

Mariana Neto Martins

**A calorimetria como ferramenta de investigação, desenvolvimento e controlo de  
qualidade em Ciências Farmacêuticas**

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2016



Mariana Neto Martins

**A calorimetria como ferramenta de investigação, desenvolvimento e controlo de  
qualidade em Ciências Farmacêuticas**

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2016

Mariana Neto Martins

**A calorimetria como ferramenta de investigação, desenvolvimento e controlo de  
qualidade em Ciências Farmacêuticas**

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa para obtenção do grau de  
Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas.

---

## Sumário

Durante décadas o rastreio e caracterização de novas moléculas fez-se essencialmente por recurso a modelos vivos numa perspectiva semi-empírica. A evolução dos conhecimentos em fisiologia e farmacologia, a descoberta e caracterização de inúmeros recetores onde atuam as substâncias ativas e a evolução da ciência em geral e em particular da biologia e bioquímica levaram, entre outras coisas, ao desenvolvimento dos modelos baseados no conceito QSAR – Quantitative Structure-Activity Relationship. Para o desenvolvimento destes modelos contribuiu a caracterização físico-química dos intervenientes, sendo a calorimetria umas das ferramentas utilizadas nessa caracterização. A titulação calorimétrica e a microcalorimetria são duas das técnicas calorimétricas que permitem estudar a termodinâmica das ligações molécula–recetor e determinar parâmetros característicos como por exemplo a constante de afinidade.

Neste trabalho, propõe-se a recolha de informação sobre as diferentes aplicações em ciências farmacêuticas destas técnicas e o estabelecimento de relações de relevância com o desenvolvimento de novas moléculas e sua caracterização farmacodinâmica. Adicionalmente, faz-se uma revisão sobre a utilização das mesmas na caracterização de biomoléculas como anticorpos, proteínas e enzimas.

**Palavras-Chave:** Calorimetria; Calorimetria de Titulação Isotérmica; Calorimetria Diferencial de Varrimento; Calorimetria de Solução; Substância Ativa; Termodinâmica.

## **Abstract**

For decades the screening and characterization of new molecules was achieved mainly by the use of live models on a semi-empirical perspective. The development of knowledge in physiology and pharmacology, the discovery and characterization of numerous receptors which play a major role in the pharmaceutical active ingredients action, as well as the evolution of science in general and in particular of biology and biochemistry led, among other things, to the development of the so-called QSAR models - Quantitative Structure-Activity relationship. For the development of these models contributed the physical and chemical characterization of the intervinients, being calorimetry one of the tools used in this characterization. The calorimetric titration and the microcalorimetry are two of the calorimetric techniques that allow to study the thermodynamics of molecule-receptor bonds and the determation of characteristic parameters such as the affinity constant.

In this work, it is proposed the information gathering on the different applications in pharmaceutical sciences of these techniques and the establishment of important relationships related to the development of new molecules and their pharmacodynamic characterization. Adicionally, a review on its use in the characterization of antibodies, proteins and enzymes is to be made.

**Key words:** Calorimetry; Isothermal Titration Calorimetry; Differential Scanning Microcalorimetry; Solution Calorimetry; drug; Thermodynamics.

## Índice

<b>I- Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>II- Desenvolvimento.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Análise Térmica .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Introdução à Termodinâmica.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Definição de calorimetria .....</b>	<b>10</b>
<b>4. Tipos de técnicas calorimétricas.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1. Calorimetria de Titulação Isotérmica.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1.1. Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1.2 Aplicações da calorimetria de titulação isotérmica.....</b>	<b>18</b>
4.1.2.i Constante de ligação/dissociação .....	18
4.1.2.ii Ligação protonação/ desprotonação .....	20
4.1.2.iii. Ligação a proteínas .....	20
4.1.2.iv Estequiometria de ligação .....	21
4.1.2.v. Interações entre proteínas .....	23
4.1.2.vi. Micelas.....	24
4.1.2.vii. Química bio-inorgânica .....	24
4.1.2.viii. Cinética Enzimática.....	25
4.1.2.ix. Identificação e otimização de compostos de chumbo no desenvolvimento de substâncias ativas .....	26
4.1.2.x. Estimativa da biodisponibilidade de substâncias ativas .....	28
4.1.2.xi. Resistência às substâncias ativas .....	28
<b>4.2. Calorimetria diferencial de Varrimento.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.1. Introdução.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.2. Microcalorimetria Diferencial de Varrimento .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2.3. Aplicações da calorimetria/microcalorimetria diferencial de varrimento. 33</b>	
4.2.3.i. Medição da capacidade calorífica absoluta .....	33
4.2.3.ii. DSC e cinética .....	34
4.2.3.iii. Estabilidade das proteínas e identificação racional das condições para a sua manutenção. ....	34

4.2.3.iv. DSC de amostras complexas .....	38
4.2.3.v. Calorimetria Diferencial de Varrimento para avaliar a estabilidade de um anticopro monoclonal (mAB) .....	39
4.2.3.vi. Impacto do congelamento e secagem de produtos farmacêuticos .....	42
4.2.3.vii. Análise de células bacterianas inteiras .....	43
4.2.3.viii. Outras Aplicações da técnica de DSC .....	43
4.2.3.ix. Bio-polímeros .....	45
<b>4.3. Calorimetria de solução .....</b>	<b>47</b>
<b>III. Conclusão.....</b>	<b>50</b>
<b>IV. Bibliografia .....</b>	<b>52</b>

## Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1 - Evolução da assinatura termodinâmica das estatinas (Freire, 2008).....	9
Figura 2 - Diagrama esquemático de um aparelho de ITC (Pierce et al., 1999).....	13
Figura 3 - Experiência de ITC (Leavitt & Freire, 2001).....	14
Figura 4 - Análise ITC da subunidade TbpA do recetor de transferrina de <i>Neisseria meningitidis</i> com ferro (A-alotransferrina) e sem ferro (B-apotransferrina) (Krell, 2008).....	15
Figura 5 - Ensaio de titulação de competição para o HIV-1 protease (Leavitt & Freire, 2001).....	17
Figura 6 - Análise ITC da subunidade TbpA do recetor de transferrina de <i>Neisseria meningitidis</i> com ferro (A-alotransferrina) e sem ferro (B-apotransferrina) (Krell, 2008).....	23
Figura 7 - Monitorização DSC de sete mAbs (Morar-Mitrica et al., 2013).....	31
Figura 8 - Análise DSC da hexoquinase A em função da quantidade de sorbitol (Krell, 2008).....	37
Figura 9 - Termograma de DSC de plasma humano (B) e respetiva desconvolução para os componentes individuais (A) (Johnson, 2013).....	38
Figura 10 - Termogramas de DSC de três amostras do vírus purificado e ativo (Krell, 2008).....	39
Figura 11 - Representação esquemática da estrutura geral de um anticorpo (Higel et al., 2016).....	40
Figura 12 - Análise DSC a mAbs falta ref (Morar-Mitrica et al., 2013).....	40
Figura 13 - Análise DSC de um polímero (Ford & Mann, 2012).....	43
Figura 14 - Representação gráfica da relação da concentração de Metronidazol e a sua Entalpia de fusão (Ford & Mann, 2012).....	45
Tabela 1 - Compilação parcial de estudos termodinâmicos de proteína-proteína e interações de ligação proteína-ligando, associações intermoleculares e suas entalpias e entropias (Weber & Salemme, 2003).....	8

## Índice de Símbolos e Abreviaturas

**QSAR** – *Quantitative structure-activity relationship*

**CBS** – Arilsulfonamidas4-carboxybenzenesulfonamide

**DNSA** – 1 -amino-naftaleno-sulfonamida5-dimetil

**K<sub>a</sub>** – Afinidade de ligação

**ITC** – Calorimetria de Titulação Isotérmica

**HIV** – Vírus da Imunodeficiência Adquirida

**ΔG** – Variação da Energia Livre de Gibbs

**ΔS** – Variação da Entropia

**ΔH** – Variação da Entalpia

**CMC** – Concentração Molecular Crítica

**ΔC<sub>p</sub>** – Variação da Capacidade Calorífica a Pressão Constante

**K<sub>d</sub>** – Constante de Associação/Dissociação

**Q** – Calor

**M** – Massa da amostra

**DSF** – Fluorometria de Varrimento Diferencial

**T<sub>m</sub>** – Temperatura de desnaturação Térmica

**β** – Taxa de aquecimento beta

**T<sub>g</sub>** – Transição Vítrea

**Redox** – Redução-Oxidação

**DSC** – Diferencial de Varrimento

**PVP** – Polivinilpirrolidons

**TCS** – Sistema regulador bacteriano

**ATP** – Trifosfato de adenosina

**Quinase TodS** – Sensor da quinase

**AAG** – Glicoproteína A 1-ácido

**HSA** – Soro humano de albumina

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**mAb** – Anticorpo monoclonal

**Tonset** – Início desnaturação-desenrolamento- *unfolding*

**S** – Substrato

**L** – Ligando

**R** – Constante dos gases perfeitos

**T** – Temperatura absoluta

**K** – Constante de equilíbrio

**PXRD** – *Powder X-Ray Diffraction*

**m/V** – massa/volume

**F<sub>c</sub>** – Parte constante de um anticorpo

**F<sub>ab</sub>** – Fragmento de ligação do anticorpo

**F<sub>e</sub>** – Fragmento cristalizável do anticorpo

**H** – Cadeia longa do anticorpo

**L** – Cadeia curta leve de um anticorpo

**V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub>** – Domínios variáveis de um anticorpo

**q<sub>i</sub>** – Quantidade de calor

**V** – Volume da célula de reação

**ΔL<sub>i</sub>** – Variação do aumento da concentração de ligando após a primeira injeção

## I- Introdução

Os efeitos do calor beneficiam e fascinam a humanidade desde a sua descoberta. Esses efeitos percebem-se quer na sua utilização doméstica, como arma de defesa, ou no estudo químico e físico das diferentes substâncias e materiais. Através das suas propriedades e da forma como interagem, tornou-se possível caracterizar a composição química dos materiais, bem como perceber melhor a sua formação e degradação (Haines, 1995).

O estudo das interações intermoleculares é indispensável quando se pretende compreender a química da vida. Essas interações biológicas são dependentes da concentração das moléculas presentes, das propriedades do meio onde estão inseridas, como a temperatura e a pressão de vapor, e do consequente perfil cinético e termodinâmico da interação. É a termodinâmica destas interações que é medida e que traduz as trocas e variações de calor, e de outras formas de energia associadas. A termodinâmica é determinada pelo tipo e número de ligações entre as espécies intervenientes na ligação. Do estado em que uma molécula se encontra livre, até se apresentar num estado complexo, inúmeros processos ocorrem. Quando esta se encontra no estado livre, interage apenas com as moléculas do solvente. Se este for aquoso, formar-se-ão pontes de hidrogénio entre a água e a superfície polar da molécula. Se por outro lado a superfície do soluto for apolar, a água organiza-se dando origem a uma rede de ligações de hidrogénio a qual difere da rede inicial (D.Giron, 2002).

