg.

Verifica-se, assim, um aumento da produção em massa deste tipo de proteínas terapêuticas, associado à necessidade de otimização de processos, como o recurso a lotes de produção (Rodrigues, M. A., et al 2013) e melhoramento da capacidade de armazenamento por períodos relativamente longos. (Miller, M. A., et al 2013) (Rodrigues, M. A., et al 2013)

Para o armazenamento - e também para o transporte -, recorre-se idealmente a soluções congeladas. (Miller, M.A., et al 2013) (Rodrigues, M. A., et al 2010) (Rodrigues, M. A., et al 2013) (Kolhe, P., et al 2009) (Roessl, U., et al 2013) O congelamento favorece a estabilidade das soluções, prolongando o período de vida útil das mesmas (Kolhe, P., et al, 2009); minimizando o risco de contaminação microbiana (Miller, M. A., et al, 2013) (Roessl, U., et al, 2013) (Roessl, U., et al, 2013) e reduzindo o risco de inativação dos compostos. (Roessl, U., et al, 2013) O transporte é facilitado, quando comparado com o transporte em estado líquido (Roessl, U., et al 2013), evitando-se a agitação e consequente formação de espuma. (Miller, M. A., et al 2013) (Kolhe, P., et al, 2009)

Por outro lado, armazenar grandes quantidades de soluções de proteínas congeladas apresenta-se como um possível desafio (Kolhe, P., et al, 2009), já que este processo pode conduzir a alterações

químicas e físicas que resultem na desnaturação de parte das proteínas devido a situações como: desenrolamento de proteínas causado pelas baixas temperaturas (Rosa, M., et al 2013), formação de agregados irreversíveis ao longo do tempo (Kolhe, P., et al, 2009), formação de gelo, concentração de soluto, cristalização da água, cristalização eutética das soluções tampão e alterações no pH (Cao, E., et al, 2003).

Uma das técnicas utilizadas para ultrapassar o problema da agregação e formação de partículas, é a adição de surfatantes ou açúcares - a trealose, por exemplo, atua como agente de vitrificação, aumentando a temperatura de transição vítrea (Tg) da solução (Corti, H., et al, 2008). Estes aditivos ajudam a reduzir a formação de agregados, no entanto, podem conduzir a um aumento da viscosidade da solução. A viscosidade tem um impacto significativo na generalidade dos processos de manuseamento e produção. Por esta razão, é necessário que os processos subsequentes, sejam estes de separação, transporte ou congelamento sejam otimizados tendo em conta as propriedades reológicas das soluções de proteínas terapêuticas. O custo de produção destas proteínas é exorbitante e, por isso, é incomportável realizar ensaios de desenvolvimento dos processos à escala de produção. Existem então duas alternativas; desenvolver os processos usando modelos de *scale down* (Roessl, U., et al 2013) ou utilizar soluções modelo, contendo proteínas pouco dispendiosas, com propriedades semelhantes, para a realização de ensaios à escala de produção.

1.3 Viscosidade

A viscosidade de um líquido surge da transfência de momento linear. Como esquematiza a **Figura 1**, num fluxo laminar, as partículas possuem o seu próprio momento linear inicial quando passam para outra camada adjacente. Se estas tiverem um momento linear superior na componente Y, aceleram a nova camada para a qual se deslocam. Se tiverem um momento linear inferior, retardam-na. (Atkins, P., Oxford) Assim, a primeira camada imprime movimento nas camadas subsequentes segundo a direção X.





Segundo *Coulson*, a viscosidade é uma propriedade que se relaciona com o escoamento de um fluido e define-se como a tensão de corte por unidade de gradiente de velocidade, ou seja, é uma medida da resistência que um fluido apresenta à deformação, quando sujeito a uma tensão. Sendo que, quanto menos viscoso for o fluido, maior a facilidade de movimento e, consequentemente, melhor o escoamento. (Symon, K., *Mechanics*)

O estudo do escoamento de matéria é denominado por reologia, sendo a viscosidade a propriedade mais estudada desta temática e também a propriedade aprofundada neste trabalho.

A viscosidade representa uma resistência interna do fluido ao escoamento. Molecularmente, esta explica-se pelas forças de atração e repulsão entre as moléculas que constituem o fluido, correlacionando-se também com o tamanho e a forma das moléculas, tendo, assim, *Einstein* relacionando a viscosidade com a fração de volume de soluto na solução. (Einstein A., 1906)

É possível afirmar-se que a viscosidade de um líquido diminui com o aumento da temperatura do mesmo - o contrário também se verifica - por ser necessário superar as já referidas interações intermoleculares. (Atkins, P., et al, *Physical Chemistry*)

1.3.1 Modelos matemáticos

Ao longo dos anos, vários modelos matemáticos têm sido desenvolvidos para descrever a viscosidade de soluções em função da variação da temperatura e da concentração de solutos. No presente trabalho, ajustaram-se alguns destes modelos para o estudo da influência destas variáveis na viscosidade das soluções analisadas.

Como referido anteriormente, foi *Einstein* quem primeiro apresentou uma aproximação teórica (Longinotti, M. P., et al, 2008) (Paznica, M., et al, 2012) que relaciona a viscosidade (η) com o coeficiente de difusão (D) e com a temperatura (T), na equação de *Stokes-Einstein* - **Equação 1**,

$$\eta = rac{k_B T}{A D r_h}$$
Equação 1

Onde k_B é a constante de Boltzmann, r_h é o raio hidrodinâmico da molécula e *A* assume o valor de 4π ou 6π , respetivamente para condições fronteira viscosas ou escorregadias. (Corti, H. R., et al, 2008) Esta equação teve por base a aproximação a uma esfera rígida e relativamente grande - molécula de açúcar - a difundir-se num fluido contínuo de pequenas moléculas de solvente, sem interações específicas. (Inoue, K., et al, 2005) Salienta-se, no entanto, que de acordo com alguns autores (Longinotti, M. P., et al, 2008), esta equação é aplicável apenas a soluções diluídas e há, ainda, quem defenda que nem mesmo nessa situação. (Corti, H. R., et al, 2008).

Assim, tendo início na equação de *Stokes-Einstein*, outros autores desenvolveram as suas equações de forma a considerar a concentração de solutos superior ao limite de diluição infinita. De entre estas, em primeiro serão apresentados modelos com dependência da concentração, de seguida modelos com dependência da temperatura e, por fim, os modelos que dependem de ambas as variáveis.

Vand (Vand, V., 1948) propôs um modelo teórico - **Equação 2** - válido para suspensões onde a viscosidade depende da concentração,

$$ln \eta_r = rac{k_1 c + r_2 (k_2 - k_1) c^2 + ...}{1 - Q_c}$$
 Equação 2

Aqui, *c* representa a concentração em volume das partículas em suspensão e os valores das constantes k_1 , k_2 , r_2 e Q_c derivam da teoria para esferas rígidas sem forças mútuas e sem movimento Browniano.

Para simplificação de cálculos, *Vand* rearranjou a **Equação 2**, obtendo a **Equação 3**, com um domínio válido para soluções, (Longinotti, M. P., et al, 2008)

$$ln \ rac{\eta}{\eta_w} = rac{
u}{q_0 + q_1 \nu + q_2 \nu^2}$$
 Equação 3

Na qual, ν corresponde à concentração do soluto em $g.cm^{-3}$, η_w é a viscosidade da água, a constante q_0 está relacionada com a forma das moléculas e a hidratação em condições de diluição infinita e q_1 e q_2 estão relacionadas com as interações hidrodinâmicas e intermoleculares. Sendo que, estas constantes podem, ser calculadas por *fitting*.

Génotelle utilizou uma equação proposta por *Kaganov* - **Equação 4** - para descrever a viscosidade de soluções aquosas de sacarose com concentrações inferiores a 85% em massa, numa gama de temperaturas entre 20 e 80°C (Longinotti, M. P., et al, 2008)

$$ln \ rac{\eta}{\eta_w} = A + Bc$$
 Equação 4

Nesta equação, c é a concentração molar e A e B são constantes.

