

# INTERAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G HUMANA COM ADSORVENTES DE QUITOSANA/ALGINATO: MODELAGEM DOS DADOS DE EQUILÍBRIO E PARÂMATROS TERMODINÂMICOS POR REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

Ana Carolina Moreno Pássaro<sup>1</sup>, Tainá Maia Mozetic<sup>1</sup>, Nádila Magalhães Millan<sup>1</sup>,  
Tiago Dias Martins<sup>1</sup>, Ivanildo José da Silva Jr.<sup>2</sup>, **Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> DEQ/UNIFESP

<sup>2</sup> DEQ/CTC/UFC

# APRESENTAÇÃO

# Apresentação

- Engenheiro Químico: Universidade Estadual de Maringá, 2003
- Mestre em Engenharia Química: UNICAMP, 2006
- Doutor em Engenharia Química: UNICAMP, 2010
- P&D: Rheabiotech Ltda, 2010-2011
- UNIFESP, campus Diadema, a partir de 08/2011
  - *Professor Adjunto IV*
  - *Área: Equipamentos e Processos de Separação*
  - *Disciplinas: Operações Unitárias (EQ, FB, QI), Biotecnologia (eletiva FB/Bio), Introdução à Eng. Química (EQ), Eng. Bioquímica (EQ), Processos Industriais III (QI), TCC (EQ), etc*
  - *Pesquisa: Recuperação e Purificação de Proteínas e Ensino de EQ, com destaque para o uso de metodologias ativas e de novas ferramentas como Facebook, YouTube e Kahoot.*

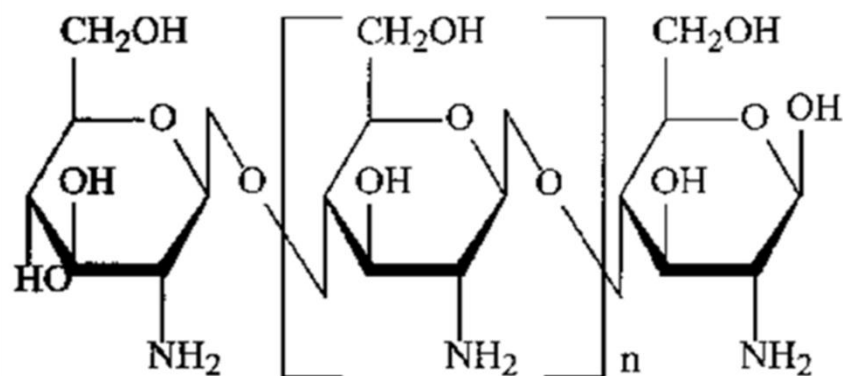
# INTRODUÇÃO



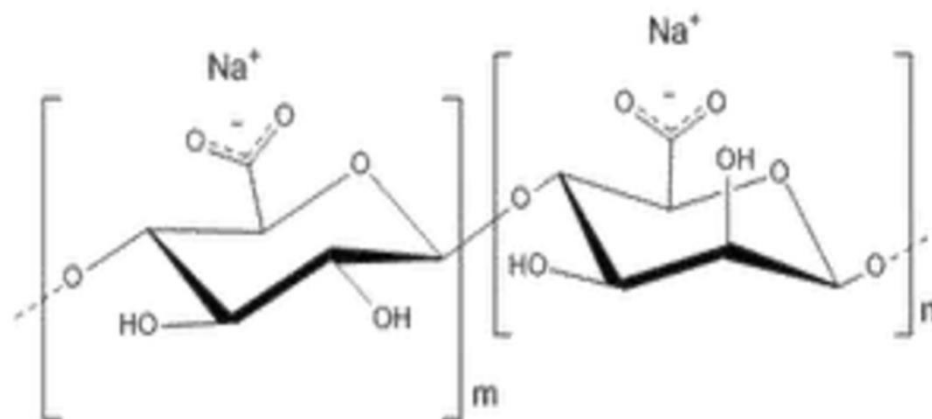
**O desenvolvimento de adsorventes de baixo custo com alta capacidade de adsorção e seletividade tem sido um grande desafio!**

# Adsorvente de Quitosana e Alginato

- Polímeros naturais abundantes;
- Baixo custo;
- Boa capacidade de adsorção.



Quitosana



Alginato

**Poucos registros sobre o uso combinado como adsorvente em cromatografia de afinidade para a adsorção de biomoléculas**

# Adsorvente de Quitosana e Alginato

## ■ Histórico

- *Rodrigues (2010) estudou a adsorção de celulase e BSA em adsorvente de quitosana e alginato epoxidado;*
- *Testes de adsorção em corantes → adsorção irreversível do corante;*
- *Por que não usar o corante como ligante? → conceito de cromatografia por afinidade por corantes imobilizados;*
- *Em 2011 nasce a parceria UNIFESP e GPSA/UFC: ICs, TCC, mestrado e doutorado para adsorção de Imunoglobulina G;*
- *Características do adsorvente → complexidade → pesquisa!!!*

# Imunoglobulina G humana

Biomolécula glicoproteica;  
Anticorpo humano mais  
abundante (75%).

Obtenção da IgG:

*Fracionamento do plasma humano;*  
*Métodos cromatográficos.*



A IgG pode ser empregada em:

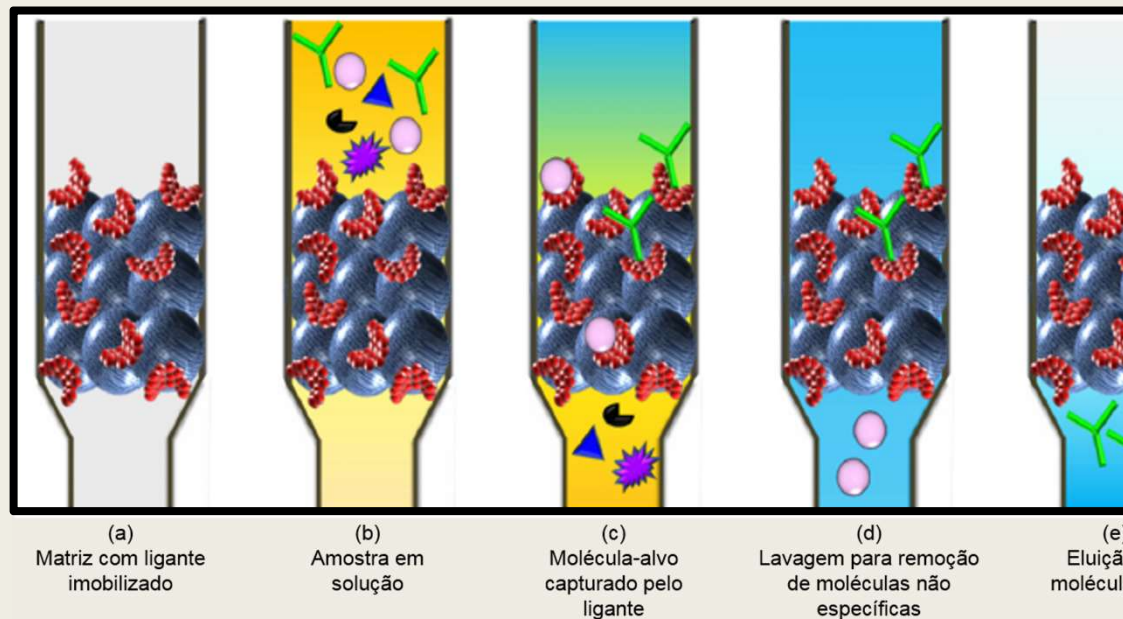
- *Imunodeficiências congênitas ou adquiridas;*
- *Tratamento de deficiências seletivas de anticorpos, como no caso de inflamações crônicas;*
- *Tratamento de doenças autoimunes;*
- *Tratamento de alguns tipos de câncer.*



# Cromatografia por Afinidade

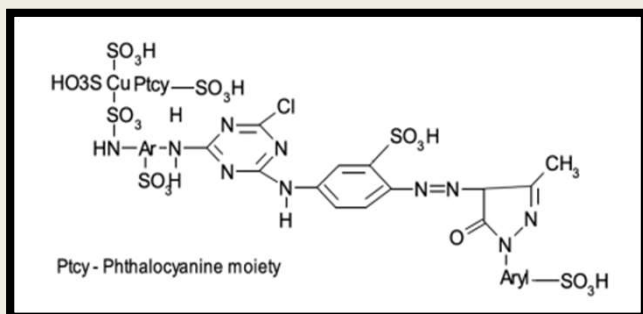
■ Etapas envolvidas na purificação de anticorpos utilizando cromatografia por afinidade:

■ Ligantes de afinidade  
— *Corantes reativos.*

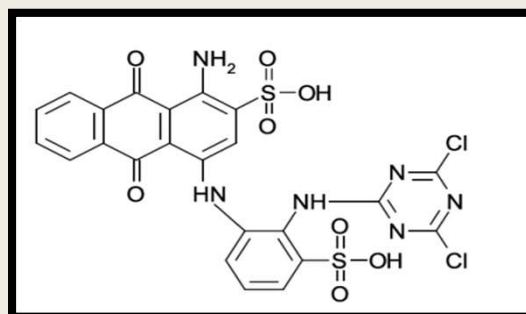


Fonte: AYYAR, ARORA, *et al.* (2012)

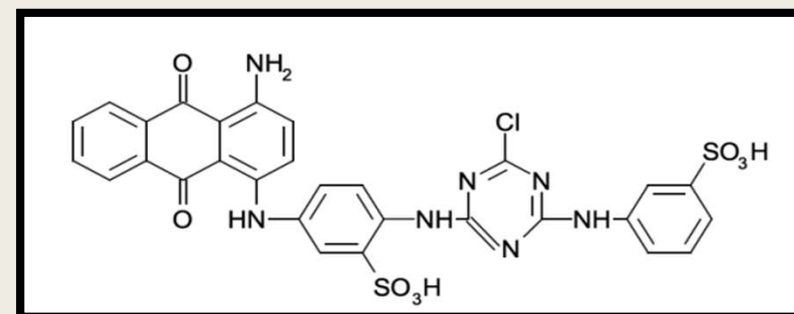
## Reativo Verde 5



## Reativo Azul 4



## Cibacron Blue F3GA



Fonte: GONDIM (2012)

# Redes Neurais Artificiais (RNAs)

- Desenvolvidas na década de 1940;
  - *Imitar o cérebro humano:*
  - *Aprender com exemplos*
  - *Simular novos eventos*
- Alternativa à modelagem fenomenológica
  - *Em casos complexos.*
  - *Não é necessário se conhecer como são as relações entre as variáveis dependentes e independentes*
- Ref.: BRAGA, A. P. et al., Redes Neurais Artificiais: Teoria e Aplicações. 2ª ed. LTC, 2007.