No passado, os parâmetros termodinâmicos associados às interações biológicas eram quantificados utilizando métodos espectroscópicos. Com o desenvolvimento tecnológico e com o consequente aumento da sensibilidade e a descoberta de outros métodos mais fiáveis, este método caiu em desuso (Ladbury & Chowdhry, 1996), dando lugar aos métodos calorimétricos para análise térmica, os quais surgiram no século dezoito, em particular com Lavoisier e Laplace que revolucionaram o pensamento e a prática relacionada com os estudos do calor/energia (Haines, 1995).

Os métodos de análise térmica são hoje em dia usados em larga escala na investigação científica em diversas áreas. Entre elas destacam-se a química, os polímeros, a

eletrónica, a construção civil, a geologia, e as ciências farmacêuticas; quer no desenvolvimento quer no controlo de qualidade (Haines, 1995).

Com o exponencial desenvolvimento de técnicas de caracterização como sendo a calorimetria, e a constante produção de novos materiais, surgiu a necessidade de modelar as suas propriedades físicas e biológicas, e com essa finalidade surgiu o QSAR (Cherkasov et al., 2014) - um programa computacional desenvolvido com base no estudo da estrutura química, ou alguma propriedade físico-química, e a respetiva atividade biológica. Esta abordagem tem-se revelado muito útil na previsão da ação de novas moléculas através do desenvolvimento de relações matemáticas baseadas nas suas propriedades estruturais, físico-químicas e conformacionais (Martins & Ferreira, 2013).

## **II- Desenvolvimento**

### **1. Análise Térmica**

A Análise Térmica é definida como “um grupo de técnicas em que cada propriedade da amostra é monitorizada em função do tempo ou da temperatura enquanto a temperatura da amostra é programada numa atmosfera específica “ (Haines, 1995). Dito de outra forma, “caracteriza-se por um conjunto de técnicas em que é uma propriedade da amostra (física ou química) é medida, numa atmosfera específica, em função do tempo ou temperatura”. A amostra é aquecida ou arrefecida, a uma taxa fixa ou mantida a temperatura constante. As aplicações destas técnicas podem ser resumidas e inseridas em duas categorias principais: a) medição de alterações físicas relacionadas com transições de fase, pontos de fusão, mudanças nos estados cristalinos líquidos, diagramas de fases, estudo de polímeros, transições vítreas e capacidade calorífica; b) medição de variações químicas em reações como oxidações e decomposições (D.Giron, 2002).

Desde 1970 que os métodos de análise térmica são rotineiramente usados em investigação nas universidades e na indústria aplicados à área farmacêutica (Ladbury & Chowdhry, 1996). Com a introdução da automação e o desenvolvimento de *software*, a par das necessidades industriais, na última década aumentaram muito as áreas em que estes métodos podem ser bastante úteis. Como exemplo temos o estudo do comportamento de substâncias medicamentosas em diferentes sistemas ou o desenvolvimento de um sistema de libertação ideal. Durante o processamento e armazenamento de medicamentos, uma vez que estes estão sujeitos a possíveis alterações de temperatura e humidade, poderão ocorrer alterações do estado sólido, interferindo com a atividade, toxicidade e estabilidade dos compostos. Dada a exigência e rigor impostos pelo tipo de utilização deste tipo de compostos, o recurso às técnicas de análise térmica torna-se crítico para assegurar a qualidade dos medicamentos (D.Giron, 2002).

A produção de medicamentos contempla duas etapas: o fabrico da substância ativa e o fabrico da formulação que é administrada ao paciente. Esta última desempenha um

papel fundamental na ação do medicamento no organismo, e pode apresentar-se em diferentes formas farmacêuticas, diferentes sistemas de distribuição, alguns deles especiais, e diferentes vias de administração. Estas formulações, além da substância/s ativa/s, incluem na sua constituição excipientes e a tecnologiaa de fabrico própria de cada medicamento. O objectivo é que o produto final permaneça idêntico de lote para lote e ao longo da sua vida útil, exerça o seu efeito desejado no tempo desejado, e sem efeitos laterais ou adversos indesejados. Isto só é conseguido através da escolha adequada da forma física da substância ativa e dos excipientes (sal, polimorfo, cocrystal, amorfo, entre outros), do seu controlo de qualidade, e do processamento e armazenamento corretos do medicamento. Cada composto pode ser caracterizado individualmente através do seu estudo térmico, determinação do calor específico, transições vítreas, ponto de fusão, ebulição, sublimação, decomposição ou isomerização, calor/entalpia de solução, água de adsorção-dessorção, etc. As técnicas de análise térmica são portanto a base para o estudo termodinâmico dos polimorfos, solvatos, e formas amorfas que podem estar na origem de constrangimentos em todas as etapas de produção, armazenamento e transporte de matérias-primas e medicamentos (D.Giron, 2002).

## 2. Introdução à Termodinâmica

A afinidade de uma ligação é dada pelo cálculo da Energia livre de Gibbs segundo a equação de Arrhenius:  $K_a = e^{\frac{\Delta G}{RT}}$  (Leavitt & Freire, 2001).

Todos os processos físicos, químicos e biológicos são acompanhados de trocas de calor/energia. A entalpia de uma reação,  $\Delta H_r^0$ , é um parâmetro termodinâmico indispensável para quantificar o calor libertado ou absorvido durante o processo. Pode ser calculado de duas formas: diretamente usando uma técnica calorimétrica, ou indiretamente através do método de van't Hoff, descrito por:  $\Delta H_r^0 = -R \left( \frac{\ln k}{T} \right)$  onde R é a constante dos gases perfeitos, T a temperatura absoluta (a pressão constante) e K a constante de equilíbrio (L. Selva et al., 2010).

A entalpia de ligação diz respeito à força das interações do ligando com a estrutura alvo (tipicamente uma proteína) considerando também as ligações entre ambos e as moléculas do solvente (forças de van der Waals, pontes de hidrogénio, entre outras). Por outro lado, a variação da entropia engloba duas contribuições: a) mudanças da entropia decorrentes de alterações conformacionais e b) mudanças de entropia decorrentes da solvatação/dessolvatação. Após ocorrer ligação, há dessolvatação, e a água é libertada observando-se um ganho de entropia por parte do solvente ao mesmo tempo que o ligando e certos grupos na estrutura alvo perdem a liberdade conformacional, refletindo-se numa mudança negativa na entropia. É importante enfatizar que estruturas químicas diferentes traduzem comportamentos termodinâmicos diferentes (Leavitt & Freire, 2001).

As moléculas livres de água encontram-se numa forma mais organizada. Estas associações não covalentes relativas ao solvente, quando na presença de moléculas do soluto, são quebradas para incluir o soluto e depois juntam-se novamente aquando da sua libertação decorrente da ligação do soluto à estrutura alvo. Por consequência, as moléculas do soluto formam pontes de hidrogénio e ficam com a sua mobilidade limitada. Esta passagem das moléculas do estado livre ao estado ligado, pode resultar numa infinidade de arranjos possíveis que originam uma mudança na energia de Gibbs

do sistema,  $\Delta_B G^0$ . Este valor é o resultado da contribuição da entalpia ( $\Delta_B H^0$ ) e da entropia ( $\Delta_B S^0$ ), parâmetros indispensáveis no que toca à caracterização de qualquer interação. Como exemplo, aquando da remoção das moléculas de água da superfície apolar, há destruição das pontes de hidrogénio entre as moléculas do solvente, embora esta remoção requeira uma entalpia desfavorável, tem um efeito entrópico favorável, porque resulta da libertação de água de forma restrita para o solvente. A avaliação destes parâmetros difere da interação de um sistema com o outro, e cada interação biomolecular tem a sua assinatura própria (Ladbury & Chowdhry, 1996).

Os parâmetros termodinâmicos como sendo a  $T_m$  (temperatura de desnaturação, *melting temperature*) e a  $T_{onset}$  (o início da desnaturação-desenrolamento- *unfolding*) que caracterizam uma proteína podem ser determinados por técnicas calorimétricas. É uma medida usada para avaliar a estabilidade de uma proteína: quanto maior for a  $T_m$ , mais estável será a proteína. A combinação destes valores permite avaliar a estabilidade da molécula de uma forma mais completa, uma vez que proteínas com a mesma  $T_m$  podem começar a desdobrar a temperaturas diferentes, apresentando por isso estabilidades termodinâmicas diferentes (Morar-Mitrica et al., 2013).  $T_{1/2}$  revela a amplitude da transição térmica. Ou seja, relaciona-se com um maior empacotamento por parte da proteína, e por isso maior resistência ao desenrolamento. A avaliação qualitativa deste parâmetro (uma vez que quantitativamente não pode ser determinado por normalmente haver sobreposição das transições aquando do desenrolamento), fornece informações acerca da integridade da estrutura global da proteína. O  $\Delta H$  representa a entalpia do desenrolamento e resulta da variação da entalpia total a qual engloba as interações intramoleculares dentro dos domínios individuais da proteína e da formação das interações desta com a água. Se a proteína se desdobrar, o processo é endotérmico, logo os valores de  $\Delta H$  são positivos. A área total, área sob a curva de fusão, diz respeito à extensão/tamanho da molécula em estudo. Quanto maior for a área maior a estabilidade termodinâmica (Morar-Mitrica et al., 2013).

O estudo e quantificação dos parâmetros termodinâmicos anteriormente referidos, é indispensável quando queremos referir-nos a interações biológicas, pois eles revelam os efeitos estruturais da interação, permitem o conhecimento dos detalhes da estrutura e da termodinâmica da ligação. De uma forma prática, são aplicados em ciências

farmacêuticas, estudando e testando as afinidades de um composto candidato a substância ativa para determinado local de ação, tendo como maior vantagem o ganho de tempo e dinheiro com a síntese de novos compostos que de outra forma teriam de ser estudados e testados em modelos biológicos (Ladbury & Chowdhry, 1996). Nos dias de hoje, a maioria das estratégias de conceção de substâncias ativas passa pela otimização da afinidade de ligação. Mesmo quando esta é a mesma, poderão existir diferenças de molécula para molécula relativamente à entalpia e entropia quando existe resposta de um ligando a alterações na envolvente ou na proteína alvo (Leavitt & Freire, 2001).

Quando há associação de uma proteína a um ligando ocorrem mudanças nas interações intra e intermoleculares havendo naturalmente mudanças em todo o sistema, incluindo a própria proteína e o ligando, a água e outros componentes que estejam presentes nesse mesmo sistema. Estas mudanças refletem-se na entalpia e entropia da ligação que por sua vez vão ditar a energia livre compreendida na associação do ligando (Weber & Salemme, 2003).

No entanto, por vezes é difícil prever o comportamento termodinâmico da ligação do composto ou até mesmo prever as mudanças na afinidade de ligação quando existem modificações químicas que são feitas nas proteínas e nos ligandos. Uma consequência direta deste facto, reflete-se na produção de medicamentos baseados na sua estrutura. Este problema tem aumentado exponencialmente o uso de técnicas calorimétricas para quantificar com base na experiência, as contribuições entálpicas e entrópicas para a estabilização de proteínas e da afinidade de ligação do ligando (Weber & Salemme, 2003).