Como primeira abordagem para os modelos teóricos onde a viscosidade depende de temperatura, pode referir-se a equação de Arrhenius, que relaciona o logarítmo neperiano da viscosidade com o inverso da temperatura absoluta (Longinotti, M. P., et al, 2008) e, os líquidos para os quais esta linearidade se verificar, são chamados "fortes". Esta designação deve-se às restrições na disposição das partículas imposta pela necessidade de coordenar cada centro de rede, o que provoca uma resistência à degradação estrutural com o aumento da temperatura (degradação térmica). (Angell, C.

A., 1988) Por outro lado, existem soluções nas quais se verifica um desvio a essa linearidade, nesses casos, os líquidos são chamados "frágeis". (Angell, C. A., 1988)

A **Figura 2** mostra a relação entre a viscosidade e a temperatura para os dois tipos de líquidos supra mencionados.



Figura 2. Representação gráfica de viscosidade em função da temperatura para líquidos "fortes" e "fracos"

É importante realçar o propósito da presença da temperatura de transição vítrea - T_g . Esta temperatura corresponde a uma transição reversível, em materiais vítreos (não cristalinos), de um estado onde estes se encontram rígidos para um estado com uma viscosidade muito elevada.

Em misturas, o T_g é uma função da composição destas, nas quais o componente que tem um menor valor de T_g assume a função de plastificante, como é o caso da água em soluções aquosas que contêm hidratos de carbono ou biopolímeros naturais. Nestes sistemas aquosos, o comportamento da transição é de extrema importância para determinar a sua estabilidade durante o armazenamento de biomoléculas a baixas temperaturas e a degradação de materiais que são criopreservados. (Constantin, J. G., et al, 2016)

Nestes casos, de soluções onde é possível encontrar-se a transição vítrea, essa temperatura pode e deve ser tida em consideração nos modelos de viscosidade, como uma "limitação" (num sentido positivo). Isto porque à medida que a temperatura se aproxima do T_g , a viscosidade tende para infinito. Por esta razão, a viscosidade não deve depender apenas de *T* mas de uma conjugação de *T* com T_a , de forma a que se possa limitar o modelo ao fenómeno físico.

Uma das equações propostas, que se ajustas bem a uma vasta gama de viscosidades para os líquidos é a equação de Vogel-Fulcher-Tammann (VFT) - **Equação 5** - na qual η_0 , T_0 e *D* são constantes. (Angell, C. A., 2002)

$$\eta = \eta_0 exp\left(rac{DT_0}{T-T_0}
ight)$$
 Equação 5

Na **Equação 5**, verificam-se desvios nos valores de viscosidade, no caso dos líquidos e apenas para baixas temperaturas. O parâmetro *D* está relacionado com a fragilidade e diminui com o aumento da curvatura do gráfico de Arrhenius. (Angell, C. A., 1988) Uma desvantagem que este modelo apresenta, é a extrema não-universalidade do fator pré exponencial η_0 quando aplicado a polímeros e ainda uma forte dependência do peso molecular. É precisamente devido à existência de grandes fatores η_0 para polímeros com elevado peso molecular que se torna possível o comportamento elástico. (Angell, C. A., et al, 1994)

Outro modelo, desenvolvido para descrever a viscosidade de polímerios numa gama entre T_g e $T_g + 100 K$ é a equação de Williams-Landel-Ferry (WLF) - **Equação 6**. (Williams, M. L., et al, 1995)

$$log_{10}\left(\frac{\eta}{\eta_g}\right) = -\frac{c_1(T-T_g)}{c_2+(T-T_g)}$$
 Equação 6

Onde, $C_1 \in C_2$ são constantes e η_g corresponde à viscosidade à temperatura T_g , que pode assumir o valor $10^{14} Pa.s$ (Corti, H., et al, *Diffusion of solutes in supercooled sugar aqueous solutions*) ou $10^{12} Pa.s$ (Corti, H., et al, 2008).

As equação WLF e VFT são interconversíveis entre si (Angell, C. A., et al, 1994) e matematicamente equivalentes, no entanto, T_0 e T_q não têm o mesmo significado físico. (Longinotti, M. P., et al, 2008)

Outro autor (Rossler, E., 1990), observou que para baixos valores de viscosidade, o comportamento de líquidos orgânicos é bastante bem descrito por uma expressão que se traduz numa equação de potência - **Equação 7**,

$$\eta = \eta_0 (T - T_c)^{\gamma}$$
 Equação 7

Nesta, as constantes representam: η_0 o fator pré exponencial, T_c é a temperatura crítica e γ o expoente crítico. Como aproximação, a temperatura crítica assume o valor $T_c = 1,18 T_g$. (Richert, R., et al, 1990)

Outro modelo, proposto para a viscosidade em líquidos, surge de uma forma aleatória (Longinotti, M. P., et al, 2008) - **Equação 8**,

$$\eta = \eta_0 exp \, \left(rac{T_0}{T}
ight)^2$$
 Equação 8

Com η_0 e T_0 como valores constantes e $T_q < T < T_c$ (T_c representado na **Equação 7**).

Apresentadas algumas das equações existentes para descrever a relação entre a viscosidade de algumas soluções e a temperatura ou a concentração de solutos, surgem agora outros modelos onde é possível verificar-se a dependência de ambas as variáveis em simultâneo.

Uma dessas hipóteses foi proposta para o caso particular de soluções de açúcar, tendo resultado a **Equação 9**,

$$log_{10}\left(rac{\eta}{\eta^*}
ight) = x\left(rac{a}{t+b} - c
ight) - d$$
 Equação 9

Onde x é a fração molar de açúcar, t é a temperatura em °C e η^* representa uma viscosidade padrão que torna o logarítmo adimensional. (Longinotti, M. P., et al, 2008)

Semelhante à **Equação 9**, existe ainda o modelo empírico, representado pela **Equação 10**. Este, faz uso de um termo ϕ como temperatura reduzida - **Equação 11**. (Longinotti, M. P., et al, 2008)

$$\log_{10}\left(\frac{\eta}{\eta^*}\right) = a_1 + a_2 x + \Phi(b_1 + b_2 x^n)$$
 Equação 10

$$\Phi = \frac{30-t}{91+t}$$
 Equação 11

Na **Equação 10**, tal como na **Equação 9**, x é a fração molar de açúcar e η^* representa uma viscosidade padrão.

Por último, surge a **Equação 12**, cujo principal objetivo é assumir que, para cada soluto, o efeito da sua concentração na viscosidade é implicitamente tido em conta pelo quociente $\frac{T_g}{T}$, que determina a distância do sistema a T_g . (Longinotti, M. P., et al, 2008) Os autores da aproximação afirmam, ainda, que esta apresenta um resultado bastante razoáveis para a sacarose e para a trealose, especialmente em soluções sub-arrefecias.

$$log_{10}\eta = a\left(\frac{T_g}{T}\right)^3 + b\left(\frac{T_g}{T}\right)^2 + c\left(\frac{T_g}{T}\right) + d$$
 Equação 12

1.4 Objetivos gerais

O principal objetivo deste trabalho centrou-se no estudo de soluções com proteínas pouco dispendiosas (proteínas modelo) mas de comportamento idêntico aos MAb. Para isso, desenvolveram-se ensaios de determinação da viscosidade dessas soluções modelo, com vista a melhorar a estabilidade das referidas proteínas terapêuticas, otimizando, os processos de manuseamento, transporte e congelamento dos MAb.

Além deste, foram também realizados estudos relativos ao impacto da presença de moléculas de menores dimensões nas soluções (mais concretamente a trealose), a influência da variação da concentração das proteínas, a variação da temperatura e a variação do pH.

Com este trabalho, foram obtidas informações sobre a viscosidade de soluções com elevadas concentrações de proteína e de açúcar, numa gama de baixas temperaturas, o que se encontra pouco descrito na literatura mas que representa um estudo importante, especialmente para a indústria farmacêutica.