# Redes Neurais Artificiais (RNAs)

- Etapas para obtenção do modelo

- *Treinamento*
- *Validação*
- *Teste*

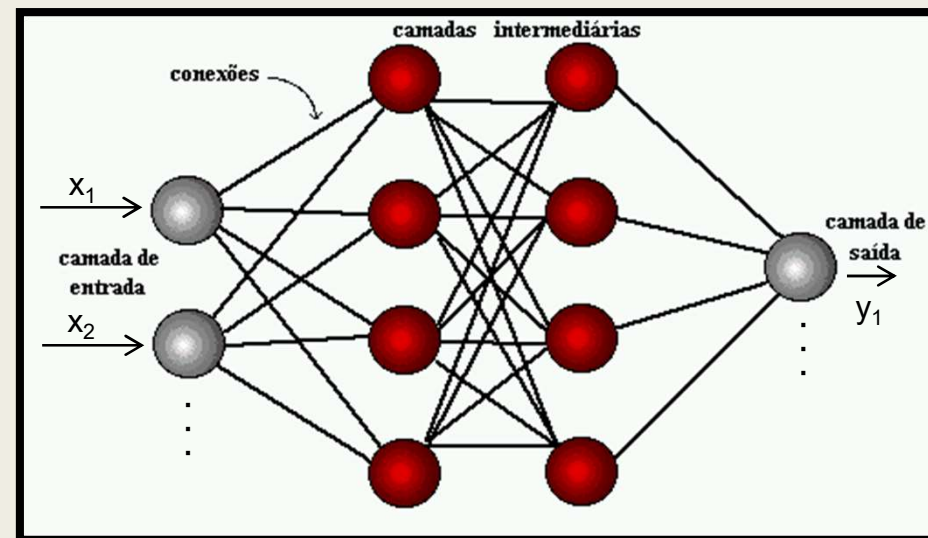
- Ajuste dos parâmetros

- *Algoritmos de Otimização*
- *Minimizam uma função objetivo*

- O modelo pode ser atualizado e melhorado conforme novos dados forem coletados

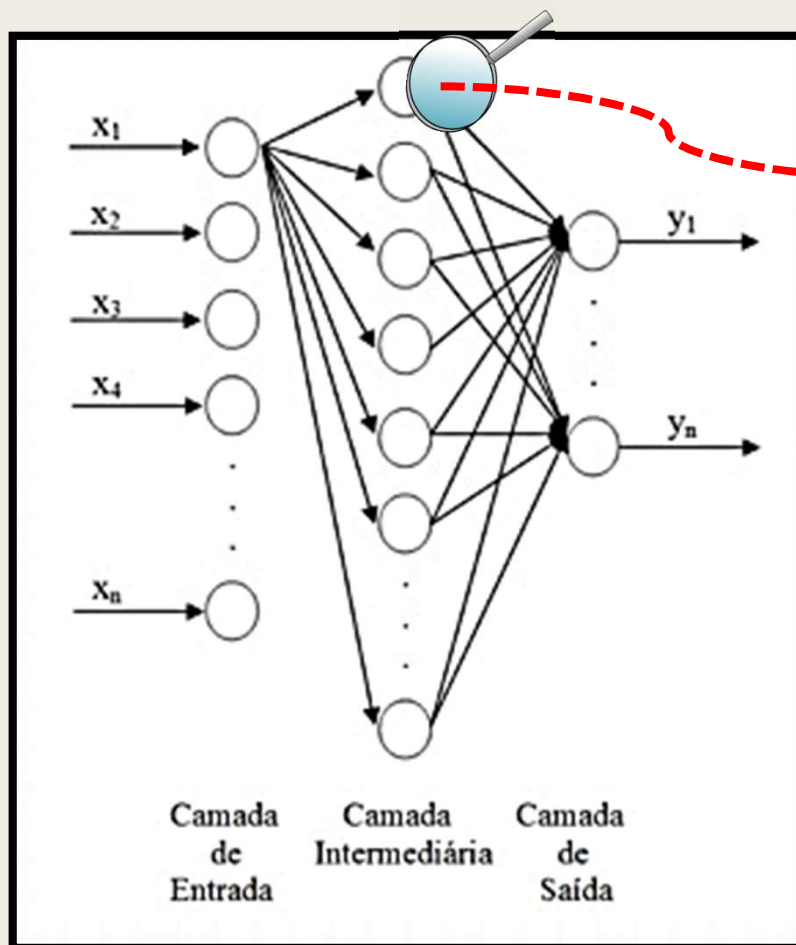
# Redes Neurais Artificiais (RNAs)

- Metodologia computacional que realiza análises multivariadas.
- RNAs que podem executar tarefas tais como:
  - *Prever um valor de produção;*
  - *Reconhecer um padrão em dados multivariados e completar um padrão conhecido;*
  - *Mostram a variação da concentração de equilíbrio no sólido adsorvente com a concentração da fase líquida em determinada temperatura.*
- Parâmetros:
  - *Número de camadas;*
  - *Algoritmo de treinamento.*

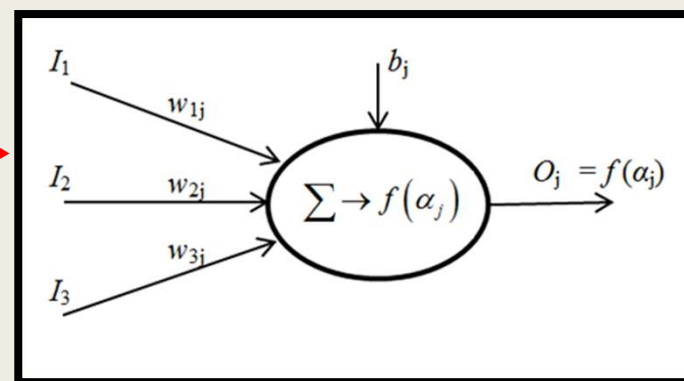


Fonte: Adaptado de Carvalho (2009)

# Redes Neurais Artificiais (RNAs)



Neurônio genérico



$$\alpha_j = \sum_{i=1}^Z w_{ij} I_i + b_j$$

Função de ativação

Entrada camada de saída =  $f(\text{saída camada oculta})$

$$y_n = f \left( \sum_{j=1}^W w_{jk} f \left( \sum_{i=1}^Z w_{ij} x_i + b_j \right) + b_k \right)_n$$

Resposta do neurônio  $n$  na camada de saída

Equação para **um RNA** com uma camada oculta.

# OBJETIVOS



# Objetivos

- Aquisição de dados de adsorção de IgG humana em adsorventes de quitosana/alginato em 4 diferentes temperaturas (4° C, 15° C, 25° C e 37° C), variando-se o pH na faixa entre 6,0 e 8,5, utilizando os tampões biológicos MOPS, TRIS, HEPES e fosfato de sódio sem corantes imobilizados (experimentos controle);
- Aquisição dos dados de adsorção de IgG nas mesmas condições anteriores, mas utilizando apenas o tampão biológico fosfato de sódio juntamente com os corantes imobilizados;
- Modelagem matemática dos dados de adsorção feita utilizando redes neurais artificiais e comparada com métodos não lineares clássicos aplicados nos modelos de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin.