Table 1			
Thermodynamic binding parameters.			
System	$\Delta H$ (kcal/M)	$T\Delta S$ (kcal/M)	$\Delta T_m$ (°C)
<b>Protein-small molecule interactions</b>			
Zn- $\alpha_2$ -glycoprotein + (dansylamino)undecanoic acid	-5.2	9.7	-2
HIV-1 protease + Amprenavir	-6.9	6.3	
HIV-1 protease + Nelfinavir	2.6	15.7	
HIV-1 protease + Indinavir	2.1	14.8	
HIV-1 protease + Saquinavir	1.9	14.7	
HIV-1 protease + Ritonavir	-3.7	10.7	
HIV-1 protease (I50V) + Amprenavir	-4.2	6.1	
HIV-1 protease (V82F/I84V) + Amprenavir	-3.9	6.6	
HIV-1 protease subtype A + Ritonavir	-2.9	10.3	
HIV-1 protease subtype B + Ritonavir	-3.7	10.7	
HIV-1 protease subtype C + Ritonavir	-3.1	10.3	
<b>Farnesyl protein transferase + inhibitor</b>			
Acyl-CoA dehydrogenase + octenoyl-CoA	-7.1	3	
Carbonic anhydrase II + CBS	-11.9	-3.5	
Carbonic anhydrase II + DNSA	-4.8	4.0	
<b><i>E. cristagalli</i> lectin + galactose</b>			
<i>E. cristagalli</i> lectin + lactose	-5.3	-1.3	
<i>E. cristagalli</i> lectin + fucosylactose	-7.1	-2.4	
<i>E. cristagalli</i> lectin + galactose	-4.7	0.0	
<b>Glucose transporter GLUT 1 + ATP (pH 4.3)</b>			
Glucose transporter GLUT 1 + ATP (pH 7.4)			-12
Human H-chain ferritin + Fe <sup>2+</sup>	2.0	9.0	-0.5
<b>Protein-protein interactions</b>			
Fungal xylanase + xylanase-inhibiting protein	-11.6	-1.5	
Ubiquitin-fused complement-type repeat domains 5 and 6 + receptor-associated protein domain 1	-11.5	-3.9	
Ubiquitin-fused complement-type repeat domains 5 and 6 + receptor-associated protein domain 3	-4.9	4.1	
<b>Ferri-cytochrome c + ferri-cytochrome c peroxidase</b>			
(Ferri-cytochrome c + ferri-cytochrome c peroxidase) in trisaccharides (site 1)	-2.6	5.5	
(Ferri-cytochrome c + ferri-cytochrome c peroxidase) in trisaccharides (site 2)	-2.8	8.5	
(Ferri-cytochrome c + ferri-cytochrome c peroxidase) in trisaccharides (site 2)	-0.3	8.4	
<b>Peripheral subunit-binding domain of dihydrolipoyl acetyltransferase + pyruvate decarboxylase</b>			
Peripheral subunit-binding domain of dihydrolipoyl acetyltransferase + dihydrolipoyl dehydrogenase	-8.4	4.5	4.8
<b>Ras-binding domain of Raf + Ras</b>			
Ras-binding domain of Raf + Ras	-5.2	4.5	
Ras-binding domain of Raf + Rap	-14.5	-6.2	
Ras-binding domain of Raf + Rap	-3.7	4.8	
Ras-binding domain of Raf + Rap	-14.5	-4.7	

Tabela 1 - Compilação parcial de estudos termodinâmicos de proteína-proteína e interações de ligação proteína-ligando, associações intermoleculares e suas entalpias e entropias (Weber & Salemme, 2003).

Estudos recentes (Tabela 1) demonstram exemplos de vários ligandos, alguns deles estruturalmente semelhantes, com parâmetros termodinâmicos diferentes e que atuam nos mesmos locais de ligação da proteína. A anidrase carbónica II e as arilsulfonamidas: 4-carboxybenzenesulfonamide (CBS) e 1-amino-naftaleno-sulfonamida 5-dimetil-(DNSA) são exemplos de derivações de um farmacóforo a partir de uma substância ativa comum. A interação da anidrase carbónica II com o CBS e DNSA, tem energias livres semelhantes ( $\Delta G_{\text{CBS}}=-8.4$  kcal/mol e  $\Delta G_{\text{DNSA}}=-8.8$  kcal/mol) porém, as entalpias de ligação diferem em cerca de 2,5 vezes e a ligação do CBS (-3.5) é entropicamente mais favorável do que a do DNSA (4.0). Este é um bom exemplo que demonstra a dificuldade na previsão dos parâmetros termodinâmicos de ligação e defende a necessidade das reações serem experimentalmente estudadas por técnicas de calorimetria (Weber & Salemme, 2003).

Estudar a termodinâmica das ligações é uma ferramenta indispensável para medições do controlo de qualidade, para medir a integridade de macromoléculas biológicas depois de terem sido armazenadas em diferentes condições, para realização de testes de

congelamento/descongelamento ou ainda para analisar a funcionalidade de anticorpos (Doyle, 1997).

A afinidade de uma ligação é determinada pela energia livre de Gibbs  $\Delta G$ , correspondente à soma das variações de entalpia e entropia ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ) a afinidade extremamente elevada requer que ambos os termos contribuam favoravelmente para a ligação. De modo a aumentar a afinidade, a energia de Gibbs tem de ser mais negativa, isto é conseguido ou tornando a entalpia mais negativa também, ou tornando a entropia mais positiva ou melhor ainda por uma combinação ajustada de ambas. A entalpia de ligação, é mais difícil de otimizar do que a entropia, um facto que resultou em moléculas termodinamicamente desequilibradas que não chegam a atingir elevada afinidade. No entanto, com as tecnologias atuais, essa otimização de entalpia pode levar anos e só aparecem em produtos de segunda geração. Nesse contexto, é notória a evolução de medicamentos que cada vez apresentassem melhores afinidades de ligação à medida que se foram ajustando os parâmetros termodinâmicos por forma a contribuírem ambos favoravelmente para a ligação. Como demonstrado na figura 1, as estatinas (medicamento usado na redução do colesterol) mais recentes são mais potentes porque são entálpicamente melhor otimizadas que as mais velhas. (Freire, 2008) (Krell, 2008).

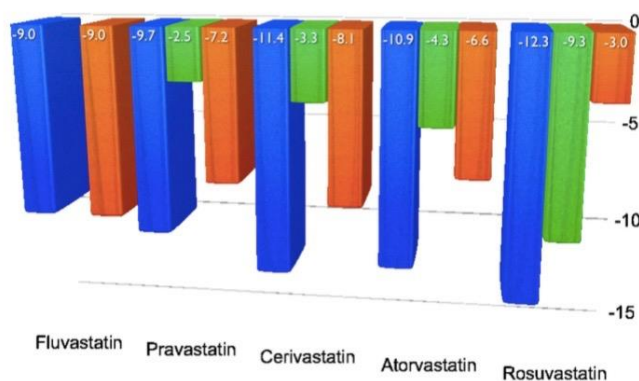


Figura 1 - Evolução da assinatura termodinâmica das estatinas (Freire, 2008).

### **3. Definição de calorimetria**

Devido à constante descoberta de novos materiais, surge a necessidade de investigar as suas propriedades, nomeadamente as físicas. A calorimetria permite medir as trocas de calor desses materiais de modo a obter informações sobre as transições de fase e a sua cinética (Shoifet et al., 2015).

A utilização de métodos calorimétricos em entidades biológicas/bioquímicas remonta aos anos 1960 e 1970, pois já nessa altura eram estudados os processos energéticos associados a processos bioquímicos, utilizando instrumentos científicos de laboratório (Johnson, 2013). Estes métodos foram primariamente desenvolvidos com fim a avaliar a termodinâmica associada à ionização de protões de ácidos e bases fracas e para estudar ligandos envolvidos nas reações de ligação a metais (L. Selva et al., 2010). A descoberta e o desenvolvimento destes processos calorimétricos foi motivada pela necessidade fundamental de medir forças termodinâmicas envolvidas nos processos relacionados com a estabilidade das proteínas, bem como a sua duplicação e ligação, uma vez que estas se relacionam com os principais processos da vida humana (Johnson, 2013).

A medição calorimétrica destaca-se por ser o único método capaz de medir e determinar diretamente parâmetros termodinâmicos como a variação da entalpia de uma reação, que fornece indicações à cerca da extensão dessa mesma reação. Apesar de a constante de ligação também poder ser determinada a partir de outras técnicas, a entalpia só poderá ser obtida indiretamente através da relação das forças de van't Hoff. Outros métodos são utilizados para a separação de dois componentes moleculares, no entanto, são métodos mais caros em termos de tempo e de materiais uma vez que requerem uma determinada percentagem de material livre e ligado para ser passível de ser determinado, e uma gama específica de concentrações dos componentes envolvidos na reação, os quais nem sempre se conseguem disponibilizar (Ladbury & Chowdhry, 1996).

Outra vantagem dos métodos calorimétricos relativamente aos convencionais pode ser constatada experimentalmente através da obtenção dos valores de entalpia para a mesma

reação, quer pelo método de van't Hoff quer por calorimetria, onde existe uma clara diferença significativa entre ambos. Não desprezando o facto de o mecanismo de ligação e a capacidade calorífica das moléculas envolvidas na reação poder variar com a temperatura, demonstra a complexidade inerente a uma reação química. Chaines, Horn *et. al.* comprovaram experimentalmente a reduzida precisão da análise de van't Hoff ao notarem que a entalpia é consideravelmente mais baixa medida pelo método van't Hoff do que a medida calorimetricamente (L. Selva et al., 2010).

Em calorímetros adiabáticos ideais, a quantidade de calor libertada ou absorvida num processo é proporcional à variação de temperatura do calorímetro. Ou seja, corresponde ao produto da diferença de temperatura e a capacidade calorífica do instrumento (L. Selva et al., 2010).

Uma enorme quantidade de calorímetros estão hoje disponíveis no mercado para diferentes usos.

## **4. Tipos de técnicas calorimétricas**

### **4.1. Calorimetria de Titulação Isotérmica**

#### **4.1.1. Introdução**

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma técnica biofísica de medição da formação e dissociação de complexos moleculares. Em todos os processos biológicos e químicos ocorrem interações moleculares, pelo que se tornou uma ferramenta indispensável em áreas que vão da biologia celular à engenharia alimentar (Ghai et al., 2012).

Muitos métodos diferentes têm vindo a ser desenvolvidos para análise molecular, mas a ITC é a única com capacidade de fornecer informação termodinâmica quantitativa numa única experiência (Ghai et al., 2012) e a única capaz de medir tanto a força de uma ligação, como quantificar as mudanças de entalpia e entropia de uma ligação, estabelecendo uma relação entre a análise computacional e a análise experimental (Leavitt & Freire, 2001). No entanto, a sua maior vantagem, relativamente a outras técnicas disponíveis para a mesma medição, prende-se com o fato de ser a mais precisa (Doyle, 1997).