2 Parte Experimental

Neste capítulo, apresentam-se os reagentes, materiais e equipamentos utilizados no trabalho experimental; enumeram-se as soluções preparadas e estudadas e são descritas as técnicas utilizadas.

2.1 Reagentes

Ácido Clorídrico (HCI): Sigma-Aldrich

Água destilada Milli-Q: Merck Millipore

Albumina do soro bovino (BSA): Sigma-Aldrich ($\geq 98\%$)

Anticorpo monoclonal (MAb) (fornecido por empresa farmacêutica, sujeito a acordo de confidencialidade)

Arginina (L-Arginina): Sigma-Aldrich (\geq 98%)

Histidina (L-Histidina Base): AppliChem

Ovalbumina: Sigma-Aldrich ($\geq 98\%$)

Polissorbato 20: Fluka

Liofilizador: Christ

Trealose (D-(+)-Trealose Di-hidratada): TCI (> 98%)

Tris(hidroximetil)aminometano (Tris): Sigma-Aldrich (> 99%)

2.2 Materiais e equipamentos

Balança analítica: *Mettler Toledo AB204*Banho ultra som: *Sonorex*Bomba de vácuo: *Vacuubrand*Calorímetro de varrimento diferencial (DSC): *F3 Maia 200, Netzsch*Crióstato: *Julabo CF 41*

Material laboratorial de uso corrente

Medidor de pH: Nahita

Sistema de obtenção de água destilada: Milli-Q Integral 3, Merck Millipore

Viscosímetro: DV-II+Pro, Brookfield

Placas de agitação e aquecimento: Ovan

2.3 Métodos

2.3.1 Soluções

Ao longo deste trabalho experimental, foram preparadas as soluções utilizadas para o estudo da viscosidade.

- Soluções aquosas com 10, 20 e 30 g/dL de Trealose;
- Soluções num tampão de Histidina e Arginina (pH~4,7), 0,05% de Polissorbato 20, 10 g/dL de Trealose e diferentes concentrações de proteína BSA: 15, 17,5, 19, 20, 22,5, 25, 27,5 e 30 g/dL;
- Soluções num tampão de Tris-HCl (pH~7), 0,05% de Polissorbato 20, 10 g/dL de Trealose e diferentes concentrações de proteína BSA: 10, 20, 25 e 30 g/dL;
- Soluções num tampão de Histidina e Arginina (pH~4,7), 0,05% de Polissorbato 20, 20 g/dL de proteína BSA e diferentes concentrações de Trealose: 5, 10, 15, 20, 21, 22,5, 25 e 30 g/dL;
- Soluções num tampão de Histidina e Arginina (pH~4,6), 0,05% de Polissorbato 20, 10 g/dL
 de Trealose e diferentes concentrações de proteína Ovalbumina: 5, 10, 15, 30 e 40 g/dL;
- Soluções num tampão de Histidina e Arginina (pH~4,6), 0,05% de Polissorbato 20, 10 g/dL
 de proteína Ovalbumina e diferentes concentrações de Trealose: 5, 10, 20 e 30 g/dL;
- Soluções de um MAb obtidas através da liofilização de uma solução mãe e posteriormente diluídas para perfazer as seguintes concentrações de proteína: 2,4; 2,8; 3,2; 3,5 e 8 g/dL.

2.3.2 Técnicas

Determinação de Tg por calorimetria de varrimento diferencial (DSC)

Foi preparada a amostra a analisar, pesando uma massa de 2 a 10 mg, que se introduziu num cadinho de alumínio *Netzsch*. Esta foi colocada no equipamento, assim como um cadinho vazio e fechado utilizado como referência. O equipamento contém um sistema de arrefecimento incorporado e toda a análise é realizada sob uma atmosfera de azoto purgado em contínuo a uma pressão máxima de 0,6 *bar*.

Para esta determinação, foi utilizado um programa de temperaturas partindo de um ponto inicial a $20^{\circ}C$, seguido por um arrefecimento até $-50^{\circ}C$ a uma velocidade constante de 15 K/min, temperatura à qual permanece durante 10 min. Por fim, aquece-se novamente a amostra até $25^{\circ}C$, a 5 K/min.

Liofilização

Este procedimento foi efetuado num liofilizador a $-30^{\circ}C$ e $0,001 \, bar$, durante aproximadamente 24 horas, com o intuito de concentrar a solução mãe de MAb e, posteriormente, analisar a viscosidade a diferentes concentrações.

As amostras foram congeladas a $-20^{\circ}C$ antes de serem introduzidas no equipamento. Após a secagem parcial, foram colocadas num frigorífico a $4^{\circ}C$ para descongelamento, antes da diluição.

Determinação da viscosidade

A viscosidade, foi medida utilizado um viscosímetro de cone e prato *Brookfield*. Este equipamento possui uma célula, na qual é colocado um cone truncado - *spindle* - com um diâmetro apropriado à viscosidade da amostra a analisar. Neste caso, foi utilizado o *spindle CPE-40* que, uma vez em funcionamento, deve ser ajustada a sua velocidade de rotação de modo a que a tensão de corte apresentada pelo equipamento se mantenha dentro dos valores adequados. Foi introduzida na célula uma amostra de solução (500 μL).

Como o objetivo é a análise da variação da viscosidade com a temperatura, o viscosímetro foi acoplado a um crióstato *Julabo*, o que permitia alterar a temperatura da célula e, consequentemente, da amostra. Assim, para a leitura do valor da viscosidade, era apenas necessária a estabilização do valor de temperatura que variou entre $-7,5 e 25^{\circ}C$.

2.3.3 Métodos Numéricos

A análise realizada aos modelos e os respetivos ajustes recorreram à utilização da ferramente *Solver* do *Microsoft Office Excel* que tem por base de funcionamento o método de Newton para resolução do valor pretendido. Esta ferramenta está definida com uma precisão igual a 1×10^{-6} .

3 Resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados do estudo da viscosidade das soluções de proteínas modelo, assim como o efeito da variação da concentração, da temperatura e do pH.

3.1 Estudo da viscosidade de soluções com proteínas modelo

Como referido, efetuaram-se várias medidas de viscosidade para diferentes soluções, verificando-se, para todas estas, o mesmo perfil de variação de viscosidade com a temperatura.

Assim, para este estudo, foram selecionadas as proteínas BSA e Ovalbumina como proteínas modelo, com um peso molécular aproximado de 66 e 43 kDa, respetivamente. Estas foram escolhidas pela facilidade de acesso, tanto em termos comerciais como em termos económicos. Surgui, ainda, a hipótese de se complementar o estudo com uma terceira proteína, a Hemoglobina. No entanto, este estudo teria que ser desenvolvido com valores muito inferiores de concentração de proteína, já que a única solução analisada se encontrava demasiado concentrada e viscosa (5 g/dL de proteína e 10 g/dL de trealose).

Por outro lado, de entre os solutos presentes nas soluções, a trealose corresponde ao soluto mais representativo. Este foi selecionado especialmente por ser um substrato vastamente utilizado neste tipo de soluções farmacêuticas.

Os ensaios apresentados nas secções 3.1.1 e 3.1.2 foram realizados em soluções com um pH próximo do ponto isoelétrico (pl) das proteínas, enumeradas em 2.3.1 - pI = 4,7 no caso da BSA (Peng, Z.G., 2005) e pI = 4,43 - 4,66 para a Ovalbumina (Beeley, J.A., et al., 1972). Em 3.1.3, é apresentado o efeito da variação do pH, com o estudo de algumas soluções em meio aquoso com pH neutro.

3.1.1 Efeito da concentração de proteína

Para as baixas concentrações de proteína (até cerca de 40 g/L), sabe-se que a viscosidade da solução depende fortemente da carga das moléculas, sendo o valor da viscosidade mais elevado quanto mais afastado o pH estiver do pI das proteínas em solução (Yadav, S., et al, 2011), o que não se verificou nos resultados obtidos - Secção 3.1.3. No caso em que a concentração de proteínas é mais elevado, a viscosidade não pode ser justificada tendo por base apenas um parâmetro. (Yadav, S., et al, 2011) Mas, não havendo alterações do pH da solução, este aumento de viscosidade estará possivelmente ligado às interções entre as moléculas.