# MATERIAIS E MÉTODOS



# Obtenção das Isotermas

5,0 mg quitosana/alginato epoxilado

1,0 mL de solução de IgG  
(0.5-10mg.mL<sup>-1</sup>)



Agitação  
(3h)



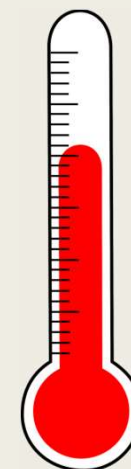
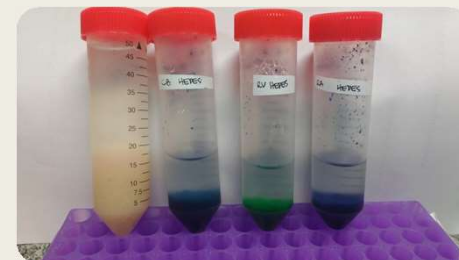
Espectrofotômetro  
(Bradford)

ISOTERMAS DE  
ADSORÇÃO

$$q^* = q_r \ln(1 + K_I C^*)$$

$$q^* = \frac{q_m C^*}{(K_d + C^*)}$$

$$q^* = \frac{q_m (C^*)^n}{K_{d(LF)} + (C^*)^n}$$



4°C  
15°C  
25°C  
37°C

# Obtenção dos parâmetros termodinâmicos

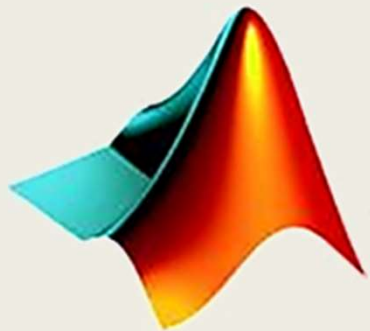
$$\Delta G^0 = RT \ln K_d \quad \ln K_d = \frac{\Delta H^0}{RT} + J$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad K_T = \exp\left(\frac{\Delta G_{máx}}{RT}\right)$$

*Equilíbrio:*  
 $\Delta G = 0$



# Treinamento e Simulação com RNAs



MATLAB®

- Avaliação da capacidade das RNAs de **simularem isotermas** com base nos dados previstos pelo **modelo de melhor ajuste**.

- 28 isotermas ao total (interpolação)

- Isotermas divididas em três conjuntos: Conjunto 1, Conjunto 2 e Conjunto 3.

↓  
Fosfato de sódio  
Tansig vs. Logsig  
LM/Interface  
2 camadas ocultas

↓  
Fosfato de sódio  
NARX/Código  
RB/LM/RP  
1 camada oculta.

↓  
Todas isotermas/NA  
Código + RB/LM  
1 camada oculta  
oc / Treino

# RESULTADOS

# ADSORÇÃO SEM CORANTES IMOBILIZADOS

Tampões MOPS, TRIS-HCl, HEPES e fosfato de sódio  
Experimentos Controle

# TAMPÃO MOPS

Resultados

## ■ Modelo de Langmuir

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
$Q_m$ (mg/g seca)	750,6 ± 199,96	261,93 ± 118,23	802,83 ± 411,28	513,06 ± 148,76
$K_d$ (mol/L)	(2,41 ± 1,49) 10 <sup>-4</sup>	(4,82 ± 3,37) 10 <sup>-4</sup>	(6,76 ± 5,09) 10 <sup>-4</sup>	(3,09 ± 1,87) 10 <sup>-4</sup>
$R^2$	0,894	0,951	0,948	0,899
$\chi^2$	4394,97	102,36	794,27	1858,03

## ■ Modelo de Langmuir-Freundlich

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
$Q_m$ (mg/g)	524,50 ± 137,23	119,60 ± 24,91	431,01 ± 206,15	320,45 ± 48,81
$K_{d(LF)}$ (mol/L)	(1,92 ± 1,05) 10 <sup>-4</sup>	(2,15 ± 0,80) 10 <sup>-4</sup>	(4,05 ± 2,13) 10 <sup>-4</sup>	(2,48 ± 1,21) 10 <sup>-4</sup>
$n$	1,66 ± 0,91	1,93 ± 0,78	1,45 ± 0,62	2,11 ± 0,92
$R^2$	0,888	0,955	0,944	0,917
$\chi^2$	4616,37	92,96	859,88	1538,30

## ■ Modelo de Temkin

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
$Q_m$ (mg/g)	236,03 ± 111,56	106,74 ± 63,88	336,06 ± 222,49	179,21 ± 85,64
$K_t$ (L/mol)	(6,24 ± 6,00) 10 <sup>-5</sup>	(2,31 ± 2,07) 10 <sup>-5</sup>	(1,59 ± 1,47) 10 <sup>-5</sup>	(4,41 ± 4,00) 10 <sup>-5</sup>
$R^2$	0,882	0,950	0,947	0,891
$\chi^2$	4870,85	105,00	816,34	2021,42

- Em 4° e 25°C: modelo de **Langmuir** apresentou melhor ajuste
- Em 15° e 37°C: modelo de **Langmuir-Freundlich** foi o melhor ajuste
- Os **erros** associados a cada ajuste
  - Menores no modelo de Langmuir-Freundlich
  - mesma ordem de grandeza do valor para as constantes de dissociação ( $K_d$ ,  $K_{d(LF)}$ ,  $K_t$ )
- $n > 1$  no ajuste pelo modelo Langmuir-Freundlich: **adsorção multicamadas** - cooperatividade positiva
- Parâmetros:
  - $Q_m$  evidenciaram a **alta capacidade de adsorção** de IgG
  - 25°C > 4°C > 37°C > 15°C (Langmuir e Temkin)  
4°C > 25°C > 37°C > 15°C (Langmuir-Freundlich)
  - $K_d$ ,  $K_{d(LF)}$  e  $K_t$ : valores típicos de constantes de dissociação que caracterizam sistemas de **pseudobioafinidade**
  - 25°C > 15°C > 37°C > 4°C (Langmuir)  
25°C > 37°C > 15°C > 4°C (Langmuir-Freundlich)



# TAMPÃO TRIS

Resultados



## ■ Modelo de Langmuir

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
Q <sub>m</sub> (mg/g)	(1,88 ± 1,79) 10 <sup>3</sup>	1,69 10 <sup>8</sup> ± 3,71 10 <sup>13</sup>	2,06 10 <sup>8</sup> ± 9,49 10 <sup>13</sup>	1,58 10 <sup>3</sup> ± 766,18
K <sub>d</sub> (mol/L)	(2,52 ± 2,96) 10 <sup>-3</sup>	313,88 ± 6,93 10 <sup>7</sup>	562,64 ± 2,61 10 <sup>8</sup>	(1,15 ± 0,78) 10 <sup>-3</sup>
R <sup>2</sup>	0,945	0,865	0,845	0,960
χ <sup>2</sup>	1540,71	3224,19	2064,67	1941,76

## ■ Modelo de Langmuir-Freundlich

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
Q <sub>m</sub> (mg/g)	2,71 10 <sup>7</sup> ± 8,31 10 <sup>11</sup>	353,68 ± 34,76	1,12 10 <sup>8</sup> ± 4,36 10 <sup>13</sup>	882,33 ± 446,06
K <sub>d(LF)</sub> (mol/L)	1,26 10 <sup>2</sup> ± 3,89 10 <sup>6</sup>	6,17 10 <sup>3</sup> ± 8,07 10 <sup>4</sup>	2,72 10 <sup>3</sup> ± 1,18 10 <sup>9</sup>	(8,03 ± 3,56) 10 <sup>-4</sup>
n	1,51 ± 0,46	10,77 ± 7,73	2,04 ± 1,61	1,34 ± 0,47
R <sup>2</sup>	0,989	0,912	0,923	0,957
χ <sup>2</sup>	337,03	2114,55	1024,98	2063,01

## ■ Modelo de Temkin

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
Q <sub>m</sub> (mg/g)	5,81 10 <sup>6</sup> ± 5,44 10 <sup>10</sup>	7,64 10 <sup>6</sup> ± 1,50 10 <sup>11</sup>	1,34 10 <sup>6</sup> ± 7,95 10 <sup>9</sup>	672,59 ± 411,15
K <sub>t</sub> (L/mol)	4,72 10 <sup>-10</sup> ± 4,67 10 <sup>-6</sup>	3,13 10 <sup>-10</sup> ± 6,00 10 <sup>-6</sup>	1,21 10 <sup>-9</sup> ± 7,33 10 <sup>-6</sup>	(9,21 ± 7,33) 10 <sup>-6</sup>
R <sup>2</sup>	0,944	0,865	0,845	0,959
χ <sup>2</sup>	1759,66	3224,24	2064,92	1989,09

- Em 4°, 15° e 25°C: modelo de **Langmuir-Freundlich** foi o melhor ajuste
- Em 37°C: modelo de **Langmuir** melhor representou os dados
- Os **erros** associados a cada ajuste – exceto aos dados a 37°C:
  - Maiores que os valores
  - Descreibiliza os resultados, deixando de ser confiáveis valores do R<sup>2</sup> (inconsistência física)
- n>1 no ajuste pelo modelo Langmuir-Freundlich: **adsorção multicamadas**
- Parâmetros:
  - Q<sub>m</sub> evidenciaram a **alta capacidade de adsorção** (lgG)
  - 25°C > 15°C > 4°C > 37°C (Langmuir)  
25°C > 4°C > 37°C > 15°C (Langmuir-Freundlich)  
15°C > 4°C > 25°C > 37°C (Temkin)
  - K<sub>D</sub>, K<sub>D(LF)</sub> e K<sub>t</sub>: típicos de sistemas de **pseudobioafinidade**
  - 25°C > 15°C > 4°C > 37°C (Langmuir)  
4°C > 15°C > 25°C > 37°C (Langmuir-Freundlich)  
37°C > 25°C > 4°C > 15°C (Temkin)



# TAMPÃO HEPES

Resultados



## ■ Modelo de Langmuir

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
$Q_m$ (mg/g)	1045,93 ± 212,89	393,96 ± 62,20	633,02 ± 83,34	491,85 ± 27,20
$K_d$ (mol/L)	$(4,07 \pm 1,47) \cdot 10^{-4}$	$(7,46 \pm 4,2) \cdot 10^{-5}$	$(9,10 \pm 4,00) \cdot 10^{-5}$	$(8,29 \pm 1,60) \cdot 10^{-5}$
$R^2$	0,977	0,862	0,932	0,984
$\chi^2$	1210,74	3402,68	3535,12	505,09