O calorímetro é composto por duas células idênticas (a célula de referência e a célula da amostra), com material de elevada eficiência em relação à condução térmica, inseridas num sistema adiabático, ou seja, um sistema isolado de quaisquer trocas de calor ou matéria com o meio externo. Esse sistema é termostatizado por um banho de água circundante (Pierce et al., 1999). A célula de referência está preenchida com tampão ou água, e a célula da amostra contém a macromolécula em estudo (titulado) (L. Selva et al., 2010). Os circuitos termófilos são sensíveis às diferenças de temperatura entre as duas células e entre estas e o aparelho, funcionando este segundo o princípio de compensação de calor. Assim, quando é necessário manter a mesma temperatura entre todos os componentes, os elementos de aquecimento localizados nas duas células são

ativados bem como os do sistema (Pierce et al., 1999). Concentrações conhecidas de amostra devidamente desgaseificada (titulante) são introduzidas no injetor e depois na célula da amostra. Antes da injeção do titulante, é aplicada uma pequena e contínua quantidade de energia ao elemento de aquecimento da célula de referência, da qual se vai gerar um sinal que diz ao outro elemento de aquecimento, localizado na célula da amostra, para ser ativado. Durante a experiência, o titulante é adicionado à célula da amostra em alíquotas precisas, fazendo com que o calor seja absorvido ou libertado dependendo se a associação macromolecular é endotérmica ou exotérmica (L. Selva et al., 2010). Para uma reação exotérmica, vai ser necessário menos calor por unidade de tempo, ou seja, a temperatura na célula da amostra vai aumentar, e por consequência os elementos de aquecimento vão ser desativados para manterem a mesma temperatura entre as duas células. Numa reação endotérmica acontece o processo inverso, o circuito vai receber a mensagem de aumento de energia por parte da célula da amostra por forma a manter a temperatura em ambas as células, o calor será maior por unidade de tempo (Pierce et al., 1999). A resposta do instrumento ao aumento de calor quando a mistura de espécies que interagem por agitação ou por difusão são injetadas, é inferior a 10 segundos (Ladbury & Chowdhry, 1996).

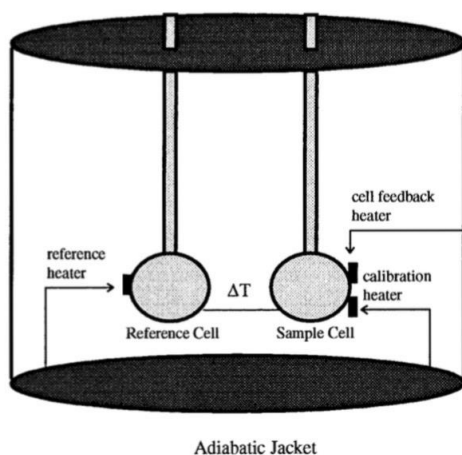


Figura 2 - Diagrama esquemático de um aparelho de ITC (Pierce et al., 1999).

Os equipamentos de ITC, como qualquer outro equipamento, precisam de ser calibrados com regularidade, sendo que esta calibração é feita através da aplicação de pulsos elétricos específicos. O desempenho do calorímetro também deverá ser testado medindo

o calor envolvido numa reação química bem conhecida. Ambos os procedimentos utilizados em conjunto garantem um bom desempenho por parte do calorímetro (L. Selva et al., 2010).

A ITC mede diretamente a energia associada a uma reação química envolvida na mistura de dois componentes (Leavitt & Freire, 2001), sendo o calor por unidade de tempo fornecido pela célula da amostra, o sinal observável numa experiência de ITC (Pierce et al., 1999). Essa reação química que decorre a cada injeção de amostra, vai libertar ou absorver calor, o qual é proporcional à fração de ligandos que se ligam, sendo a entalpia da ligação definida segundo a reação:  $q_i = v \times \Delta H \times \Delta L_i$ , onde  $q_i$  é a quantidade de calor,  $v$  é o volume da célula de reação,  $\Delta H$  a entalpia de ligação e  $\Delta L_i$  a variação do aumento da concentração do ligando após a primeira injeção (Leavitt & Freire, 2001).

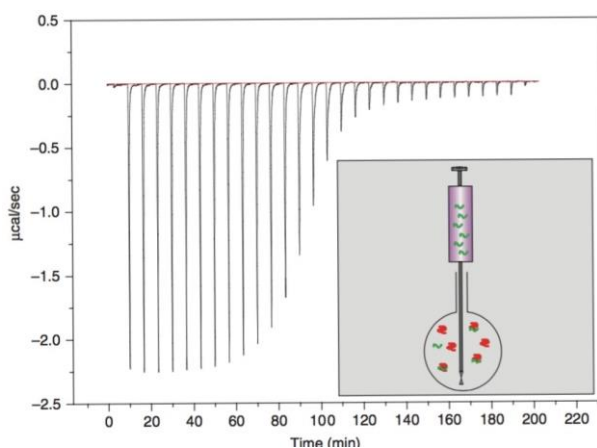


Figura 3 - Experiência de ITC (Leavitt & Freire, 2001).

Com base numa análise de ITC, a interação molecular entre dois ligantes pode ser definida pela equação termodinâmica:  $\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$ . A primeira parte da equação relaciona a mudança da energia de Gibbs ( $\Delta G$ ) com a constante de associação  $K_A$ , uma vez que a constante dos gases ( $R$ ) e a temperatura absoluta ( $T$ ) são constantes. A segunda parte da equação demonstra que é possível definir a energia livre ( $\Delta G$ ) através da soma das variações de entalpia ( $\Delta H$ ) e entropia ( $\Delta S$ ). A constante de

dissociação -  $K_D$  bem como o seu inverso -  $K_A$ , são medidas numa única experiência e permitem após conhecimento do seu valor, derivar  $\Delta G$  e  $\Delta S$ . A  $K_D$  é bastante utilizada para quantificar a afinidade entre dois ligandos (Krell, 2008).

Numa análise de ITC, a medição de calor a uma dada temperatura, permite assim determinar diretamente a constante de ligação ( $K_a$ ), a estequiometria da reação ( $n$ ), a variação de entalpia ( $\Delta H$ ), a energia livre ( $\Delta G$ ) e a variação de entropia ( $\Delta S$ ). Para além destes parâmetros, variando a temperatura da experiência, é também possível determinar a capacidade calorífica ( $\Delta C_p$ ) para a reação, obtendo-se assim um completo perfil termodinâmico à cerca da interação entre moléculas (L. Selva et al., 2010).

A análise inicia-se colocando a macromolécula na célula da amostra do calorímetro, posteriormente ocorre uma titulação entre a amostra e o ligando de modo a que ocorra a saturação da célula da amostra, a temperatura constante. Durante toda a experiência, as trocas de calor vão sendo monitorizadas como se pode ver na parte A da figura 4 (Krell, 2008).

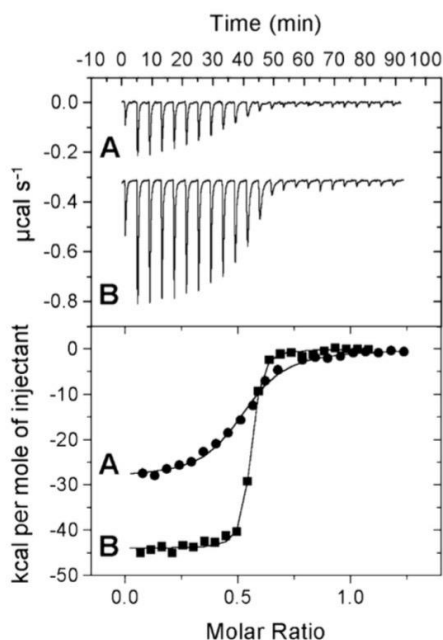


Figura 4 - Análise ITC da subunidade TbpA do recetor de transferrina de *Neisseria meningitidis* com ferro (A-alotransferrina) e sem ferro (B-apotransferrina) (Krell, 2008).

Cada pico representa as mudanças de calor causadas pela injeção de uma aliquota de Ferro na subunidade TbpA da tranferrina (Krell, 2008).

Posteriormente os dados são processados e analisados, normaliza-se a concentração de ambos os ligandos, corrigindo as diluições efetuadas e ajustando a curva recorrendo a modelos de interação, como se pode ver na parte B a figura 4. Obtêm-se dois parâmetros diretamente, a constante de ligação  $K_A$  (declive no ponto médio da saturação) e a variação de entalpia  $-\Delta H$ , que para uma ligação de elevada afinidade corresponde ao valor onde a curva intercepa o eixo das ordenadas. Os restantes valores são calculados segundo a equação termodinâmica descrita acima fornecendo informações relacionadas com as forças que impulsionam a interação (Krell, 2008).

A maior vantagem desta técnica é a elevada reprodutibilidade obtida entre análises. O erro associado a uma constante de ligação determinada por ITC é de 5% o que coloca esta técnica num lugar de destaque para procedimentos de controlo de qualidade de produtos farmacêuticos. Porém, quando a amostra tem de ser carregada manualmente, não é indicada para utilização de alto rendimento como em biotecnologia (Krell, 2008).

Com o aparecimento da ITC automática é possível utilizar a microcalorimetria de forma mais eficiente permitindo a realização de cem análises de ITC por semana de forma automática e em quase todos os tipos solventes (Krell, 2008).

A principal desvantagem desta técnica é o facto de precisar de quantidades grandes de amostra, a qual na investigação biotecnológica não representa uma ameaça pois as produções são em grande escala. (Krell, 2008).

No passado, uma das maiores limitações da calorimetria de titulação isotérmica prendia-se com o facto de não existirem protocolos relativos à caracterização da termodinâmica das reações envolvidas nas ligações que tinham elevadas constantes de associação. Esta limitação era essencialmente notada na concepção de novas substâncias ativas que continham chumbo na sua constituição, uma vez que as afinidades eram na ordem dos micromolar, ou ainda mais elevadas. Muitas vezes o processo de otimização acabava

por exceder o limite superior de afinidade detetado pela análise calorimétrica (Leavitt & Freire, 2001).

Em 1989, Wiseman *et al.* provou que o produto da concentração proteica na célula do calorímetro pela constante de ligação, deveria ser mais baixo que 1000 para que a reação pudesse ser medida diretamente pelo ITC. Em termos práticos a partir de um certo calor as titulações perdiam a sua curvatura característica e tornavam-se indistinguíveis entre si não sendo possível determinar a constante de ligação. Recentemente a solução para este problema foi encontrada utilizando um ligando de alta afinidade que é titulado na proteína que é pré-ligado a um inibidor mais fraco. Esta solução requer três titulações: A primeira é feita com um inibidor fraco por forma a caracterizar a ligação termodinâmica; a segunda com o inibidor de afinidade elevada em estudo, com a finalidade de medir diretamente a ligação entálpica; a terceira é uma titulação de substituição do inibidor fraco pelo inibidor forte em estudo (Leavitt & Freire, 2001).

Velazquez-Campoy *et al.* analisou os inibidores da protease HIV-1. Usaram um inibidor de baixa afinidade com um sinal oposto ao de alta afinidade com o propósito de amplificar o sinal do calorímetro na titulação de substituição. O resultado está representado na figura 5 (Leavitt & Freire, 2001).