No caso da proteína BSA, as medições efetuadas mostram que a variação da concentração de proteína, mantendo fixa a quantidade de trealose - **Figura 3** - tem um forte impacto na viscosidade.



Figura 3. Representação gráfica da viscosidade em função da temperatura, em soluções com 10 g/dL de trealose e diferentes concentrações de BSA em g/dL

Por sua vez, ao fazer o mesmo exercício com a Ovalbumina (mantendo fixa a concentração de trealose), verifica-se que também existe uma variação na viscosidade da solução - **Figura 4** -, no entanto, esta não é tão acentuada como no caso anterior.



Figura 4. Representação gráfica da variação da viscosidade com a temperatura, para soluções com 10g/dL de trealose e diferentes concentrações de Ovalbumina em g/dL

Nota-se, tanto na **Figura 3** como na **Figura 4** que é nas concentrações mais elevadas que se verificam maiores variações na viscosidade.

3.1.2 Efeito da concentração de trealose

Foi analisada a influência da variação de trealose nas soluções com BSA - Figura 5 - e com Ovalbumina - Figura 6 - sendo sempre constante a concentração de cada um das proteína em solução.



Figura 5. Representação gráfica da variação da viscosidade com a temperatura, em soluções com 20 g/dL de BSA e diferentes concentrações de trealose em g/dL



Figura 6. Representação gráfica da variação da viscosidade com a temperatura, para soluções com 10 g/dL de Ovalbumina e diferentes concentrações de trealose em g/dL

Verifica-se, pelos valores apresentados, que a variação da quantidade de proteína tem um impacto maior na viscosidade do que a variação de trealose.

3.1.3 Efeito da variação do pH

Para a avaliação deste efeito, estudaram-se soluções com pH=7, onde a concentração de trealose é constante e igual a 10 g/dL e a concentração de BSA varia - **Figura 7**. Este estudo pode ser comparado diretamente com os reesultados obtido para a mesma proteína, no pl - **Figura 3**.



Figura 7. Representação gráfica da viscosidade em função da temperatura em soluções com 10 g/dL de trealose e diferentes concentrações de BSA em g/dL, a pH=7

4 Discussão

No capítulo 4 é proposta uma discussão para a influência das variações apresentadas no capítulo dos resultados. São, também, descritos todos os modelos matemáticos ajustados aos valores experimentais, assim como todas as alterações efetuadas aos mesmos. Por fim, após seleção de um dos modelos, é apresentado um caso prático da sua utilização.

4.1 Impacto da concentração na viscosidade e efeito do pH

No que diz respeito à concentração da proteína, é nas concentrações mais elevadas que se verificam maiores variações na viscosidade com a temperatura. E verifica-se, também, que o aumento da concentração causa um aumento do tipo exponencial na viscosidade, tal como se observa em relação à diminuição da temperatura. Para melhor visualização deste crescimento, a **Figura 8** mostra os resultados já apresentados na **Figura 3**, mas numa perspetiva diferente, onde cada curva corresponde a uma temperatura constante.



Figura 8. Representação gráfica da viscosidade em função da concentração de proteína, em soluções com 10g/dL de trealose e diferentes concentrações de BSA a diferentes temperaturas (K), no pl

A Figura 9 é em tudo semelhante à Figura 8, exceto no pH da solução.



Figura 9. Representação gráfica da viscosidade em função da concentração da proteína, em soluções com 10 g/dL de trealose e diferentes concentrações de BSA a diferentes temperaturas (K), a pH=7

Por comparação entre os gráficos das **Figuras 8** e **9**, observa-se que para iguais concentrações de BSA e trealose e a uma mesma temperatura, o valor da viscosidade é significativamente inferior quando a análise é efetuada fora do pl da proteína. Isto observa-se especialmente para temperaturas inferiores.

Por este motivo, comprova-se que uma variação não muito elevada no pH (de 4,7 para 7) é suficiente para desetabilizar bastante as proteínas e tornar as suas interações mais fortes por um possível desenrolamento de parte das mesmas ou, pelo menos, por introduzir alterações nas cargas.

Outro resultado, que se mostrou interessante, é referente ao estudo das soluções com 20 g/dL de BSA e diferentes concentrações de trealose, sempre dentro do pl da proteína, como mostra a **Figura 10**.



Figura 10. Representação gráfica da variação da viscosidade com a concentração de trealose, em soluções com 20g/dL de BSA e diferentes concentrações de trealose, a diferentes temperaturas (K)
Existe um crescimento quase abrupto nos valores da viscosidade quando a concentração de trealose iguala a concentração de proteína em solução, voltando a um crescimento mais linear para concentrações de trealose superiores a 22,5 g/dL. Visto que a solução tem 20 g/dL de proteína e concentrações iguais ou superiores de trealose, quando se observa a alteração no comportamento, este rápido crescimento da viscosidade pode estar relacionado com as interações intermoleculares, passando estas a ter um importante domínio na solução.

Por outro lado, verifica-se também que o aumento da concentração de proteína tem um efeito muito mais significativo nas soluções do que o aumento da concentração de trealose. Este fato verifica-se nas figuras apresentadas em 3.1.1 e 3.1.2 e também na **Figura 11**.



Figura 11. Avaliação do impacto do aumento da concentração de trealose na viscosidade (em soluções com 10, 20 e 30 g/dL de trealose) na gama de temperaturas em estudo

Observa-se na **Figura 11** que um aumento de 10 g/dL na concentração de trealose não conduz a uma grande variação no valor de viscosidade, apesar de que, é importante ter em conta que estes valores foram medidos em soluções com apenas dois constituintes (água e trealose).

Contudo, os modelos desenvolvidos na secção 4.2 têm em conta apenas a concentração de proteína e não a concentração de trealose presente nas soluções (10 g/dL), que pode ser desprezada, já que as soluções bioterapêuticas a replicar contêm, por norma, concentrações deste tipo de sacarídeos inferiores a 10 g/dL. Por este motivo, não é necessário que os modelos contemplem a zona mais crítica apresentada na **Figura 10** nem foram explorados mais resultados nesse sentido.

4.2 Modelos

Neste subcapítulo, serão apresentados os resultados dos ajustes que foram efetuados ao modelos enumerados na secção 1.3.1.

Os modelos foram ajustados aos dados referentes à **Figura 4** (soluções com 10 g/dL de trealose e diferentes concentrações de Ovalbumina). Um dos modelos foi também estudado com aplicação aos dados da **Figura 3** (soluções com 10 g/dL de trealose e diferentes concentrações de BSA) com o intuito de complementar o estudo e expandir a gama de aplicabilidade dos modelos.

Nas figuras apresentadas, os pontos correspondem aos valores da viscosidade medidos experimentalmente e as linhas referem-se às equações ajustadas em cada um dos modelos.

No tratamento matemático realizado em cada um dos modelos, foi seguida sempre a mesma dinâmica, de modo a que todos estes dependam da temperatura e também da concentração de proteína. Para isso, em cada equação, foi analisada a relação entre os coeficientes da mesma e a variável que não estava inicialmente contemplada na equação - temperatura ou concentração -, introduzindo, de seguida, o ajuste que melhor descrevesse a relação. Deste modo, todos os modelo se tornam sensíveis às duas variáveis.

Os modelos que já pressupõem a dependência das duas variáveis em estudo, dispensam a introdução de tantas alterações, o que os torna, à partida, mais completos. Ainda assim, efetuaram-se pequenas modificações para simplificação dos mesmos.

Modelo 1

Este modelo refere-se ao ajuste da Equação 3 aos dados experimentais da Figura 4.

$$ln \ rac{\eta}{\eta_w} = rac{
u}{q_0 + q_1 \nu + q_2 \nu^2}$$
 Equação 3

Na **Tabela 1** encontram-se os valores dos coeficientes da **Equação 3**, que foram modificados, de acordo com o anteriormente referido, de modo a tornar o modelo mais completo.