## ■ Modelo de Langmuir-Freundlich

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
$Q_m$ (mg/g)	1447,24 ± 1541,65	333,15 ± 37,10	1279,17 ± 2052,05	544,56 ± 103,47
$K_{d(LF)}$ (mol/L)	$(5,52 \pm 6,37) \cdot 10^{-4}$	$(5,02 \pm 3,47) \cdot 10^{-5}$	$(2,55 \pm 5,39) \cdot 10^{-4}$	$(1,01 \pm 0,39) \cdot 10^{-4}$
$n$	0,85 ± 0,30	2,39 ± 1,46	0,54 ± 0,33	0,84 ± 0,20
$R^2$	0,978	0,892	0,945	0,986
$\chi^2$	1402,31	3213,51	3418,47	542,91

## ■ Modelo de Temkin

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
$Q_m$ (mg/g)	371,39 ± 107,70	92,03 ± 34,61	147,69 ± 35,89	115,97 ± 14,02
$K_t$ (L/mol)	$(3,36 \pm 1,67) \cdot 10^{-5}$	$(3,97 \pm 4,75) \cdot 10^{-4}$	$(3,59 \pm 2,69) \cdot 10^{-4}$	$(3,66 \pm 1,38) \cdot 10^{-4}$
$R^2$	0,976	0,832	0,939	0,982
$\chi^2$	1261,58	4154,09	3459,83	586,13

- Modelo de **Langmuir** apresentou o melhor ajuste em todas as temperaturas

- Os **erros** associados a cada parâmetro com a mesma ordem de grandeza

- $n > 1$  no ajuste pelo modelo Langmuir-Freundlich: **adsorção em multicamadas**

- Parâmetros:

- $Q_m$  evidenciaram a **alta capacidade de adsorção de IgG**

- $4^\circ\text{C} > 25^\circ\text{C} > 37^\circ\text{C} > 15^\circ\text{C}$  (Langmuir, Langmuir-Freundlich e Temkin)

- $K_D$ ,  $K_{D(LF)}$  e  $K_t$ : valores típicos de constantes de dissociação que caracterizam sistemas de **pseudobioafinidade**

- $4^\circ\text{C} > 25^\circ\text{C} > 37^\circ\text{C} > 15^\circ\text{C}$  (Langmuir e Langmuir-Freundlich)  
 $15^\circ\text{C} > 37^\circ\text{C} > 25^\circ\text{C} > 4^\circ\text{C}$  (Temkin)



# TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO

Resultados



## ■ Modelo de Langmuir

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
$Q_m$ (mg/g)	272,81 ± 66,52	140,57 ± 33,61	315,1 ± 49,95	750,31 ± 180,22
$K_d$ (mol/L)	(4,28 ± 2,24) 10 <sup>-4</sup>	(3,25 ± 1,70) 10 <sup>-4</sup>	(3,48 ± 1,28) 10 <sup>-4</sup>	(8,03 ± 3,10) 10 <sup>-4</sup>
$R^2$	0,937	0,919	0,961	0,979
$\chi^2$	378,42	99,96	352,94	434,37

## ■ Modelo de Langmuir-Freundlich

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
$Q_m$ (mg/g)	202,21 ± 70,16	3,29 10 <sup>6</sup> ± 3,38 10 <sup>10</sup>	216,50 ± 18,22	546,32 ± 233,91
$K_{d(LF)}$ (mol/L)	(3,58 ± 1,73) 10 <sup>-4</sup>	7,75 ± 7,00 10 <sup>5</sup>	(3,70 ± 1,19) 10 <sup>-4</sup>	(6,90 ± 2,53) 10 <sup>-4</sup>
$n$	1,37 ± 0,63	0,54 ± 0,46	1,91 ± 0,46	1,23 ± 0,40
$R^2$	0,925	0,932	0,982	0,977
$\chi^2$	374,04	83,50	199,38	612,75

## ■ Modelo de Temkin

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
$Q_m$ (mg/g)	90,57 ± 36,17	42,55 ± 14,50	103,15 ± 30,36	289,66 ± 105,91
$K_t$ (L/mol)	(3,49 ± 2,40) 10 <sup>-5</sup>	(5,60 ± 4,00) 10 <sup>-5</sup>	(4,33 ± 2,67) 10 <sup>-5</sup>	(1,49 ± 0,80) 10 <sup>-5</sup>
$R^2$	0,926	0,927	0,953	0,974
$\chi^2$	368,28	89,54	432,44	556,46

- Em 4° e 37°C: modelo de **Langmuir** apresentou melhor ajuste
- Em 15° e 25°C: modelo de **Langmuir-Freundlich** foi o melhor ajuste
- Os **erros** associados a cada ajuste
  - mesma ordem de grandeza do valor para as constantes de dissociação ( $K_d$ ,  $K_{d(LF)}$  e  $K_t$ )
  - Maiores que os parâmetros de ajuste de Langmuir-Freundlich a 15°C: sem sentido físico
- $n > 1$  no ajuste pelo modelo Langmuir-Freundlich: **adsorção multicamadas** - cooperatividade positiva
- Parâmetros:
  - $Q_m$  evidenciaram a **alta capacidade de adsorção** em  $lgG$
  - 37°C > 25°C > 4°C > 15°C (Langmuir e Temkin)  
15°C > 37°C > 25°C > 4°C (Langmuir-Freundlich)
  - $K_d$ ,  $K_{d(LF)}$  e  $K_t$ : valores típicos de constantes de dissociação que caracterizam sistemas de **pseudobioafinidade**
  - 37°C > 4°C > 25°C > 15°C (Langmuir)  
15°C > 37°C > 25°C > 4°C (Langmuir-Freundlich)  
15°C > 25°C > 4°C > 37°C (Temkin)

# Comparando com resultados anteriores...

- Parâmetros ajustados para os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich para os tampões HEPES (25 mM pH 6,8) e MES (25 mM pH 6,5), a 4°C e 37°C, sem corantes imobilizados
- Millan (2016)

$n > 1$ : indicando possível formação de multicamadas na adsorção

	T (°C)	Langmuir			Langmuir-Freundlich		
		$Q_m$ (mg/g seca)	$K_d$ (mol/L)	$R^2$	$Q_m$ (mg/g seca)	$K_{LF}$ (mol/L) ( $10^{-5}$ )	$n$
HEPES	4	919,66 ± 418,58	(2,93 ± 2,13) $10^{-5}$	0,920	455,21 ± 76,50	1,54 ± 0,59	2,37 ± 0,89
	37	387,64 ± 54,03	(2,10 ± 0,68) $10^{-6}$	0,955	284,15 ± 22,23	1,76 ± 0,41	1,86 ± 0,41
MES	4	430,73 ± 69,72	(1,48 ± 0,58) $10^{-5}$	0,936	319,90 ± 31,77	1,11 ± 0,32	1,86 ± 0,47
	37	362,14 ± 34,65	(1,94 ± 0,42) $10^{-5}$	0,979	302,20 ± 30,52	1,72 ± 0,30	1,35 ± 0,23

- Aumento da temperatura causava uma diminuição na capacidade de adsorção: Dotto *et al* (2011)

# ADSORÇÃO COM CORANTES IMOBILIZADOS

Reativo Azul, Reativo Verde e Cibacron Blue



# LANGMUIR- FREUNDLICH

Resultados





## ■ Reativo Verde

Parâmetro s	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
$Q_m$ (mg/g)	490,16 ± 53,03	4,71 10 <sup>6</sup> ± 1,76 10 <sup>11</sup>	102,12 ± 29,95	877,65 ± 2693,66
$K_{d(LF)}$ (mol/L)	(2,05 ± 3,46) 10 <sup>-2</sup>	18,85 ± 7,13 10 <sup>5</sup>	(1,69 ± 1,69) 10 <sup>-3</sup>	(1,60 ± 4,86) 10 <sup>-3</sup>
n	3,46 ± 1,11	0,85 ± 0,60	1,89 ± 0,88	0,73 ± 0,34
R <sup>2</sup>	0,970	0,915	0,920	0,960
χ <sup>2</sup>	1131,07	285,22	102,24	202,99

## ■ Reativo Azul

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
$Q_m$ (mg/g)	237,23 ± 34,72	1014,47 ± 399,64	242,21 ± 166,88	447,19 ± 44,08377
$K_{d(LF)}$ (mol/L)	(3,27 ± 1,25) 10 <sup>-4</sup>	(4,17 ± 1,09) 10 <sup>-3</sup>	(6,47 ± 8,99) 10 <sup>-4</sup>	(1,55 ± 3,30) 10 <sup>-2</sup>
n	1,59 ± 0,53	1,70 ± 0,33	1,43 ± 1,30	3,82 ± 1,55
R <sup>2</sup>	0,950	0,991	0,763	0,947
χ <sup>2</sup>	428,32	364,89	1941,25	2014,14

## ■ Cibacron Blue

Parâmetros	Temperatura (°C)			
	4	15	25	37
$Q_m$ (mg/g)	173,58 ± 14,89	1124,05 ± 675,86	984,80 ± 455,80	681,54 ± 76,25
$K_{d(LF)}$ (mol/L)	(9,95 ± 2,09) 10 <sup>-4</sup>	(4,19 ± 1,87) 10 <sup>-3</sup>	(9,03 ± 3,51) 10 <sup>-4</sup>	0,30 ± 1,01
n	3,12 ± 1,54	1,74 ± 0,55	1,14 ± 0,27	4,97 ± 2,06
R <sup>2</sup>	0,922	0,975	0,987	0,955
χ <sup>2</sup>	496,14	1283,82	612,28	3354,13