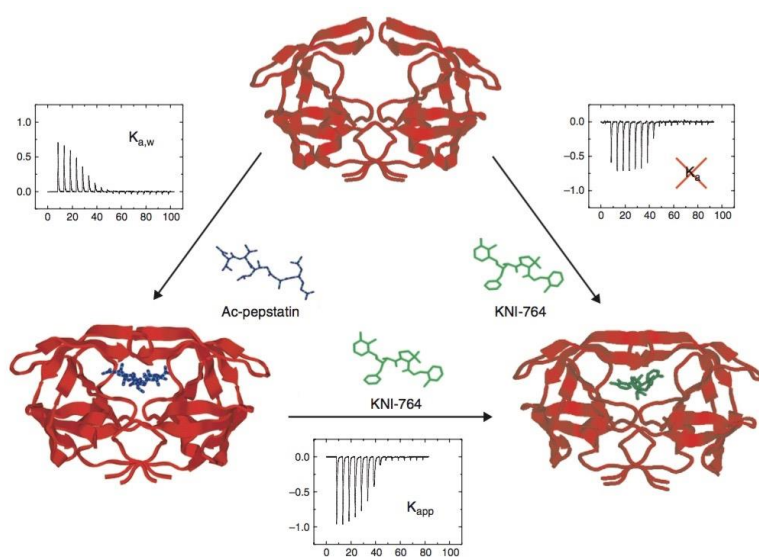


Figura 5 - Ensaio de titulação de competição para o HIV-1 protease (Leavitt & Freire, 2001).

A afinidade de ligação ( $K_a$ ) do inibidor KNI-764 ultrapassa o limite de determinação calorimétrica direta, pelo que a titulação de substituição é realizada na presença de acetil-pepstatina, um inibidor fraco com uma entalpia e ligação de sinal oposto em relação ao inibidor em estudo. Este produz um sinal maior na titulação de substituição devido à substituição de um inibidor endotérmico por um exotérmico. Na presença do inibidor fraco, a constante de ligação aparente para KNI-764,  $K_{app}$ , cai dentro do intervalo necessário para a determinação de ITC, e pode ser reduzido para o nível desejado, aumentando a concentração do inibidor fraco. A partir destas experiências, determinou-se uma constante de ligação para KNI-764 de  $3,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  a pH 5,0 (Leavitt & Freire, 2001).

#### **4.1.2 Aplicações da calorimetria de titulação isotérmica**

##### **4.1.2.i Constante de ligação/dissociação**

Um dos principais usos da ITC relaciona-se com as afinidades de ligação (Doyle, 1997). A ITC tem sido utilizada no desenvolvimento de substâncias ativas pois as afinidades de ligação do substância ativa ao alvo são caracterizadas a partir dos parâmetros termodinâmicos determinados numa experiência de ITC (L. Selva et al., 2010). Este método mede diretamente afinidades na ordem do nanomolar. As limitações nesta área relacionam-se com o limite de deteção do aparelho de ITC que não permite medir afinidades subnanomolares a concentrações micromolares pois não consegue detetar calores de ligação tão baixos. Fracas afinidades podem ser medidas por esta técnica mas requerem concentrações mais altas do reagentes. As afinidades de macromoléculas biológicas mais pequenas medidas por ITC são na ordem dos milimolar (Doyle, 1997).

Para haver ligação entre o substância ativa e o alvo, o  $\Delta G$  é negativo. Nesse sentido, o  $\Delta S$  é tendencialmente positivo (maior estabilidade do complexo) e  $\Delta H$  pode ser positivo ou negativo relacionando-se o  $\Delta G$  diretamente com a afinidade da ligação. A afinidade é elevada se a entalpia e/ou entropia contribuírem favoravelmente. A entalpia favorável está relacionada com interações de Van der Waals e a formação de ligações de hidrogénio e a entalpia desfavorável com a dessolvatação de grupos polares. Para uma

entalpia favorável a substância ativa tem de interagir com o alvo, e superar a entalpia desfavorável que resultou da dessolvatação, como tal, o valor de  $\Delta H$  representa a intensidade relativa da interação substância ativa-alvo num determinado solvente (L. Selva et al., 2010).

Ruben et al. demonstraram que a ITC é uma ferramenta imprescindível na validação dos modelos QSAR. Identificaram a posição mais adequada para os doadores de ligações de hidrogénio ou recetores da substância ativa com o seu alvo. Eles estudaram o inibidor plasmepsin II usado no tratamento da malária. Foi colocado um doador de ligação de hidrogénio em diferentes posições de um anel de fenilo, e a variação de entalpia resultante dessa mudança foi medida por ITC. Através das diferentes mudanças de posição obtiveram-se entalpias favoráveis e desfavoráveis, concluindo assim qual o melhor grupo funcional e em que posição (L. Selva et al., 2010).

Embora para uma afinidade extremamente elevada as interações entálpicas contribuam imenso, a otimização da entalpia de ligação tem sido mais difícil que a otimização da entropia pois a entalpia de dessolvatação de grupos polares é muito grande e desfavorável (L. Selva et al., 2010).

A termodinâmica de ligação de sete inibidores clínicos da protease foi estudada. Quatro desses inibidores apresentaram uma forte variação da entropia favorável (positiva) indicando que as interações inibidor/proteína não são suficientemente fortes para superar a entalpia desfavorável relacionada com a dessolvatação do grupo proteico e inibidor e com a alteração da conformação da protease após a ligação. A entropia favorável contribuiu para a energia de Gibbs em todos os casos. Dois fatores contribuem para a variação da entropia extremamente favorável: a) a geração da entropia conformacional desfavorável e b) uma grande alteração da entropia favorável após a libertação de moléculas de água associadas à superfície hidrofóbica depois de estabelecida a ligação. Conclui-se com este estudo que a otimização entrópica é conseguida através do aumento da hidrofobicidade da substância ativa e através da introdução de restrições de conformação (L. Selva et al., 2010).

#### 4.1.2.ii Ligação protonação/ desprotonação

Muitas reações de ligação são precedidas de absorção ou libertação de protões por parte da proteína ou do ligando, nestes casos a reação é dependente do pH e a entalpia de ligação é dependente da entalpia de ionização do tampão. Para determinação dos parâmetros energéticos associados a esta reação, teria de se individualizar as contribuições relacionadas com o tampão, sendo a técnica de ITC o melhor método para esta avaliação. O primeiro passo nesta análise é a determinação da presença de protonação/desprotonação, através de titulações de ITC em tampões com diferentes entalpias de ionização,  $\Delta H_{ion}$ . A entalpia medida,  $\Delta H_{app}$  é a soma de dois termos: a entalpia da reação,  $\Delta H_{bind}$ , independente do tampão usado (mas dependente do pH) e o outro termo representa a contribuição da ionização do protão do tampão,  $\Delta H_{ion}$  que é multiplicado pelo nH que representa o número de protões que são absorvidos (ou libertados se for um valor negativo) pelo complexo proteína-inibidor na ligação. Esta relação traduz-se pela equação:  $\Delta H_{app} = \Delta H_{bind} + n_H \Delta H_{ion}$ . Se nH for diferente de zero, conclui-se que houve protonação/desprotonação (Leavitt & Freire, 2001).

Sempre que numa ligação há protonação, o  $\Delta H$  obtido numa única experiência de ITC inclui o calor que advém da ionização pelo que é necessário que se efetuem medições separadas a pH constante mas em diferentes tampões com entalpias de ionização a fim de se determinar o  $\Delta H$  da ligação intrínseca. Com esta análise, também se determina o número de protões intervenientes na ligação. Tudo isto é vantajoso pois através da caracterização das reações de protonação medem-se as afinidades de ligações fortes e também é possível compreender-se com detalhe molecular o mecanismo de ligação (Doyle, 1997).

#### 4.1.2.iii. Ligação a proteínas

Os processos fisiológicos que ocorrem dentro da célula são regulados por proteínas e os seus conjuntos macromoleculares, cujas interações se relacionam diretamente com a manutenção da homeostase funcional celular. É neste campo que se torna tão importante

o uso da ITC no estudo das afinidades e dos mecanismos de interações biomoleculares (Ghai et al., 2012).

Como referido anteriormente, a ITC tem a capacidade para determinar as contribuições termodinâmicas numa ligação, podendo estas estar relacionadas diretamente com os domínios proteicos não expostos à ligação. As proteínas utilizam biomembranas como auxiliares na formação de complexos de sinalização, com recurso a recetores transmembranares/ citosólicos e como veículos de transporte para o transporte de moléculas carregadas. A natureza hidrofóbica das membranas e a propensão dos seus lipídios constituintes para a hidrolisar, tornam-as difíceis de manipular em ambiente *in vitro*. Até há pouco tempo o método utilizado para estudar as interações proteína-membrana era usando moléculas marcadas com fluoróforos (Ghai et al., 2012).

As inúmeras funções biológicas que vão desde o desenvolvimento e crescimento da células, até à sinalização de doenças; levam ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas de combate a vírus ou bactérias, que são hoje possíveis de estudar melhor graças às experiências realizadas com ITC (Leavitt & Freire, 2001).

#### **4.1.2.iv Estequiometria de ligação**

Graças à automatização dos calorímetros, a qual se traduz na injeção de quantidades exactas e reprodutíveis de tiulado, é hoje possível determinar a estequeometria de uma reação com elevado rigor. Este também é assegurado pelo facto de não havere processos paralelos de modificação ou imobilização química uma vez que os reagentes em estudo apresentam-se nas suas formas nativas (Doyle, 1997).

Para além da enorme vantagem inerente à caracterização dos mecanismos de ligação das macromoléculas biológicas possíveis através da determinação da estequeometria de ligação, a ITC desempenha ainda uma papel fulcral no controlo de qualidade. Este refere-se à análise da atividade de ligação para diferentes lotes de proteínas produzidas através de diferentes linhas celulares, ou nos casos em que a sua estabilidade foi comprometida pelo congelamento/descongelamento de sensaio (Doyle, 1997).

Através de uma experiência de ITC pode obter-se a percentagem de macromolécula ativa numa determinada amostra de maneira a verificar se uma proteína, ao ser purificada, ficou inativa ou desnaturada (Krell, 2008).

Uma aplicação demonstrativa da utilidade desta técnica foi estudada no desenvolvimento de uma vacina contra a meningite causada por *N. meningitidis*. As sub-unidades do recetor da transferrina TbpA e TbpB são os candidatos à vacina, e a sua purificação envolve a extração da membrana com recurso a detergentes. A titulação da subunidade TbpA purificada com holo e apo-transferrina humana é demonstrado na figura 6. A estequiometria que representa a razão de transferrina-TbpA está representada no gráfico pelo ponto de inflexão de ambas as curvas sigmóides que pode ser lida a partir do eixo das abcissas inferior. Nos dois casos o ponto de inflexão é uma razão molar de perto de 0,5. Como a molécula de transferrina se liga a um dímero de TbpA, a amostra analisada de TbpA corresponde a uma preparação contendo apenas TbpA ativa tal como medido pela sua capacidade de se ligar à transferrina. Se a saturação tive-se ocorrido em menor proporção como 0,3, a quantidade de proteína ativa teria sido apenas 60%. Podemos também concluir da análise da figura 6 que o declive acentuado observado para a apo-transferrina indica uma maior afinidade de ligação, enquanto que o declive menos íngreme para a ligação da holo-transferrina, indica uma ligação de baixa afinidade (Krell, 2008).