Т (К)	\mathbf{q}_0	q 1	\mathbf{q}_2
268,15	0,012	0,141	-3,351
271,15	0,011	0,202	-4,403
273,15	0,010	0,253	-5,011
278,15	0,013	0,124	-2,960
283,15	0,011	0,281	-5,519
288,15	0,011	0,272	-5,131
293,15	0,010	0,300	-5,488
298,15	0,011	0,292	-5,359

Tabela 1. Valores dos coeficientes do Modelo 1



Figura 12. Representação gráfica do parâmetro q₀ em função da temperatura



Figura 13. Representação gráfica do parâmetro q1 em função da temperatura



Figura 14. Representação gráfica do parâmetro q2 em função da temperatura

Como referido na introdução, q_0 está relacionada com a forma das moléculas e foi assumido com a média de todos os pontos. Os coeficientes q_1 e q_2 estão relacionadas com as interações hidrodinâmicas e intermoleculares e foram substituidos com equações de segundo grau por ser esta a conduzir a um melhor ajuste dos pontos. A **Tabela 2** resume as alterações realizadas.

Tabela 2. Equações utilizadas no Modelo 1

Equação		
$q_0 = 1,14 \times 10^{-2} (\pm 8,66 \times 10^{-4})$ (*)		
$q_1 = -2.5 \times 10^{-5} \times T^2 + 0.028 \times T - 5.848$		
$q_2 = -2,3 \times 10^{-5} \times T^2 - 0,330 \times T + 91,423$		

(*) É apresentado o desvio padrão do valor de q_0 por ter sido utilizado um valor médio

Na Figura 15, encontra-se a representação gráfica do ajuste deste modelo.



Figura 15. Ajuste do Modelo 1 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)

Esta equação é utilizada para uma gama de temperaturas entre 0 e 100° C (Longinotti, M. P., et al, 2008) e, nota-se que é para os valores mais baixos de temperatura que os desvios são maiores. Isto verifica-se mesmo para as concentrações mais baixas, onde os desvios entre os pontos experimentais e os valores calculados são menores (máximo é de cerca 26% para as curvas de 5 e 10 g/dL de Ovalbumina) - **Figura 16**.



Figura 16. Detalhe das duas curvas de menor concentração da Figura 15 (concentração em g/dL)

Modelo 2

Este modelo refere-se à Equação 4 com dados experimentais da Figura 4.

$$ln \ rac{\eta}{\eta_w} = A + Bc$$
 Equação 4

Na **Tabela 3** encontram-se os valores dos coeficientes da **Equação 4**, que estão representados nas **Figuras 17** e **18**.

Т (К)	A	В
268,15	0,301	9136
271,15	0,312	8970
273,15	0,354	8855
278,15	0,287	8569
283,15	0,339	8346
288,15	0,344	8059
293,15	0,358	7848
298,15	0,349	7752

Tabela 3. Valores dos coeficientes do Modelo 2



Figura 17. Representação gráfica do parâmetro A em função da temperatura



Figura 18. Representação gráfica do parâmetro B em função da temperatura

Tomando o coeficiente A como uma média dos valores obtidos e o coeficiente B com uma dependência linear com a temperatura, obteve-se a **Equação 13** que corresponde à equação do modelo 2, cujos parâmetros estão sumarizados na **Tabela 4**.

$$\eta = e^{\left[A + (B_1 imes T + B_2) c\right]} imes \eta_w$$
 Equação 13

Tabela 4. Valor dos parâmetros da Equação 13

Α	0,256	
B ₁	- 46,52	
B ₂	21906	

_

Na Figura 19, encontra-se a representação gráfica do ajuste deste modelo, após as referidas alterações ao mesmo.



Figura 19. Ajuste do Modelo 2 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)

À semelhança do modelo anterior, a **Equação 4** também foi utilizada para descrever a viscosidade de soluções aquosas de sacarose até 85% *wt*. e para 20 < T < 80°C (Longinotti, M. P., et al, 2008).

O modelo apresenta um ajuste razoavelmente bom aos pontos experimentais, especialmente nas concentrações mais baixas - **Figura 20** -, onde o desvio máximo entre pontos experimentais e teóricos é de apenas 9%.



Figura 20. Detalhe das duas curvas de menor concentração da Figura 19 (concentração em g/dL)

Modelo 3

O modelo 3 corresponde ao ajuste da **Equação 5**. Os valores dos parâmetros $D \in T_0$ obtidos encontram-se na **Tabela 5**, e as **Figuras 21** e **22** mostram representação gráfica dos mesmos.

$$\eta = \eta_0 exp\left(rac{DT_0}{T-T_0}
ight)$$
Equação 5

Concentração de Ovalbumina (g/dL)	D	To
5	0,689	353,98
10	2,248	444,80
15	1,813	424,23
30	1,088	383,04
40	2,387	465,56

Tabela 5. Valores obtidos para os coeficientes do Modelo 3

.

.



Figura 21. Representação gráfica do parâmetro D em função da concentração de proteína



Figura 22. Representação gráfica de To em função da concentração de proteína

As equações que melhor ajustam a relação dos parâmetros D e T_0 com a concentração de Ovalbumina estão sumarizadas na **Tabela 6**.

Equação		
$D = 2,78 \times e^{-0,03 \times c}$		
$T_0 = -47,13 \times \ln(c) + 550,04$		

O modelo 3 conduziu ao ajuste apresentado na Figuras 23.



Figura 23. Ajuste do Modelo 3 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)

Como foi referido em 1.3.1, encontram-se desvios nos valores de viscosidade, para baixas temperaturas, no caso dos líquidos, fato que se observa pelo gráfico da **Figura 23**. No entanto, em temperaturas mais elevadas, também é visível um mau ajuste aos pontos experimentais.

Modelo 4

O modelo 4 corresponde ao ajuste da **Equação 6**, de onde resultaram os coeficientes C_1 e C_2 - apresentados na **Tabela 7** e relacionado com a concentração de proteína de acordo com o que se observa nas **Figuras 24** e **25**.

$$log_{10}\left(\frac{\eta}{\eta_g}\right) = -\frac{c_1(T-T_g)}{c_2+(T-T_g)}$$
 Equação 6

Concentração de Ovalbumina (g/dL)	C ₁	C ₂
5	-15,08	1,15
10	-14,99	1,16
15	-14,86	1,32
30	-14,45	1,57
40	-14,22	1,85

Tabela 7. Valores dos coeficientes do Modelo 4



Figura 24. Representação gráfica de C1 em função da concentração de proteína



Figura 25. Representação gráfica de C2 em função da concentração de proteína

Destes resultam as novas equações - **Tabela 8** - a introduzir no modelo, como é possível observar na **Figura 26**.



Tabela 8. Equações utilizadas no Modelo 4

Figura 26. Ajuste do Modelo 4 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)

No modelo 5, η_g assume o valor de $10^{12} Pa.s$ conforme sugerido pela literarura (Corti, H., et al, 2008) e o valor utilizado como T_g é 247 *K* e foi determinado pela técnica de DSC.

Modelo 5

No modelo 5 ajusta-se a **Equação 7** e, analogamente aos anteriores, os quoeficientes são apresentados na **Tabela 9** e as **Figuras 27** e **28** correspondem às respetivas representações gráficas.

$$\eta = \eta_0 (T - T_c)^{\gamma}$$
 Equação 7

Concentração de Ovalbumina (g/dL)	η₀	Ŷ
5	118	-1,08
10	147	-1,08
15	373	-1,21
30	2137	-1,38
40	8788	-1,58

 Tabela 9. Valores dos coeficientes do Modelo 5



Figura 27. Representação gráfica de nº em função da concentração de proteína



Figura 28. Representação gráfica de y em função da concentração de proteína

Das regressões das Figuras 27 e 28, surgem as equações apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Equações utilizadas no Modelo 5

Equação		
$\eta_0 = 44,996 \times e^{0,139 \times c}$		
$\gamma = -0,018 \times c - 0,935$		

A representação gráfica deste modelo, contrariamente aos modelos anteriores, ajusta-se melhor às curvas que representam as maiores concentração de proteína - **Figura 29**.