# Comparando os resultados...

## ■ $Q_m$

- 4°C: *Reativo Verde* > *Reativo Azul* > *Cibacron Blue*
- 15°C e 37°C: *Reativo Verde* > *Cibacron Blue* > *Reativo Azul*
- 25°C: *Cibacron Blue* > *Reativo Azul* > *Reativo Verde*

## ■ $K_d$

- 4°C, 15°C e 25°C: *Reativo Verde* > *Cibacron Blue* > *Reativo Azul*
- 37°C: *Cibacron Blue* > *Reativo Azul* > *Reativo Verde*

- Experimentos com corantes → uma **maior capacidade** de adsorção da IgG do que os sem corantes

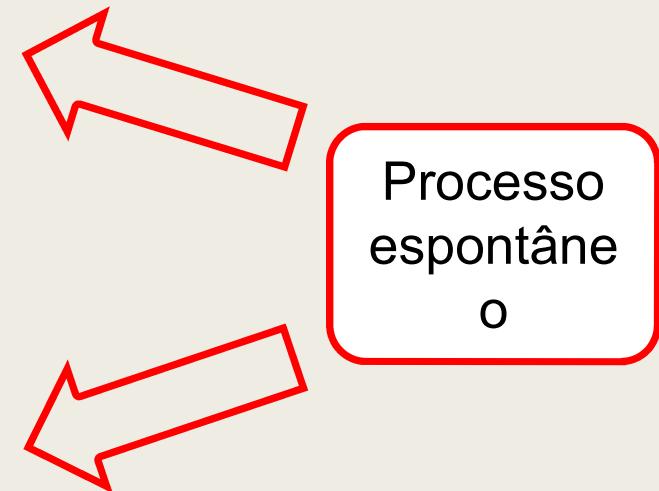
# PARÂMETROS TERMODINÂMICOS

Energia livre de Gibbs, entalpia e entropia

# Energia Livre de Gibbs: $\Delta G_{\text{máx}}$

Temperatura (°C)	$\Delta G_{\text{máx}}$ (kJ/mol)			
	MOPS	TRIS	HEPES	FOSFATO
4	-22,30	-49,45	-23,72	-23,63
15	-25,56	-52,40	-18,75	-23,44
25	-27,37	-50,86	-19,65	-24,89
37	-25,85	-29,88	-20,39	-28,64

Temperatura (°C)	$\Delta G_{\text{máx}}$ (kJ/mol)		
	Cibacron blue	Reativo verde	Reativo azul
4	-22,36	-29,39	-23,09
15	-49,63	-30,38	-49,72
25	-28,52	-28,49	-26,27
37	-37,21	-27,65	-29,62



- $\uparrow$  Quantidade de proteína adsorvida,  $\downarrow \Delta G_{\text{máx}}$
- Bresolin *et al.* (2009), estudando adsorção de anticorpos monoclonais em PEVA-CM-Asp-Zn(II): mesmas ordens de grandezas de  $\Delta G_{\text{máx}}$
- Bayramoglu, Okteme Arica (2007):  $\Delta G_{\text{máx}}$  (-37,6 kJ / mol)

# Entropia: $\Delta S^\circ$

Temperatura (°C)	$\Delta S^\circ$ (J/mol)			
	MOPS	TRIS	HEPES	FOSFATO
4	80,37	178,63	85,67	85,53
15	88,62	182,05	65,14	81,61
25	91,72	170,77	65,97	83,73
37	83,27	96,48	65,81	92,59

Temperatura (°C)	$\Delta S^\circ$ (J/mol)		
	Cibacron blue	Reativo verde	Reativo azul
4	80,33	106,28	83,25
15	171,95	105,66	172,53
25	95,34	95,77	88,05
37	119,68	89,36	95,45

Aumento da  
desordem do  
sistema

Uso de corantes  
aumentou a  
afinidade da IgG  
pela matriz  
quitosana /alginato

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

# **SIMULAÇÃO EM REDES NEURAIS ARTIFICIAIS**

# Resultados para cada conjunto

## ■ Conjunto 1: Fosfato de sódio/duas camadas ocultas/Interface

- Bons resultados para  $R^2$  e  $F_{OBJ}$  de treinamento e validação;
- Melhores simulações com função *logsig* (máximo  $R^2$ : 0,5087) → **Insatisfatório**
- Uma camada oculta: ligeira melhora na simulação (máximo  $R^2$ : 0,6069) →

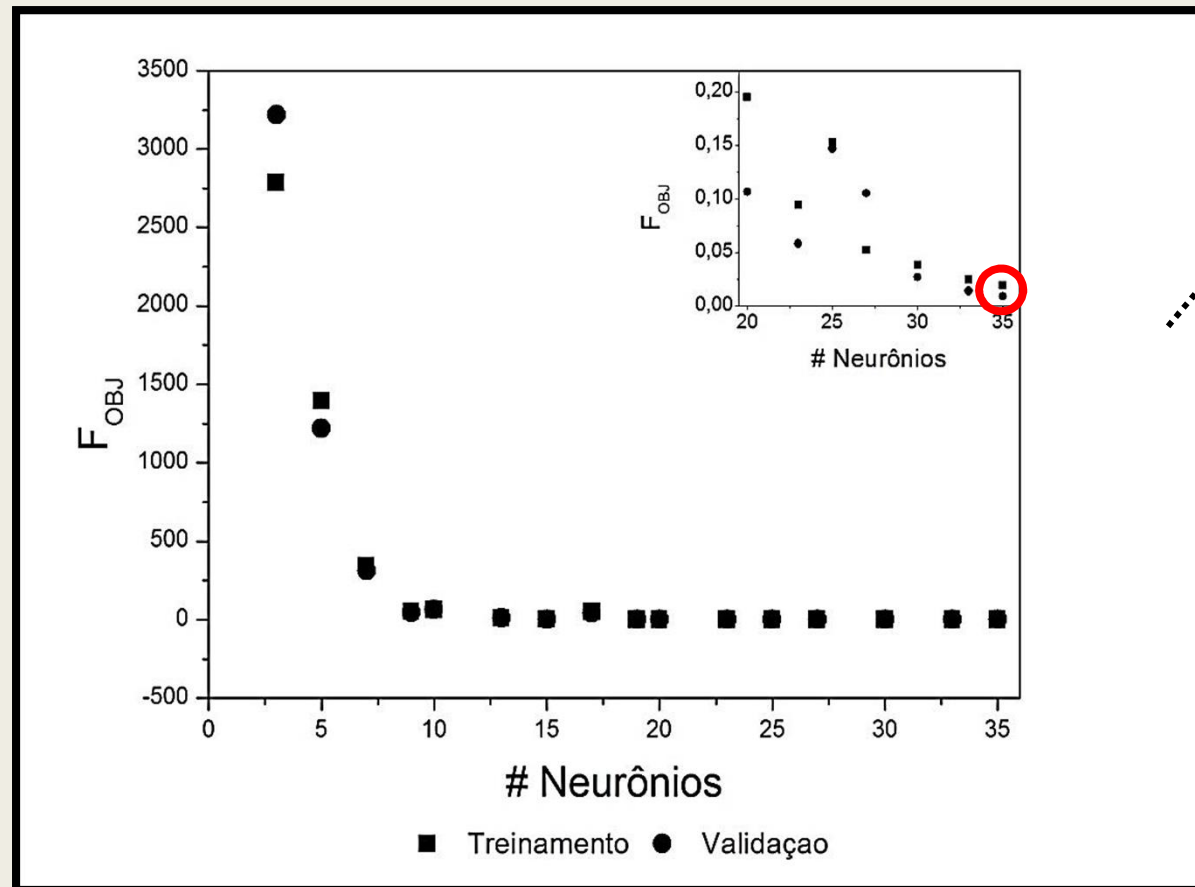
## ■ Conjunto 2: Fosfato de sódio/uma camada oculta/Código

- Sem melhoras significativas para  $R^2$  e  $F_{OBJ}$  de treinamento e validação;
  - Estabilização de  $F_{OBJ}$ :  $RB > LM > RP$ ;
- Grande melhora nas simulações: melhores  $R^2$  em torno de 0,999 → **Satisfatório!**

## ■ Conjunto 3: Todas isotermas/uma camada oculta/Código

- Maiores desvios para  $R^2$  e  $F_{OBJ}$  de treinamento e validação: ↑ Complexidade; → **Satisfatório!**
- Melhores simulações com  $R^2$  em torno de 0,999;
- Desempenho dos algoritmos na simulação:  $RB > LM > RP$ .