Concluimos assim que através da medição da fração de proteína ativa presente numa amostra, podemos identificar individualmente parâmetros imprescindíveis ao controlo de produtos farmacêuticos, como sendo parâmetros de ligação e a fração de produto ativo caracterizando assim de forma muito clara o produto analisado (Krell, 2008).

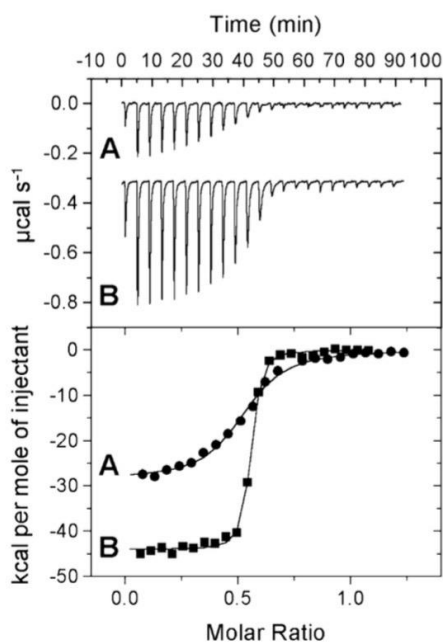


Figura 6 - Análise ITC da subunidade TbpA do recetor de transferrina de *Neisseria meningitidis* com ferro (A-alotransferrina) e sem ferro (B-apotransferrina) (Krell, 2008)

#### 4.1.2.v. Interações entre proteínas

A ITC tem sido exaustivamente utilizada aquando do estudo de ligações envolvendo proteínas, no entanto, também se torna bastante útil no estudo de interações proteína-proteína (Leavitt & Freire, 2001). A interação de proteínas com o DNA, anticorpo-antigénio, hormona-recetor, etc., ilustram a diversidade e complexidade da importância deste estudo em processos biológicos como sejam a resposta imunitária, a expressão genética, entre outras (Pierce et al., 1999).

Esta técnica quantifica diretamente o equilíbrio da ligação através da determinação do calor envolvido na ligação das duas proteínas (Pierce et al., 1999). Estas interações em alguns casos são representadas por péptidos de sequências pequenas e polipeptídeos. No entanto, será errado afirmar que as propriedades termodinâmicas dos péptidos são equivalentes às da proteína no seu todo (Ladbury & Chowdhry, 1996).

#### 4.1.2.vi. Micelas

O processo de micelização é hoje em dia um fenómeno amplamente estudado, e dependente da temperatura, da estrutura da molécula do tensoativo, da concentração, e do dispersante. A ITC tornou-se num método de extrema importância na determinação da concentração micelar crítica (CMC) e dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na formação micelar ( $\Delta H_{\text{micelle}}$ ,  $\Delta G_{\text{micelle}}$  e  $\Delta C_{\text{p micelle}}$ ). As experiências envolvem a diluição de tensoativos a partir de uma concentração superior à da CMC, em água, tampões específicos ou co-solventes medindo-se o calor libertado (Ghai et al., 2012).

Obtem-se uma curva semelhante à curva sigmoideal típica de uma experiência de ITC, que pode ser dividida em várias fases. A primeira é derivada a partir do calor de diluição do monómero a partir de uma seringa que injeta os tensoativos para dentro da célula, a segunda fase fornece a entalpia de formação de micelas, e a terceira fase e final dá-nos o calor de diluição das próprias micelas. Por fim traça-se a primeira derivada do calor libertado no que diz respeito à concentração do agente tensoativo e a CMC é determinada a partir do máximo da curva (Ghai et al., 2012).

#### 4.1.2.vii. Química bio-inorgânica

Esta é outra área onde a ITC já é considerada uma técnica de rotina, usada para medir a ligação de íons metálicos de proteínas e outras biomoléculas. É medida a contribuição para a entalpia de ligação observando equilíbrios concorrentes como precipitação, mudanças nas reações de solvatação, redox, etc. A afinidade de ligação/dissociação  $K_d$  e a entalpia de ligação  $\Delta H$  são medidos por ITC, não esquecendo de referir que são valores dependentes das condições específicas utilizadas na experiência, como o tampão ou as concentrações iniciais. Significa isto que, quando os resultados obtidos são comparados com os obtidos por outros métodos, as mesmas condições da experiência têm de ser asseguradas (Ghai et al., 2012).

#### **4.1.2.viii. Cinética Enzimática**

A ITC tem sido bastante utilizada na caracterização de várias reações enzimáticas, apresentando vantagens relativamente a outros métodos como sendo a falta de necessidade de uso de cromóforos, fluoróforos, ou ligandos com radioisótopos usados na grande maioria dos outros métodos para caracterização enzimática. A ITC pode detetar uma conversão enzimática sem a interferência de terceiros, o que seria impossível através dos ensaios calorimétricos habituais (Ghai et al., 2012).

Num estudo recente realizou-se a transesterificação do óleo de colza com metanol e com etanol e a reação foi catalisada por uma lipase imobilizada. Num análise sem recorrer ao uso de ITC, o material, por ser heterogéneo (óleo de origem natural), seria mais difícil de estudar de forma tradicional, pois teria de se realizar uma cromatografia líquida de alto desempenho, para obtenção de uma amostra mais simples (apenas um tipo de ácido gordo). Com uma análise de ITC a reação pode estudar-se no conjunto. (Ghai et al., 2012).

Outro exemplo de aplicação diz respeito à sacarificação enzimática da biomassa. Um dos maiores avanços nesta área relaciona-se com a baixa entalpia molar da hidrólise por ter uma cinética de reação lenta. Utilizando a ITC conseguiu-se amplificar o sinal do calor por mais de 130 vezes na atividade da celobio-hidrolase usando enzimas bastante rápidas como a oxidase de glicose e catalisadores que catalisam reações utilizando o produto da hidrólise da celobiohidrolase (Ghai et al., 2012).

Será então de referir a sua utilidade ao nível da enzimologia industrial como referido acima, para além de uma grande diversidade de enzimas que têm sido estudadas através desta técnica (Ghai et al., 2012).

#### **4.1.2.ix. Identificação e otimização de compostos de chumbo no desenvolvimento de substâncias ativas**

O que determina a estrutura de um inibidor tem impacto sobre a entropia e entalpia de ligação a uma macromolécula. Ou seja, alterações estruturais poderão ser feitas num inibidor por forma a otimizar determinados parâmetros da ligação (Krell, 2008).

Quando falamos em entropia, referimo-nos maioritariamente à entropia de solvatação, ou seja, a acomodação de grupos não polares a partir do solvente, e à entropia conformacional, perda dos graus de liberdade após uma ligação. Alterando a estrutura de um inibidor, tornando-o mais hidrofóbico, aumenta-se a entropia de solvatação. Esta alteração é importante quando queremos, por exemplo, tornar uma substância ativa solúvel em condições fisiológicas (Krell, 2008).

As contribuições da entalpia refletem a força das interações inibitórias em relação ao solvente da proteína. A otimização desta contribuição envolve o ajuste das distâncias de ligação e ângulos de ligação inibidor-proteína para conseguir melhor complementaridade “chave-fechadura”. Sendo as variações da energia livre de Gibbs a soma da entalpia e entropia, uma infinidade de combinações de diferentes valores de cada uma contribuem para um determinado valor de  $\Delta G$ . No caso dos inibidores de proteases de HIV e de *Plasmodium falciparum* demonstrou-se que a baixa afinidade de ligação do inibidor pode ser conseguida com uma grande variedade de combinações de entalpia/entropia incluindo entalpias de valor positivo e entropias de valor negativo. Quando a afinidade aumenta, a entalpia/entropia diminuem. Contudo, demonstrou-se que as ligações de elevada afinidade são na sua maioria conseguidas quando entalpia e entropia são favoráveis (Krell, 2008).

O uso da técnica de ITC na caracterização de inibidores é demonstrada através do sistema regulador de dois componentes (TCS) que se relaciona com a virulência de um agente patogénico e que é, portanto, relevante no desenvolvimento de inibidores. Os compostos identificados demonstraram ter efeitos secundários devido ao facto de grande parte deles interferir com o domínio de ligação ao nucleótido, resultando num

aumento do risco de interação destes com outras proteínas que também utilizam ATP (Krell, 2008).

Estudos realizados à expressão génica *in vivo*, identificaram pequenas moléculas de sinalização que ativam o TCS. Estas moléculas através da análise ITC demonstraram que quando ligadas com afinidade sub-micromolar para o sensor da quinase -TodS estimulam a atividade da própria quinase. Ao contrário do esperado, estudos de ITC revelaram que um determinado número destas moléculas que não ativam o sistema *in vivo*, são igualmente ligadas com elevada afinidade para o TodS no mesmo local de ligação das moléculas de sinalização que activam o TCS. Estes compostos são antagonistas e, estudos adicionais revelaram que eles inibem a sobre-regulação da atividade da quinase. Conclui-se assim, que a avaliação da actividade inibitória de antagonistas, pode ser uma excelente alternativa ao desenvolvimento de inibidores específicos de TCS (Krell, 2008).

Para uma aplicação clínica de uma substância ativa, é necessária a otimização de compostos de chumbo com afinidades na ordem dos nanomolar ou sub-nanomolar, revelando-se um passo difícil no seu desenvolvimento. Como explicado anteriormente, elevadas afinidades de ligação só são conseguidas quando a variação de entropia e de entalpia são favoráveis. Este facto é fulcral para a otimização desses compostos, como demonstrado num estudo realizada pela Pfizer utilizando inibidores da renina (Sarver et al., 2007). Através do rastreio rápido, um composto de chumbo foi identificado como tendo um  $K_D$  de  $3.57\mu\text{M}$  para o alvo renina. As variações de entalpia foram favoráveis ( $\Delta H = -9.27 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) mas de alguma forma anuladas por variações de entropia desfavoráveis ( $T\Delta S = -2.00 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). A fim de otimizar a entropia, fez-se a conceção de um composto que tinha uma entropia favorável ( $T\Delta S = 0.43 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) e a entalpia praticamente inalterada, resultando numa afinidade do inibidor otimizado de 45 vezes maior quando comparado com o composto de chumbo inicial. Conclui-se então, que a ITC apresenta utilidade e vantagens na separação do  $\Delta G$  em  $\Delta H$  e  $\Delta S$  combinando o conhecimento adquirido com vários sistemas diferentes que mostraram que tanto  $\Delta H$  como  $\Delta S$  têm de ser favoráveis para se obter uma elevada afinidade de ligação e assim fornecer bases para uma otimização mais racional dos compostos de chumbo (Krell, 2008).

#### **4.1.2.x. Estimativa da biodisponibilidade de substâncias ativas**

A eficiência clínica de uma substância ativa é determinada por vários fatores como a afinidade para o seu alvo e a capacidade de se ligarem não especificamente e reversivelmente a proteínas do soro, o que resulta numa diminuição da concentração de substância ativa livre, ou seja, uma diminuição da biodisponibilidade (Krell, 2008).