Figura 29. Ajuste do Modelo 5 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)

Para o ajuste da equação, T_c deveria assumir o valor de 1,18 T_g , no entanto isso impossibilitava o tratamento dos dados visto que iria tornar negativa a diferença $T - T_c$ e, considerando a linearização realizada, que fez uso de logarítmos, obter-se-ia o logarítmo de um número negativo. Por este motivo, considerou-se $T_c = T_g$.

O modelo foi anteriormente utilizado para descrever o comportamento de líquidos orgânicos, como referido em 1.3.1, mostrando agora ser adequado para estas soluções em particular numa gama de concentrações mais elevadas.

Modelo 6

No modelo 6, ajusta-se a Equação 8, na sua forma linearizada Equação 14, para simplificação do mesmo.

$$\eta = \eta_0 exp \, \left(rac{T_0}{T}
ight)^2$$
Equação 8

$$ln\sqrt{\eta}=m imes \left(rac{1}{T}
ight)+b$$
Equação 14

Assumindo a simplificação anterior, os coeficientes do ajuste encontram-se na **Tabela 11**, e as respetivas representações gráficas, nas **Figuras 30** e **31**, das quais se retiraram as equações para complementação do modelo - **Tabela 12**.

Concentração de Ovalbumina (g/dL)	m	b
5	1247,8	-3,94
10	1249,3	-3,84
15	1396,5	-4,13
30	1599,9	-4,28
40	1824,3	-4,72

Tabela 11. Valores dos coeficientes do Modelo 6



Figura 30. Representação gráfica de m em função da concentração de proteína



Figura 31. Representação gráfica de b em função da concentração de proteína

Tabela 12. Equações utilizadas no Modelo 6

Equação	
m = 17,82 × c + 1127	
b = - 0,026 × c - 3,73	

Resultando, assim, o gráfico da Figura 32 com o ajuste final do modelo.



Figura 32. Ajuste do Modelo 6 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)

Este trata-se de um bom ajuste para as curvas de menor concentração de proteína (5 e 10 g/dL de Ovalbumina), sendo o desvio máximo entre os pontos experimentais e os valores calculados de 14%.

É, tal como o modelo 5, dos melhores ajustes em relação à curva experimental de 40 g/dL de Ovalbumina, apresentando um desvio máximo de 5%.

Modelo 7

O modelo 7 corresponde ao ajuste da Equação 9,

$$log_{10}\left(rac{\eta}{\eta^*}
ight) = x\left(rac{a}{t+b} - c
ight) - d$$
 Equação 9

O termo $\left(\frac{a}{t+b}-c\right)$ da **Equação 9** foi alterado para $(m_1 \times t + m_2)$. Com esta alteração proposta, a viscosidade deixa de ser inversamente proporcional à temperatura, no entanto, o ajuste mostrou-se bastante favorável e também mais simples. O coeficiente *b* substitui o termo -d.

A **Figura 33** apresenta o ajuste do coeficiente m em função da temperatura. O coeficiente b foi aproxiamdo a um valor médio de todos os pontos.



Figura 33. Representação gráfica de m em função da temperatura (°C)

Assim, o modelo passa a traduzir-se de acordo com a Equação 15, com as constantes da Tabela 13.

$$\eta = 10^{(m_1 \times (T - 273, 15) + m_2) \times c + b} \times \eta_w$$
 Equação 15

m₁	- 18,22
m ₂	3764
b	0,117

Tabela 13. Valor dos parâmetros da Equação 15

Na **Equação 15**, a temperatura *T* está em *K* e *c* é uma concentração molar.

Após as alterações enunciadas, o ajuste final aplicado à solução modelo de Ovalbumina, está representado na **Figura 34**.



Figura 34. Ajuste do Modelo 7 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)

Como se observa na **Figura 34**, o modelo apresenta-se como um excelente ajuste, não apenas para as curvas de menor concentração de 5 e 10 g/dL de Ovalbumina (com um desvio máximo entre valores teóricos e experimentais igual a 8%) - **Figura 35**. Também se verifica um bom ajuste aos pontos de maior concentração de proteína, 40 g/dL de Ovalbumina, onde a diferença máxima corresponde a 8%.



Figura 35. Detalhe das duas curvas de menor concentração da Figura 34 (concentração em g/dL)

Neste modelo, não foi necessário introduzir tantas alterações na equação, visto que, à semelhança do modelo anterior, já pressupunha a dependência das duas variáveis (temperatura e concentração). Isto pode ser uma explicação para se ter revelado um bom ajuste.

Modelo 8

No modelo 8 é descrito o ajuste da Equação 10.

$$log_{10}\left(\frac{\eta}{\eta^*}\right) = a_1 + a_2 x + \Phi(b_1 + b_2 x^n)$$
 Equação 10

Nesta, assumiu-se o expoente n = 1 e ajustou-se a expressão de forma linear $(b_1 \times c + b_2)$ por simplificação e porque o ajuste se mostrou favorável a essa alteração. A concentração *c* corresponde ao *x* da **Equação 10**.



Figura 36. Representação gráfica de a em função da concentração molar



Figura 37. Representação gráfica de b em função da concentração molar

A **Equação 16** traduz a expressão final que se ajustou no modelo 8, cujas constantes estão expressas na **Tabela 14**. Na **Equação 16**, c é uma concentração molar e Φ é a temperatura reduzida (já apresentada na **Equação 11**).

$$\eta = \mathbf{10}^{(m_1 \times c + m_2) \times \Phi + (b_1 \times c + b_2)} \times \eta_w$$
 Equação 16

Tabela 14. Valores dos parâmetros da Equação 16

m ₁	1711
m ₂	-0,047
b ₁	3266
b ₂	0,12

As equações ajustadas ao modelo 8 estão esquematizadas na Figura 38.



Figura 38. Ajuste do Modelo 8 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)

Este modelo, à semelhança do anterior, também já pressupõe a dependência das duas variáveis, tornando-se, à partida, mais completo.

Tal como no modelo 7, este também ajusta muito bem aos pontos experimentais de menor concentração de 5 e 10 g/dL (**Figura 39**) com um erro máximo igual a 9%. Nos valores experimentais de 40 g/dL de Ovalbumina, também se observa um bom ajuste.



Figura 39. Detalhe das duas curvas de menor concentração da Figura 20 (concentração em g/dL)

Modelo 9

Por fim, no modelo 9, é ajustada a **Equação 12**, cujos coeficientes resultantes são apresentados na **Tabela 15**.

$$log_{10}(\eta) = a \left(\frac{T_g}{T}\right)^3 + b \left(\frac{T_g}{T}\right)^2 + c \left(\frac{T_g}{T}\right) + d$$
 Equação 12

Concentração de Ovalbumina (g/mL)	а	b	С	d
5	64,87	-163,63	141,66	-41,72
10	73,94	-187,19	162,05	-47,50
15	48,08	-116,72	98,68	-28,48
30	-8,77	32,93	-31,81	9,70
40	-48,06	137,77	-124,17	36,88

Tabela 15. Valores dos coeficientes do Modelo 9

As **Figuras 40**, **41**, **42** e **43** apresentam a variação de cada um dos coeficientes com a concentração de Ovalbumina.



Concentração de Ovalbumina (g/dL)

Figura 40. Representação gráfica de a em função da concentração de ovalbumina



Figura 41. Representação gráfica de b em função da concentração de ovalbumina



Figura 42. Representação gráfica de c em função da concentração de ovalbumina



Figura 43. Representação gráfica de d em função da concentração de ovalbumina

Das figuras anteriores, obtiveram-se regressões lineares e os coeficientes destas estão sintetizados na **Tabela 16**.

a ₁	9,39
a ₂	99,17
b ₁	1,65
b ₂	- 247,67
C ₁	- 20,21
C ₂	213,56
d ₁	10,62
d ₂	- 63,60

Tabela 16. Valores dos parâmetros da Equação 16

A Figura 44 apresenta o ajuste do modelo 9 aos pontos experimentais em estudo.