# Conjunto 1: Treinamento e validação

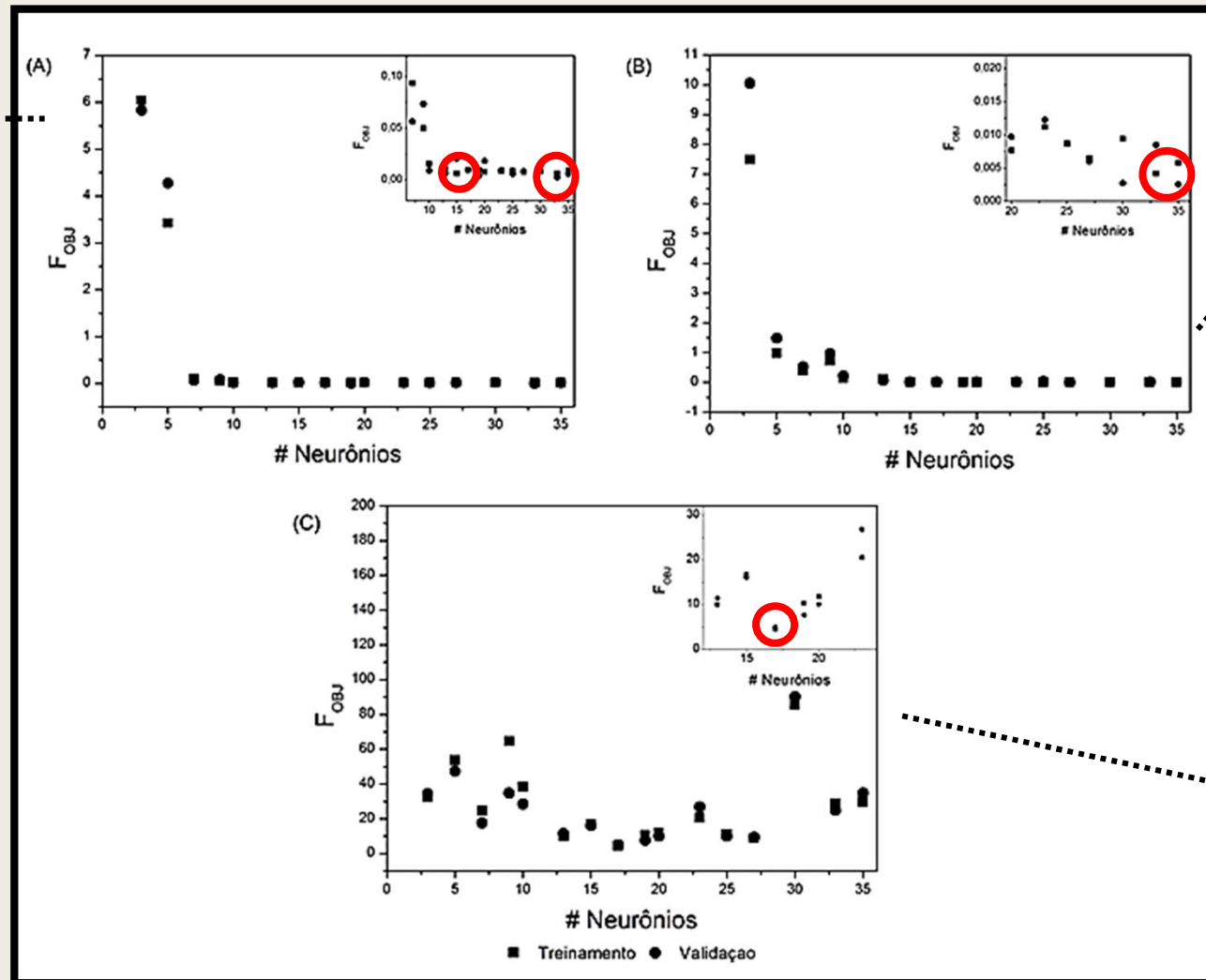


Levenberg-  
Marquardt



# Conjunto 2: Treinamento e validação

Regulação Bayesiana



Levenberg-Marquardt

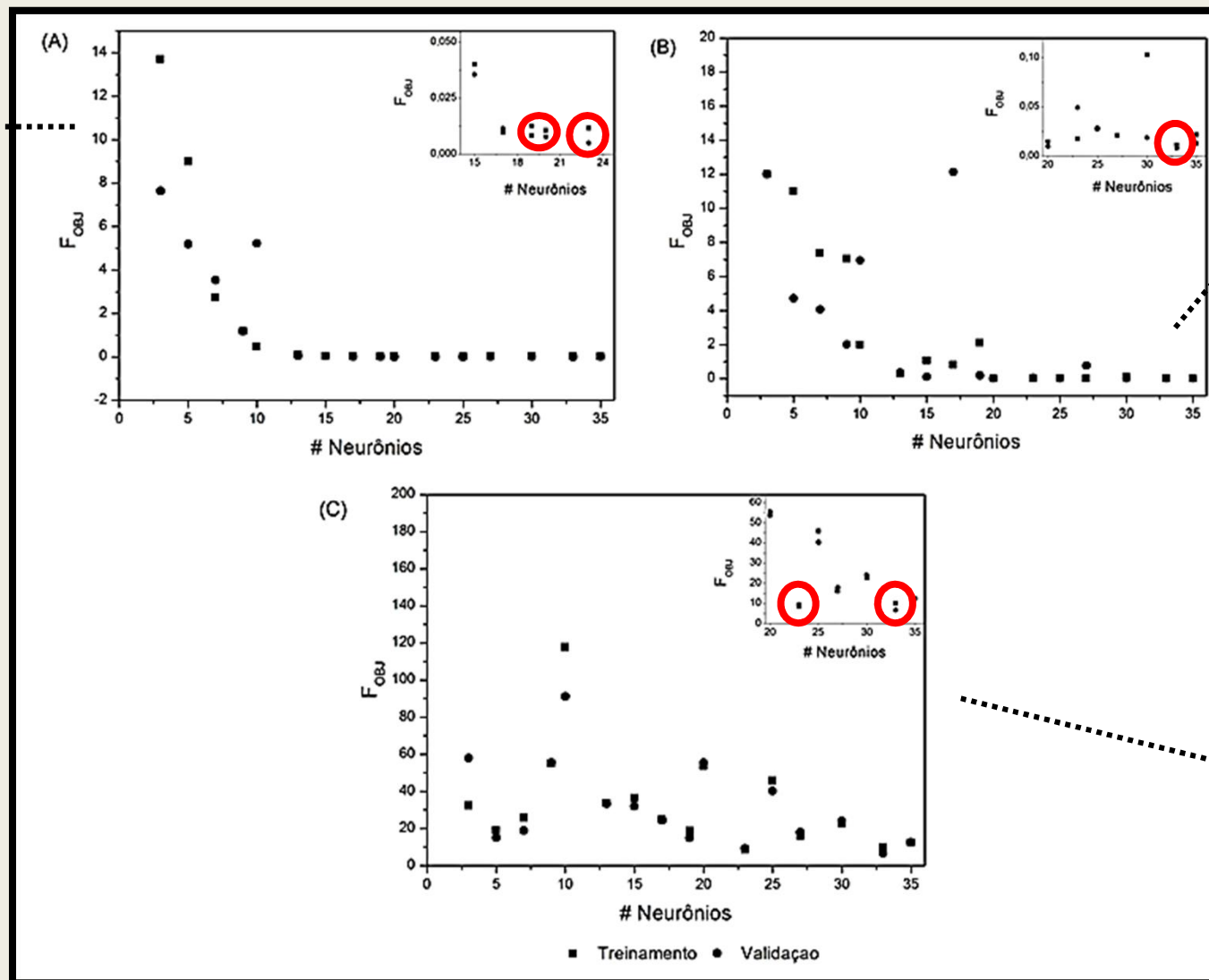
Resilient Backpropagation

# Conjunto 3: Treinamento e validação

Regulação Bayesiana

20 treinos!

Pode ser que  
o  
número de  
treinos tenha  
alguma  
influência?