Estudou-se a biodisponibilidade de inibidores de protease de HIV através de titulações microcalorimétricas de proteínas de soro humano como sendo a albumina (HSA) e  $\alpha$ 1-ácido glicoproteína (AAG). Estas duas proteínas são conhecidas por se ligarem a substâncias ativas de forma não específica, diminuindo assim as suas concentrações livres. Simularam-se as condições *in vivo* e testaram-se diferentes inibidores ligados a AAG com afinidades entre 0.77 e 27 mM e a concentração de substância ativa necessário para inibir as proteases foi estudada. Para conseguir 95% de inibição, teve de se elevar quase doze vezes mais a concentração do inibidor em comparação com os cálculos efetuados na ausência de proteínas no soro. Um outro inibidor obteve uma melhor proporção que tem de ser aumentada apenas por um fator de 2, 3 vezes para se conseguir a inibição de proteases. Com esta técnica concluiu-se que a afinidade do substância ativa pode ser facilmente medida por ITC, representando uma técnica imprescindível para o desenvolvimento de substâncias ativas (Krell, 2008).

#### **4.1.2.xi. Resistência às substâncias ativas**

Apesar do desenvolvimento de inibidores da protease do HIV, a resistência aos medicamentos é um enorme entrave às terapias antirretrovirais. Esta resistência é devida a mutações na protease do HIV que contribuem para a diminuição da afinidade dos inibidores para o seu alvo (Krell, 2008).

O grupo de E. Freire (Ohtaka & Freire, 2005) estudou a termodinâmica da ligação de inibidores de maneira a compreender que propriedades permitem a alguns inibidores lidar melhor com mutações que outros. Para isso procedeu à determinação individual da entropia e entalpia de ligação através de ITC. Utilizou os inibidores amprenavir e TMC-

126 para a protease nativa, bem como os mutantes I50V e V82F/I84V. Todas as mutações se localizam no sítio ativo da protease. As mutações I50V e V82F / I84V baixam a afinidade de ligação do amprenavir por um fator de 147 vezes e 104 vezes, respetivamente. Embora ambos os mutantes apresentem uma diminuição da entalpia de ligação por perda de interação inibidor-proteína, a entropia para a ligação TMC-I26 foi mais favorável em comparação com a proteína de tipo selvagem, enquanto que as alterações de entropia permaneceram praticamente inalteradas para a ligação ao amprenavir. Isto significa que o TMC-I26 tem melhor capacidade de lidar com a mutação porque tem uma entalpia mais desfavorável devido à perda de interação de ligação, que é compensada pelo ganho na entropia devido ao aumento da flexibilidade conformacional no complexo proteína-inibidor. O mesmo já não acontece com o amprenavir, pois não há ganho de entropia o que resulta numa menor afinidade para ambos os mutantes. Estes inibidores são denominados de inibidores adaptativos. Com este estudo sublinha-se a importância de mapear o polimorfismo de sequência de um alvo da substância ativa para a sua estrutura tridimensional, de maneira a identificar os aminoácidos que não variam no sítio de ligação substrato/inibidor. De salientar que o polimorfismo do aminoácido induzido pela substância ativa na protease do HIV não ocorreu de forma aleatória, tal como as proteína mutantes tem de manter a sua atividade catalítica de maneira a assegurar a replicação viral mas não sendo sensíveis aos inibidores. Significa isto que existem regiões próprias onde a ligação resulta na perda da atividade catalítica da enzima. A substância ativa deverá ser desenvolvida de forma a estabelecer ligações mais fortes com essas regiões. As regiões variáveis do local de ligação deverão ter elementos flexíveis da molécula da substância ativa de maneira a adaptar a molécula a diferentes proteases mutantes (Krell, 2008).

## 4.2. Calorimetria diferencial de Varrimento

### 4.2.1. Introdução

O calorímetro de exploração diferencial deteta pequenas mudanças de temperatura entre a célula de referência, que está preenchida com solvente, e a célula da amostra, que contem a proteína ou o composto de interesse disperso no mesmo solvente da célula de referência (Johnson, 2013).

À medida que a temperatura de ambas as células aumenta, a célula da amostra absorve calor e produz uma diferença de temperatura na célula de referência. Os aquecedores localizados na célula da amostra recebem a mensagem e aquecimento e produzem energia elétrica por forma à diferença de temperatura voltar ao seu valor inicial. Esta energia elétrica é proporcional ao excesso de calor induzido pelo processo (Johnson, 2013).

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) mede as trocas de calor de diferentes fenómenos quando há aumento ou diminuição de temperatura nas biomoléculas. (Johnson, 2013). É aplicado um gradiente de temperatura à amostra e referência, e os processos ou transições induzidos por mudanças de calor e associadas à desestruturação térmica são monitorizadas. Durante a experiência, o a diferença de calor necessária para manter a velocidade de aquecimento da amostra em comparação com a célula de referência é recolhida e é obtida a capacidade calorífica da reação em função da temperatura – termograma (Krell, 2008).

A DSC foi a primeira técnica calorimétrica a desenvolver-se para o estudo de amostras biológicas. Pode ser utilizada para determinar os equilíbrios termodinâmicos, a estabilidade do mecanismo de enrolamento de proteínas (*foldng*), para o rastreio qualitativo da estabilidade térmica, ou como indicador para o estabelecimento de ligações, no estudo de formulações farmacêuticas e das condições favoráveis ao crescimento de cristais (Johnson, 2013). No entanto, apesar dos dados quantitativos que podem ser obtidos, esta raramente é aplicada para a doseamento dos principais

constituintes de produtos acabados. Isto deve-se ao fato de, por um lado o analito ter de apresentar um pico calorífico bem definido e característico, e por outro lado, os restantes componentes não deverem interferir com a área do pico (Bucci et al., 2000).

Esta técnica pode ser utilizada na caracterização qualitativa de proteínas nas diferentes etapas de desenvolvimento de uma substância ativa, nas quais são determinados parâmetros termodinâmicos associados a transições estruturais induzidas termicamente, são feitas previsões da estrutura, conformação termodinâmica e cinética da estabilidade (Morar-Mitrica et al., 2013). Comparativamente com a ITC, ao contrário desta técnica, esta técnica é menos utilizada já que a ITC permite medir as interações de vários componentes numa mistura a uma temperatura fixa (Johnson, 2013).

A análise dos dados retirados de uma experiência de DSC, permite relacionar todos os parâmetros termodinâmicos, pois há uma relação directamente proporcional entre a estabilidade térmica e a estabilidade da proteína. Adicionalmente, é possível utilizar esses dados para, através da estabilidade térmica da proteína, prever o seu comportamento durante a armazenagem (Morar-Mitrica et al., 2013).

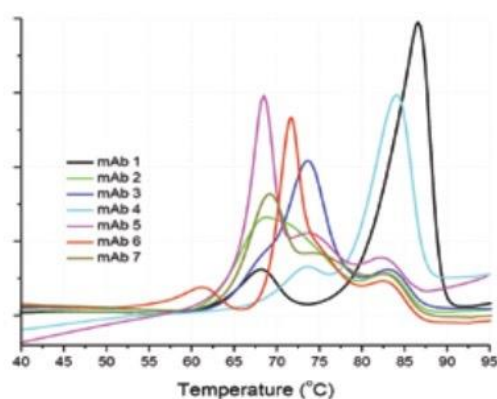


Figura 7 - Monitorização DSC de sete mAbs (Morar-Mitrica et al., 2013).

Como exemplo apresenta-se a figura 7, onde a análise de dados de DSC começa com a avaliação qualitativa do termograma. Avalia-se visualmente o número de picos, a sua posição, a sua forma e a área destes. Esta primeira avaliação permite estimar valores de  $T_m$  e  $T_{onset}$ . Os valores da temperatura de fusão -  $T_m$  estimam-se a partir do valor

máximo do pico endotérmico evitando-se assim o constrangimento de processos mais lentos ou com fenómenos associados (por ex. *unfolding*). Os valores da temperatura de agregação também podem ser estimados. Embora não proporcionem uma descrição completa do comportamento termodinâmico da proteína, são bastante úteis no rastreio rápido e classificação das mesmas (Morar-Mitrica et al., 2013).

Para uma abordagem típica usada para caracterização e comparação de substâncias ativas, já se terá de considerar um conjunto completo de parâmetros termodinâmicos. Esta complexa abordagem deverá recair primariamente sobre critérios de sensibilidade, precisão e exatidão do método. Devido às diferenças no sistema tampão, a qualidade do sinal DSC, e desdobração de proteínas, recomenda-se que a precisão e sensibilidade do métodos sejam determinados para cada classe de proteína (Morar-Mitrica et al., 2013). (11)

#### **4.2.2. Microcalorimetria Diferencial de Varrimento**

Quando nos referimos à investigação de biomoléculas, falamos preferencialmente de microcalorimetria abrangendo todas as etapas que figuram desde a investigação ao desenvolvimento de um produto farmacêutico (Krell, 2008).

As utilizações da microcalorimetria destinam-se a áreas tão vastas como o desenvolvimento de substâncias ativas, contornando problemas como a resistência, a otimização de proteínas para aumento do seu prazo de validade, a previsão da biodisponibilidade de substâncias ativas, o controlo de produtos farmacêuticos complexos ou a otimização da eficiência do transporte em terapêutica genética (Krell, 2008).

A principal limitação desta técnica, tal como na ITC, diz respeito às quantidades relativamente grandes de amostra que são necessárias para realizar a análise (Krell, 2008).

Esta técnica utiliza um gradiente de temperatura que é aplicado a uma amostra e são monitorizadas as trocas de calor associadas à desestruturação térmica. Para proteínas, quando se verificam os processos de desnaturação, aparecem picos no termograma indicativos de um acontecimento endotérmico, representativo do desdobramento da proteína já que a forma desnaturada tem uma energia mais alta do que a nativa (Krell, 2008).

### **4.2.3. Aplicações da calorimetria/microcalorimetria diferencial de varrimento**

#### **4.2.3.i. Medição da capacidade calorífica absoluta**

A capacidade calorífica absoluta é facilmente determinada numa experiência de DSC através da subtração da linha de base e da normalização da concentração. Esta propriedade caracteriza o estado nativo e desnaturado das proteínas dando informações sobre a sua estrutura e flexibilidade. Vários estudos demonstraram que a capacidade calorífica absoluta de proteínas nativas e desnaturadas varia em função da temperatura tendo valores comuns quando normalizados por grama de proteína. Recorrendo a estes valores é fácil prever se um novo sistema tem valores típicos para um proteína globular, ou se existem regiões de perturbação do seu estado nativo que aumentariam a sua capacidade calorífica, ou se por outro lado, se apresentam num estado desnaturado altamente estruturado, o que levaria à redução da sua capacidade calorífica a alta temperatura (Johnson, 2013).

Para determinar este parâmetro tem de se considerar a capacidade calorífica e o volume do solvente que é deslocado a partir da célula de amostra através da proteína, conhecimento da massa de proteína utilizada, volumes específicos parciais de proteína e solvente e ainda a capacidade de calor do solvente. As medições da capacidade de calor absoluta exigem alguma técnica e preparação de amostras, como a desgaseificação, e diálise exaustiva com o solvente é também necessário (Johnson, 2013).