Figura 44. Ajuste do Modelo 9 aos dados experimentais da Figura 4 (concentração em g/dL)

Verifica-se pela observação do gráfico da **Figura 44**, não existe qualquer modelação das curvas aos pontos experimentais, à exceção da curva de menor concentração onde o erro entre os pontos experimentais e os pontos calculados pela equação é pequeno (5%).

É expectável que este modelo seja pouco adequado visto que se trata de uma equação com um polinómio de terceiro grau em relação à temperatura, que se traduz numa oscilação pouco comum na natureza.

4.2.1 Critérios de comparação e seleção

A seleção do modelo a testar baseou-se no cálculo dos valores dos erros absolutos (valor médio obtido, valor máximo obtido e valor médio apenas nos pontos das duas soluções menos concentradas em proteína) aliado a uma avaliação qualitativa do ajuste do modelo. Os erros foram calculados de acordo com a **Equação 17** e os valores obtidos estão sintetizados na **Tabela 17**.

$$\left|\frac{Valor Experimental - Valor Calculado}{Valor Experimental}\right| \times 100$$
 Equação 17

	Erro abs	Erro absoluto médio (%) nas curvas de 5 e 10 g/dL	
Modelo	Valor Valor médio máximo		
1	8,2	25,7	13
2	7,9	16,0	5,8
3	7,4	19,5	5,4
4	7,5	15,4	8,2
5	7,0	10,9	7,6
6	4,3	14,6	8,2
7	10,0	27,5	2,8
8	10,0	27,2	1,9
9	30,5	55,6	29

Tabela 17. Critérios de comparação entre os modelos

Assim, optando pelo modelo que apresenta erros menores e, simultaneamente, um bom ajuste aos valores experimentais, foi selecionado o modelo 2para prosseguir o trabalho (na secção 4.2.3).

4.2.2 Modelo 2 ajustado à BSA

Com o objetivo de estudar a aplicabilidade do modelo a outras proteínas, foi ajustado o modelo 2 aos pontos experimentais obtidos com a BSA. O mecanismo de ajuste utilizado foi idêntico ao apresentado nos ajustes da secção 4.2.

A Tabela 18 apresenta os valores dos coeficientes da Equação 4 aplicada aos pontos experimentais da Figura 3. A variação destes coeficientes com a temperatura, pode ser encontrada nas Figuras 45 e 46.

$$ln \ \frac{\eta}{\eta_w} = A + Bc$$
 Equação 4

Т (К)	Α	В
268,15	-1,7897	52810
270,15	-1,7293	52278
273,15	-1,593	50314
278,15	-1,6035	48895
283,15	-1,5495	48225
288,15	-1,4981	46963
293,15	-1,4104	45595
298,15	-1,3424	44557

Tabela 18. Valores dos coeficientes do Modelo 2 aplicado à BSA



Figura 45 Representação gráfica do parâmetro A em função da temperatura



Figura 46 Representação gráfica do parâmetro B em função da temperatura

Assumindo os coeficientes como linearmente dependentes com a temperatura, obteve-se a **Equação 18**, equação do modelo 2 aplicado à BSA, cujos parâmetros estão sumarizados na **Tabela 19**.

$$\boldsymbol{\eta} = \boldsymbol{e}^{\left[(A_1 \times T + A_2) + (B_1 \times T + B_2) \boldsymbol{c} \right]} \times \boldsymbol{\eta}_w$$
 Equação 18

A ₁	0,01
A ₂	- 5,3
B ₁	- 268,5
B ₂	1,24 × 10⁵

Tabela 19. Valores dos parâmetros da Equação 18

Na **Figura 47**, encontra-se a representação gráfica do ajuste deste modelo, após as referidas alterações ao mesmo.



Figura 47. Ajuste do Modelo 2 aos dados experimentais da Figura 3 - BSA - (concentração em g/dL)

É possível observar que o modelo não se ajusta tão bem a estes dados exprimentais como no caso da Ovalbumina. O erro absoluto médio tem o valor de 13,2%.

Com esta proteína, não foi realizado um trabalho exaustivo com todos os modelos anteriormente estudados, visto que, o objetivo é apenas mostrar que os modelos matemáticos podem ser aplicados a outras proteínas modelo, consoante a disponibilidade e até uma maior semelhança entre a proteína e o MAb a replicar.

4.2.3 Aplicação a um MAb

Como forma de *case study*, foi testada a aplicabilidade do modelo 2 a um MAb específico, com o objetivo de determinar a concentração de proteína necessária para replicar a solução com o MAb em estudo.

Determinou-se experimentalmente a viscosidade da solução com o MAb - Tabela 20.

T (K)	2,0 <i>g/dL</i>
265,65	4,45
268,15	4,04
271,15	3,63
273,15	3,36
278,15	2,86
283,15	2,42
288,15	2,10
293,15	1,77
298,15	1,56

Tabela 20. Valores de viscosidade (mPa.s) do MAb, a diferentes temperaturas

De seguida, foram utilizadas as equações propostas nos modelos, para a determinação da concentração de proteína modelo necessária. Para isso, foi utilizado o modelo 2 aplicado à Ovalbumina e à BSA.

Os valores de concentração de proteínas necessários para a mimetização da solução com o MAb estudado estão sumarizadas na **Tabela 21**.

associauo					
Proteína	Concentração (g/dL)	Erro absoluto máximo (%)			
Ovalbumina	3,8	3,9			

12,0

8.6

BSA

Tabela 21. Valores de concentração de proteína determinados pelo Modelo 2 e erro absoluto máximo associado

Relembra-se que este valor de proteína necessário deve estar em solução juntamente com os outros constituintes já referidos.

No caso da BSA, o erro absoluto máximo obtido tem um valor igual a 8,6% que, apesar de não ser muito elevado, é bastante superior aos erros obtidos nos cálculos com a Ovalbumina, o que pode dever-se à escolha do modelo a ajustar, ainda assim, este cumpre o seu objetivo. Outro motivo, pode estar relacionado com a concentração de proteína necessária, que é também bastante superior à concentração de Ovalbumina necessária.

A **Figura 48** apresenta os valores da viscosidade da solução do MAb determinados experimentalmente e da viscosidade das soluções de Ovalbumina e BSA determinados pelos modelos.



Figura 48. Viscosidade da solução do MAb e viscosidades determinadas pelos modelos aplicados, em função da temperatura

5 Conclusões e perspetivas futuras

No final do trabalho desenvolvido concluem-se os seguintes aspetos:

- O aumento da concentração de proteína em solução, tem um maior impacto na viscosidade do que o aumento da concentração de trealose;
- Confirma-se que a variação do pH da solução e consequente afastamento do pI da proteína, influiencia a proteína. Uma variação no pH da solução de BSA conduz a variações significativas na viscosidade;
- É possível replicar soluções de MAb com soluções de proteínas modelo (menos dispendiosas), como a Ovalbumina e a BSA;
- É possível ajustar modelos matemáticos que relacionem a variação da viscosidade com a temperatura e a concentração de proteína. No presente, ajustaram-se modelos a uma gama específica de soluções com elevadas concentrações de proteína, elevadas concentrações de trealose e temperaturas entre -7,5 e 25°C;
- Foi selecionado um dos modelos para determinar que, uma solução com aproximadamente 4 g/dL de Ovalbumina e 10 g/dL de trealose, em pH = 4,6 ou uma solução com cerca de 12 g/dL de BSA e 10 g/dL de trealose, em pH = 4,7 é capaz de replicar a variação da viscosidade em função da temperatura do MAb estudado, numa gama entre 25 e - 7,5°C.

Como trabalho que pode ainda ser desenvolvido para complementar este estudo, sugerem-se os seguintes tópicos:

- Analisar a influência da variação do pH na viscosidade, especialmente a diminuição, que não foi contemplada exaustivemente neste trabalho;
- Testar a existência de outras proteínas que também possam ser utilizadas como modelo;
- Testar a aplicação dos modelos a outras proteínas terapêuticas.