Levenberg-Marquardt

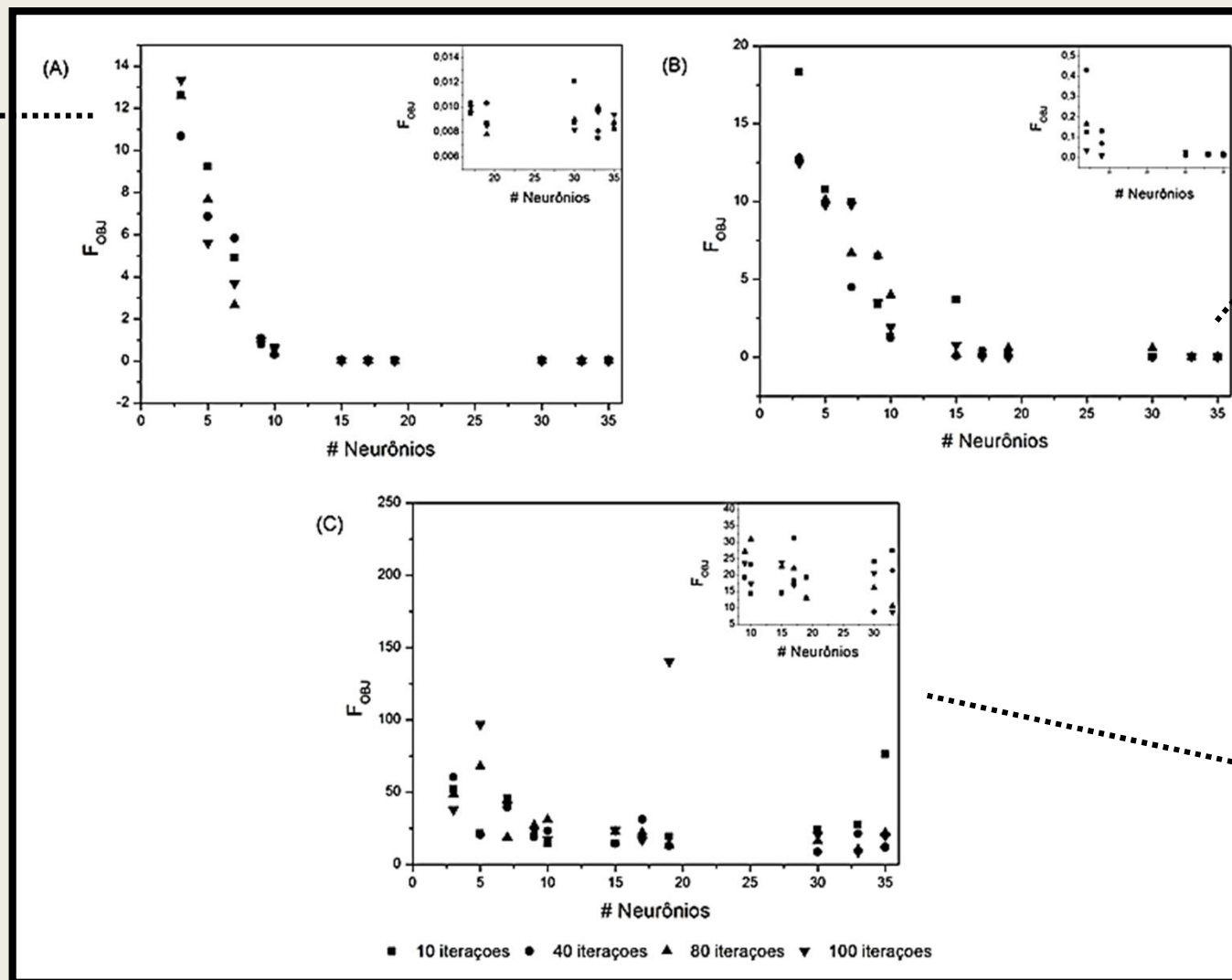
Resilient Backpropagation

# Conjunto 3: Treinamento e validação

Regulação Bayesiana

Comportamento similar para T, V e S.

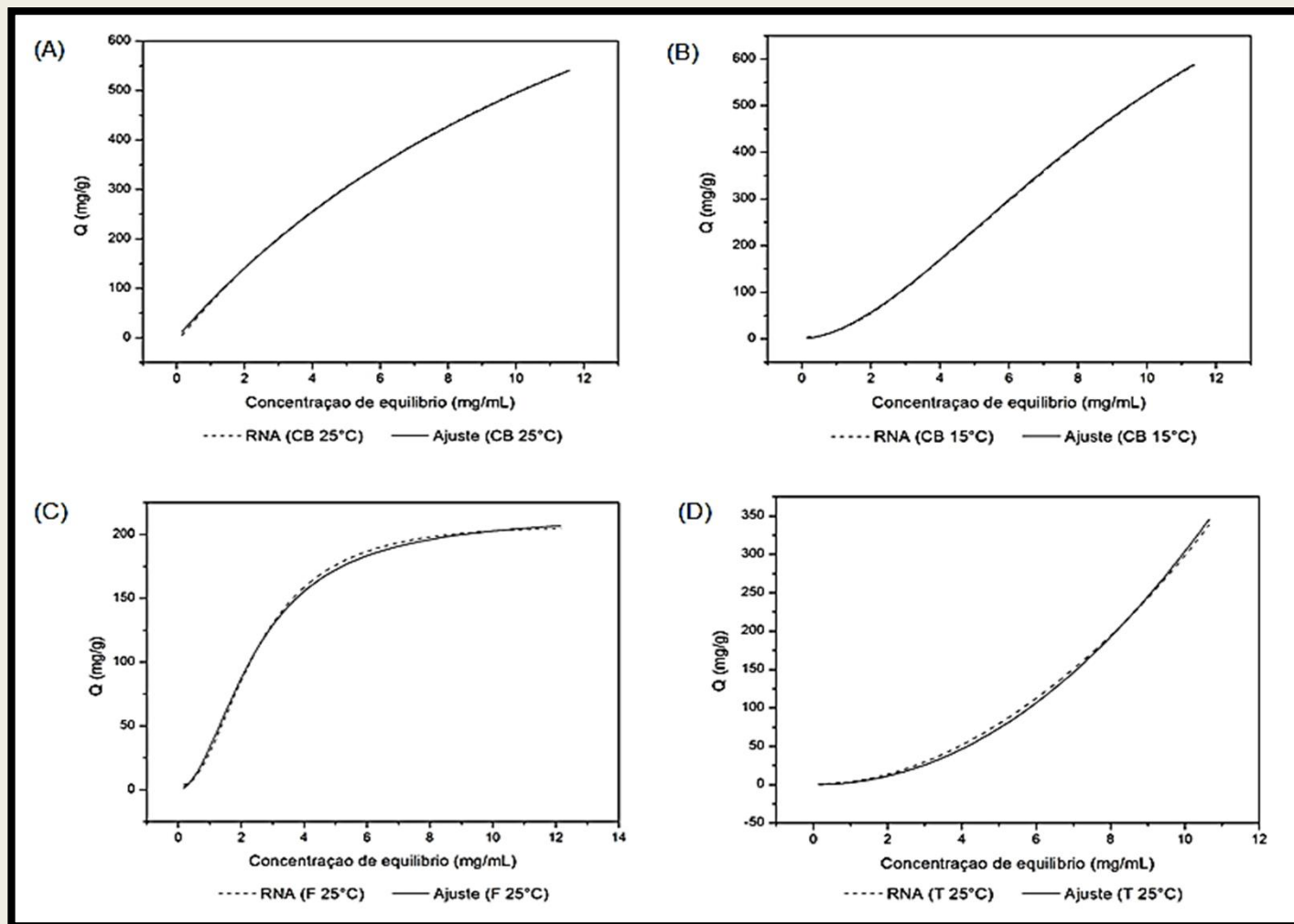
O número de treinos não influencia de maneira significativa.



Levenberg-Marquardt

Resilient Backpropagation

# Simulações com o Conjunto 3



## ***Regulação Bayesiana***

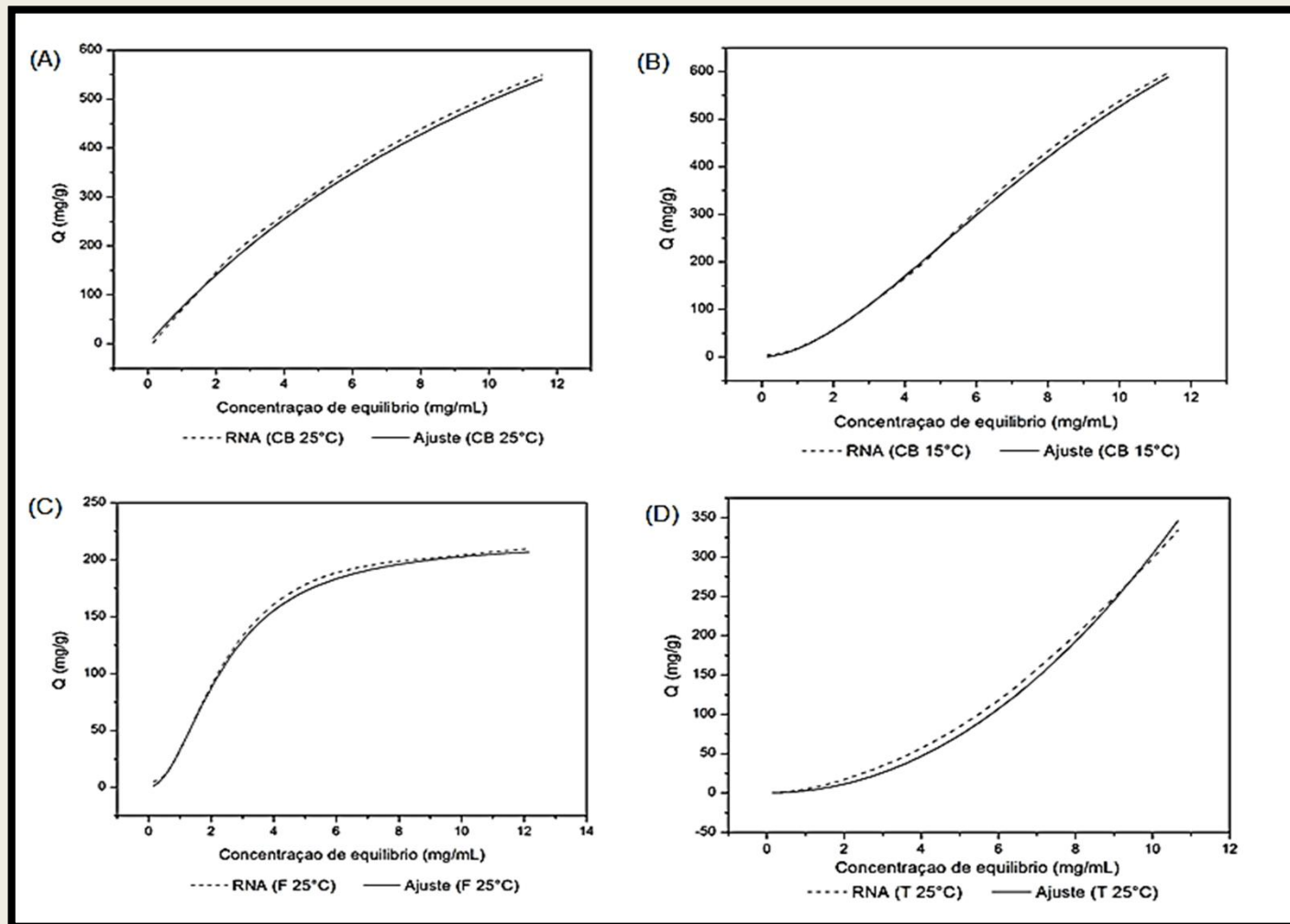
***3 neurônios na camada oculta***

***20 treinos***

***9,79% de erro***

***R<sup>2</sup> de 0,999***

# Simulações com o Conjunto 3



***Levenberg-Marquardt***

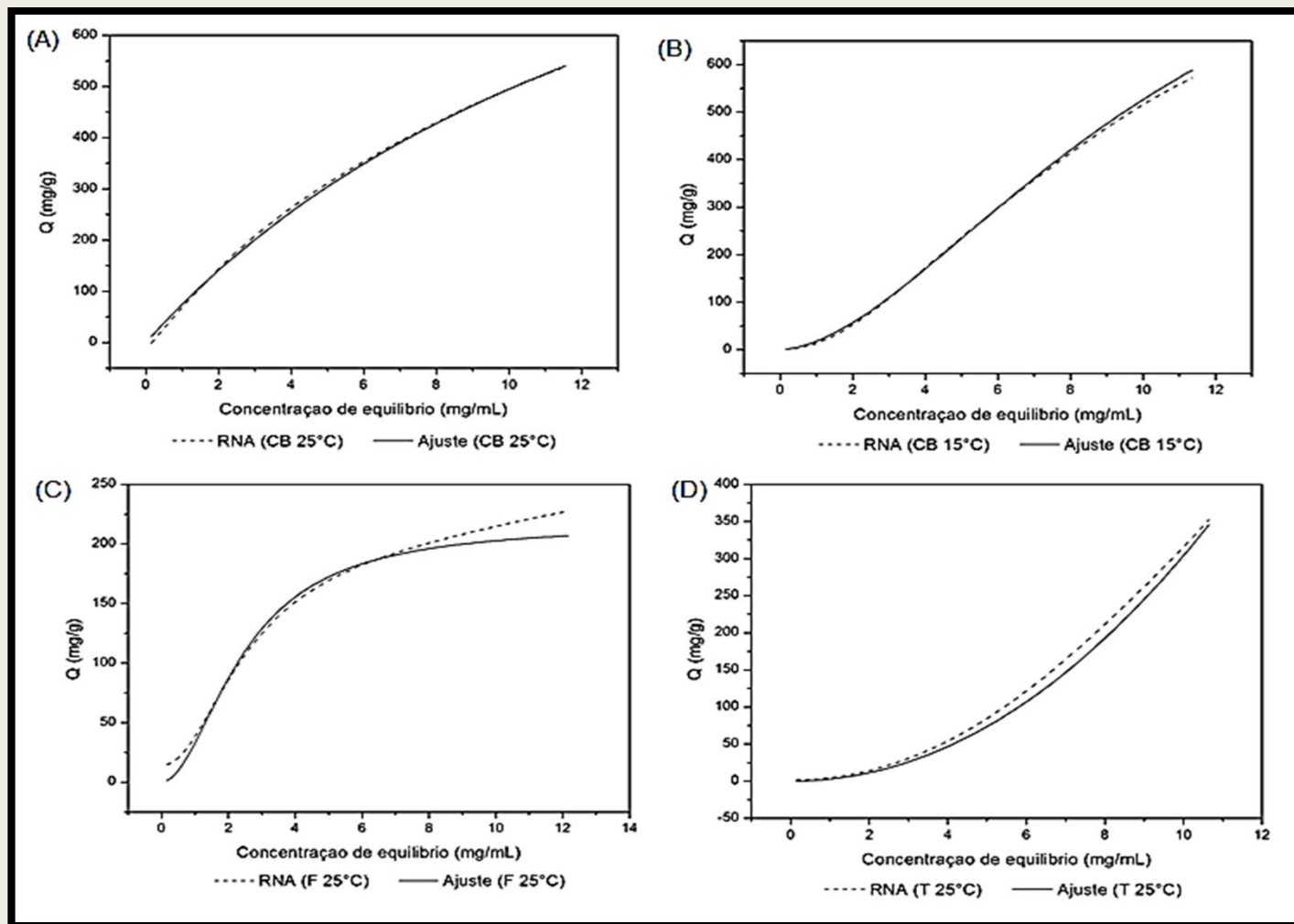
***9 neurônios na camada oculta***

***20 treinos***

***10,36% de erro***

***$R^2$  de 0,999***

# Simulações com o Conjunto 3



***Resilient  
Backpropaga***

***9 neurônios na camada  
oculta***

***40 treinos***

***21,12% de erro***

***$R^2$  de 0,998***

# Overfitting

Mas os melhores resultados para treinamento e validação não haviam sido com outros valores de #Neurônios?



Possível justificativa: **overfitting** (sobre-ajuste)

- A rede memoriza os dados de treinamento ao invés de extrair as características gerais que permitiriam a generalização dos dados.

# Comparando com outros resultados...

- Morse *et. al* (2011) → Estudou a modelagem do comportamento típico de quatro modelos de isotermas de adsorção (Langmuir, Freundlich, Langmuir-Freundlich e Toth) para uma única estrutura de rede neural de uma camada oculta.
  - *Melhores resultados para **3 neurônios** ( $T$  constante) e **4 neurônios** (efeito de  $T$  incluso) na camada oculta;*
  - *Problemas de sobre-ajuste com 6 neurônios com efeito de  $T$  incluso.*
- Schmitz e Bresolin (2014) → Estudou a predição das isotermas de adsorção de IgG humana em membranas Ni(II)-IDA-PEVA por redes neurais artificiais.
  - *Apenas **2 neurônios** na camada oculta já levavam a bons resultados na predição de isotermas a duas temperaturas diferentes (dados advindos do modelo ajustado).*



# CONCLUSÕES

# Conclusões

De 119,60 a 1447,24mg/g

- **Alta capacidade de adsorção** da IgG humana em matriz de quitosana/alginato
- O uso de **corantes** – no geral - mostrou valores de capacidade máxima de adsorção mais significantes do que os valores obtidos pelos experimentos de adsorção sem corantes, para as temperaturas estudadas;


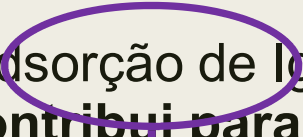
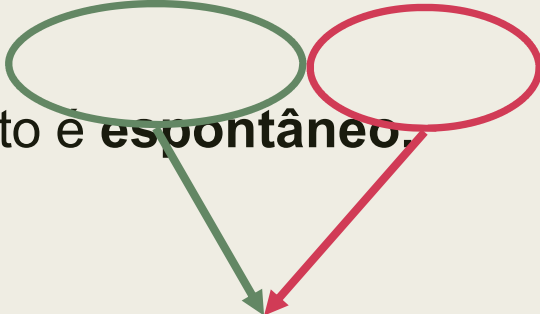
A 15°C

sem corantes: 353,68mg/g

com corantes: 1014,47mg/g

- **A influência da temperatura** na capacidade de adsorção da proteína: **não definida**
  - *Para o experimento sem corantes com o tampão MOPS e com o Cibacron Blue em tampão fosfato: o aumento da temperatura diminuiu a capacidade de adsorção;*
  - *Para o experimento sem corante e com o Reativo Verde ambos com o tampão fosfato: as maiores capacidades de adsorção foram nas temperaturas de 37°C.*

# Conclusões

- Possivelmente, há formação de multicamada: **aumento da capacidade de adsorção**  
  
 $n > 1$  nos ajustes pelo modelo de Lagmuir-F
- Processo de adsorção de IgG em matriz de quitosana/alginato é **espontâneo, favorável e contribui para a desordem do sistema**  
  
 $\Delta S > 0$   
  
 $\Delta G_{\text{máx}} < 0$

# Conclusões

## ■ Modelagem em RNA

- ***Eficiente*** na simulação e predição dos resultados
- *Melhores resultados nas simulações com um **baixo número de neurônios** na camada oculta*
- ***O número de treinos não interfere*** de maneira significativa na ***estabilização*** alcançada por cada técnica e/ou algoritmo
- *O modelo autorregressivo com entrada exógena não-linear (**NARX**) teve a **maior assiduidade das simulações** ( $R^2$  de 0,998 a 0,999) seguido a ordem: Regulação Bayesiana > Levenberg-Marquardt > Resilient Backpropagation.*

# AGRADECIMENTOS

# Agradecimentos



Processo nº 2014/23893-3

Processo nº 2018/02952-2



# CONCURSO UNIFESP

# Oportunidade de Concurso

- Área de Engenharia Química – Síntese e Simulação de Processos Químicos
- Requisitos: Graduação e Doutorado em Engenharia Química
- PROFESSOR EFETIVO: Cargo de Professor Adjunto A, nível I
- Inscrições até 16/05/2018 às 16 h
- Edital completo: <http://concurso.unifesp.br/editais/edital168-2018.htm>



# MESTRADO EQ UNIFESP

# Oportunidade para Mestrado em EQ

- A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Paulo torna público que estão abertas as inscrições para o Processo Seletivo de candidatos às vagas de Aluno Regular para o curso de **mestrado** com ingresso no 2º semestre de 2018.
- Cronograma:
  - 23/04 à 25/05/2018: *Período de inscrições;*
  - 06/06/2018: *Divulgação das inscrições deferidas;*
  - 18/06/2018: *Realização da Prova de Conhecimentos Específicos e Prova de Inglês;*
  - 18/07/2018: *Divulgação do resultado do Processo Seletivo para Aluno Regular;*
  - 23/07 à 27/08/2018: *Período de matrícula para os candidatos aprovados.*
- Mais informações em: <http://ppgeq.sites.unifesp.br/>

# Dúvidas? Perguntas?



OBRIGADO PELA  
ATENÇÃO!

**igor.bresolin@gmail.com**