6 Referências Bibliográficas

Angell, C. A., 1988, Perspective On The Glass Transition, Journal of Physics and Chemistry of Solids

Angell, C. A., 2002, *Liquid Fragility and the Glass Transition in Water and Aqueous Solutions*, Chemical Reviews

Angell, C. A., et al, 1994, *Liquid Fragility and the Glass Transition in Water and Aqueous Solutions*, Journal of Food Engineering

Atkins, P., de Paula, J., Physical Chemistry (8th Edition), Oxford

Beeley, J.A., et al., 1972, *Polyacrylamide gel isoelectric focusing of proteins: Determination of isoelectric points using an antimony electrode*, Biochimica Et Biophysica Acta

Cao, E., et al., 2003, *Effect of Freezing and Thawing Rates on Denaturation of Proteins in Aqueous Solutions*, Biotechnology and Bioengineering

Constantin, J. G., et al., 2016, *Glass Transition Temperature of Saccharide Aqueous Solutions Estimated with the Free Volume/Percolation Model*, The Journal of Physical Chemistry B

Corti, H., et al, *Diffusion of solutes in supercooled sugar aqueous solutions*, 14th International Conference on the Properties of Water and Steam in Kyoto

Corti, H., et al., 2008, Viscosity Decoupling in Supercooled Aqueous Trehalose Solutions, The Journal of Physical Chemistry B

Coulson, J.M., Richardson, J.F., 1999, *Chemical Engineering Volume 1 - Fluid Flow, Heat Transfer and Mass Transfer* (6th Edition), Elsevier

Einstein, A., 1906, Ann. Phys. 19, 289

Inoue, K., et al., 2005, *Diffusion Coefficient and the Secondary Structure of Poly-L-glutamic Acid in Aqueous Solution*, The Journal of Physical Chemistry B

Kolhe, P., et al., 2009, Impact of Freezing on pH of Buffered Solutions and Consequences for Monoclonal Antibody Aggregation, AIChE Journal

Longinotti, M. P., et al., 2008, *Viscosity of concentrated sucrose and trehalose aqueous solutions including the supercooled regime*, Journal of Physical and Chemical Reference Data

Miller, M. A., et al., 2013, *Frozen-State Storage Stability of a Monoclonal Antibody: Aggregation is Impacted by Freezing Rate and Solute Distribution*, Journal Of Pharmaceutical Sciences

Paznica, M., et al., 2012, *Thermal Aggregation of Bovine Serum Albumin in Trehalose and Sucrose Aqueous Solutions*, The Journal of Physical Chemistry B

Peng, Z.G., et al., 2005, Selective and sequential adsorption of bovine serum albumin and lysozyme from a binary mixture on nanosized magnetic particles, Elsevier

Richert, R., et al., 1990, *Dynamics of supercooled melts treated in terms of the random-walk concept*, Journal of Physics: Condensed Matter

Rodrigues, M. A., et al., 2010, *Effect of Freezing Rate and Dendritic Ice Formation on Concentration Profiles of Proteins Frozen in Cylindrical Vessels*, Journal Of Pharmaceutical Sciences

Rodrigues, M. A., et al., 2013, *The Importance of Heat Flow Direction for Reproducible and Homogeneous Freezing of Bulk Protein Solutions*, Biotechnology Progress

Roessl, U., et al., 2013, Characterization of a Laboratory-Scale Container for Freezing Protein Solutions with Detailed Evaluation of a Freezing Process Simulation, Journal Of Pharmaceutical Sciences

Rosa, M., et al., 2013, *Measuring and Modeling Hemoglobin Aggregation below the Freezing Temperature*, The Journal of Physical Chemistry B

Rossler, E., 1990, *Indications for a Change of Diffusion Mechanism in Supercooled Liquids*, Physical Review Letters

Symon, K., (1971). Mechanics (3rd Edition), Addison-Wesley

Vand, V., 1948, Viscosity of Solutions and Suspensions I, The Journal of Physical Chemistry

Vand, V., 1948, Viscosity of Solutions and Suspensions III, The Journal of Physical Chemistry

Williams, M. L., et al., 1995, *The Temperature Dependence of Relaxation Mechanisms in Amorphous Polymers and Other Glass-forming Liquids*, Journal of the American Chemical Society

Yadav, S., et al., 2011, Viscosity analysis of high concentration Bovine Serum Albumin aqueous solutions, Pharmaceutical Research

Anexo I | Viscosidade das soluções de Ovalbumina e de BSA

Ovalbumina

Na **Tabela 21** encontram-se os valores das viscosidades das soluções com 10 g/dL de trealose e diferentes concentrações de Ovalbumina; uma das soluções modelo estudadas.

Т (К)	5	10	15	30	40
265,65	4,66	С	С	С	С
268,15	4,19	5,20	8,97	29,6	66,8
271,15	3,76	4,66	7,75	25,6	56,7
273,15	3,46	4,26	7,14	23,2	50,3
278,15	2,88	3,60	5,91	18,4	38,8
283,15	2,50	3,06	4,90	15,1	31,1
288,15	2,15	2,68	4,19	12,4	24,8
293,15	1,87	2,31	3,58	10,5	20,2
298,15	1,64	2,03	3,13	8,95	17,2

Tabela 22. Valores de viscosidade (mPa.s) da soluções de Ovalbumina (g/dL), a diferentes temperaturas

(*) c indida que o ponto não pôde ser lido por congelamento da solução

BSA

A **Tabela 22** contém os valores das viscosidades das soluções com 10 g/dL de trealose e diferentes concentrações de BSA; uma das soluções modelo estudadas.

Т (К)	15	17,5	19	20	22,5	25	27,5	30
268,15	9,09	12	15,2	19,6	35,3	44,6	93,8	143,2
270,15	8,4	11	13,9	16,8	31,9	40,7	84,3	126,1
273,15	7,43	9,73	12,4	15,6	28,1	34,3	71,1	101
278,15	6,21	7,87	10,2	12,6	21,8	27,9	54,7	77,7
283,15	5,13	6,56	8,38	10,4	18	22,4	42,9	63,7
288,15	4,37	5,54	7,07	8,68	14,9	18,8	35,2	49,7
293,15	3,78	4,78	6,05	7,36	12,7	15,7	28,7	40
298,15	3,47	4,11	5,18	6,59	11,5	14	24,3	33,5

Tabela 23. Valores de viscosidade (mPa.s) da soluções de BSA (g/dL), a diferentes temperaturas
Anexo II | Viscosidade das soluções de MAb

Na **Tabela 23** encontram-se os valores das viscosidades das soluções de MAb, tanto da solução mãe como das soluções concentradas a partir desta.

T(K)	2,0	2,4	2,8	3,2	3,5	8,0
265,65	4,45	4,85	5,45	6,40	c(*)	19,10
268,15	4,04	4,50	4,82	5,74	6,12	16,80
271,15	3,63	3,93	4,26	5,05	5,27	14,40
273,15	3,36	3,65	3,89	4,63	4,86	13,20
278,15	2,86	3,06	3,21	3,82	3,97	10,70
283,15	2,42	2,64	2,67	3,12	3,29	8,79
288,15	2,10	2,22	2,27	2,60	2,73	7,20
293,15	1,77	1,91	1,92	2,19	2,33	6,00
298,15	1,56	1,68	1,73	1,96	2,07	5,14

Tabela 24. Valores de viscosidade (mPa.s) da soluções de MAb (g/dL), a diferentes temperaturas

(*) A solução congelou

Anexo III | Viscosidade da água pura

Na **Tabela 24** encontram-se os valores das viscosidades da água pura medidas no viscosímetro. Estes valores são de extrema importância para este trabalho, já que são utilizados como referência em diversos modelos.

Т (К)	Água
265,65	2,90
268,15	2,69
271,15	2,38
273,15	2,11
278,15	1,91
283,15	1,56
288,15	1,36
293,15	1,17
298,15	1,04

Tabela 25. Valores da viscosidade (mPa.s) da água, medidos a diferentes temperaturas