#### **4.2.3.ii. DSC e cinética**

A DSC é muito útil na caracterização das cinéticas de processos irreversíveis. Os modelos mais simples dizem respeito ao estudo de proteínas nativas e no seu estado desnaturado irreversivelmente modificado, passando por um quase equilíbrio dos dois estados. Uma análise mais complexa considera a desnaturação como um equilíbrio entre a proteína nativa e a quase desnaturada. Ou seja, analisa-se a evolução termodinâmica da desnaturação proteica até à temperatura da irreversibilidade (Johnson, 2013).

O estudo da estabilidade cinética de proteínas é conseguido pela extrapolação dos resultados para temperaturas baixas. Com o objectivo de prever a estabilidade cinética sob condições mais agressivas a que se sujeitam conformações parcialmente dobradas ou desdobradas *in vivo*, recorre-se ao uso de enzimas proteolíticas durante a análise de DSC (Johnson, 2013).

#### **4.2.3.iii. Estabilidade das proteínas e identificação racional das condições para a sua manutenção.**

A estabilidade térmica de uma proteína está sempre relacionada com a cinética e o equilíbrio, ambos possíveis de quantificar segundo a técnica de DSC. Também a termoestabilidade pode ser medida, e diz respeito à suscetibilidade das proteínas à desnaturação térmica que se reflete na  $T_m$  observada no termograma. A  $T_m$  pode representar tanto um valor termodinâmico do equilíbrio como um valor aparente no caso de uma desnaturação irreversível. A enorme vantagem na medição da desnaturação proteica por DSC é o facto de medir a absorção de calor, de forma direta, sem interferência ou sobreposição de outros processos (Johnson, 2013).

Outra grande vantagem desta técnica é o facto de a DSC medir os processos com uma ligeira pressão aplicada à célula da amostra e de referência. Esta ligeira sobrepressão permite varrimentos até 140°C (ou menos em sistemas aquosos), sem atingir o ponto de ebulição da amostra. Isto permite estudar proteínas isoladas a partir de organismos termofílicos e hipertermófilos, muitos contêm proteínas cuja temperatura de fusão se

situa bem acima de 100°C. A DSC é uma técnica muito utilizada uma vez que a caracterização termodinâmica completa permite revelar a importância da temperatura para o equilíbrio térmico e por conseguinte o mecanismo que leva à estabilidade térmica (Johnson, 2013).

Hoje em dia, o desenvolvimento de agentes terapêuticos à base de proteínas tem tido um crescimento exponencial, tendo a formulação biofarmacêutica um papel importante na estabilidade de uma proteína. Geralmente estes agentes são administrados por injeção de pequenos volumes de soluções muito concentradas, o que leva à necessidade do seu armazenamento sem degradação da proteína ativa. A DSC pode contribuir para o desenvolvimento dos processos que asseguram a estabilidade de uma proteína e ainda avaliar a viabilidade da mesma ao redissolver-se numa solução. A DSC em associação com a fluorimetria de varrimento diferencial (DSF) e outros métodos analíticos que recorrem à variação de temperatura, torna a obtenção da  $T_m$  aparente mais fiável (Johnson, 2013).

Os excipientes usados numa formulação poderão afetar a capacidade da proteína se auto-associar através de efeitos indiretos no solvente, e noutros casos podem estabilizar o sistema através da ligação direta à proteína nativa. Os ligandos aumentam a estabilidade da ligação por deslocamento da posição de equilíbrio. Essa estabilização gera um aumento da  $T_m$ , o que torna possível inferir acerca da afinidade de ligação do próprio ligando. Com esta análise de dados por parte da DSC é possível quantificar afinidades de ligação extremamente ténues e próximas (Johnson, 2013).

É importante garantir a estabilidade intrínseca das proteínas terapêuticas uma vez que a falta desta poderá afetar a expressão da proteína e levar ao enrolamento incorreto diminuindo a fração de proteína ativa (Krell, 2008).

Garber e Demarest (Garber & Demarest, 2007) realizaram um estudo de DSC com dezassete anticorpos terapêuticos humanos. Os valores de  $T_m$  para os fragmentos de ligação do antígeno (Fab) variaram largamente entre 57-82° C. Os anticorpos com estabilidades térmicas menores tiveram uma expressão fraca. A análise da sequência de aminoácidos dos anticorpos analisados permitiu identificar quais os responsáveis pela

reduzida estabilidade térmica. Com este estudo obteve-se um guia para otimizar a estabilidade de outros anticorpos de diagnóstico e terapêuticos por meio desta técnica (Krell, 2008).

A análise por DSC é também utilizada para monitorizar com precisão o aumento da estabilidade térmica por mutagénese no local ativo, a qual permite quantificar o efeito da estabilização ou destabilização de cada substituição de aminoácidos. Isto foi demonstrado na otimização da estabilidade do fragmento Fab antitetânico toxoíde humano. A expressão desta proteína em *Escherichia coli* resulta num rendimento muito baixo da proteína funcional por falta de estabilidade intrínseca. Quarenta e cinco aminoácidos do Fab foram submetidos a mutagénese de saturação, usando uma análise automática, rastrearam-se as estabilidades térmicas de quatro mil membros da biblioteca de mutantes. As Fab que continham varias mutações e que apresentavam um aumento da estabilidade térmica foram geradas como proteínas recombinantes purificadas. Os mutantes identificados através do aumento da estabilidade térmica expressaram com rendimentos mais elevados em *E.coli* (Krell, 2008).

Os testes de integridade de um determinado produto farmacêutico são de extrema importância no que concerne à saúde de quem os utiliza. Estes testes permitem avaliar a estabilidade através do estudo das diferentes propriedades do produto farmacêutico, armazenado em diferentes condições, por um período de tempo significativo. De notar que sem a obtenção destes dados, o processo de desenvolvimento do produto fica comprometido (Krell, 2008).

Remmele e seus colegas (Remmele et al., 1998) mostraram que DSC pode ser utilizada para racionalizar a seleção de condições de armazenagem. Investigaram as condições de solução para estabilizar o recetor de interleucina-1. A formulação farmacêutica que contém esta proteína, necessita de um conservante por se tratar de um produto para múltiplas doses. Nesse sentido, estudou-se o comportamento da proteína por DSC na presença de diferentes conservantes. Em conjunto, foi realizado um teste de estabilidade à proteína com monitorização da percentagem da sua forma nativa, com a duração de dois meses e na presença de vários conservantes. Verificou-se uma correlação direta entre a estabilidade térmica determinada por DSC e a quantidade de proteína nativa

observada no teste de estabilidade. Esta correlação pode ser explorada para identificar de forma rápida e racional as condições mais promissoras (Krell, 2008).

Em experiências iniciais de DSC, determina-se o pH ótimo para a estabilidade da proteína e depois segue-se um rastreio ao excipiente a pH ótimo.

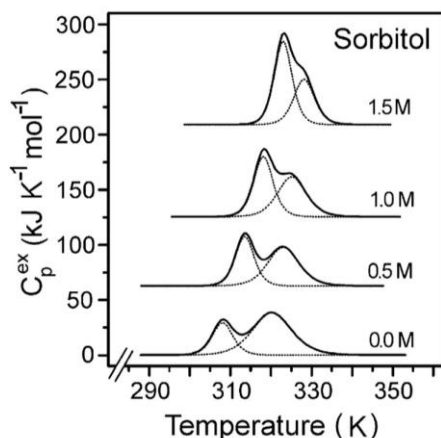


Figura 8 - Análise DSC da hexoquinase A em função da quantidade de sorbitol (Krell, 2008).

A figura 8 representa a desnaturação térmica da hexoquinase A a pH ótimo e em função da presença de concentrações crescentes de sorbitol. É uma proteína monomérica com dois domínios estruturais. A análise DSC desta proteína, revelou dois picos que se sobrepõem parcialmente e que foram atribuídos à desnaturação independente dos dois domínios estruturais. A curva pode ser dividida em dois eventos separados. O primeiro é o ponto médio de transição da proteína desdobrada  $T_m$ , correspondente à temperatura do pico. Nesta temperatura, metade da proteína apresenta-se no seu estado desnaturado, e metade no seu estado nativo. O segundo parâmetro representa a variação da entalpia que é traduzida pelas áreas sob a curva e que correspondem à energia necessária para haver desnaturação. A adição de sorbitol leva a um aumento da temperatura de desnaturação-  $T_m$ , o que se traduz numa maior estabilidade desta proteína, tornando o sorbitol um aditivo de eleição (Krell, 2008).

#### 4.2.3.iv. DSC de amostras complexas

No campo do diagnóstico clínico, a DSC tem tido um papel relevante uma vez que permite a análise de amostras biológicas complexas como o plasma sanguíneo. A DSC é capaz de medir e obter um termograma da mistura das proteínas plasmáticas em que o perfil resultante representa a soma ponderada da dos componentes individuais e as respetivas estabilidades térmicas. A maior parte do sinal prove o termograma do plasma medido pode ser reconstruindo a partir de exames de DSC individuais das proteínas purificadas, cuja contribuição é normalizada para a concentração relativa no plasma (Johnson, 2013).

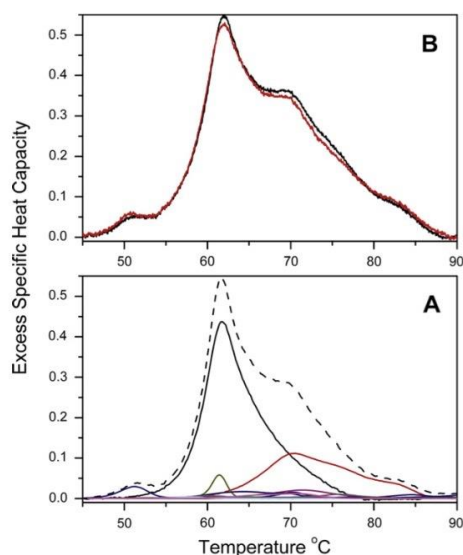


Figura 9 - Termograma de DSC de plasma humano (B) e respetiva desconvolução para os componentes individuais (A) (Johnson, 2013).

A vacina contra o vírus da gripe é um exemplo de um produto biológico muito complexo, pois é constituída por três estirpes diferentes pertencentes aos subtipos H1N1, H3N2 e do tipo B. As etapas de produção da vacina incluem a purificação do vírus, seguida da sua inativação (Krell, 2008).

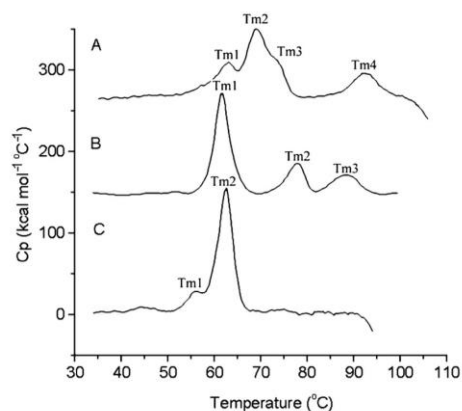


Figura 10 - Termogramas de DSC de três amostras do vírus purificado e ativo (Krell, 2008).

Como se pode observar na figura 10, os termogramas variam consoante as diferentes estirpes mostrando duas a quatro transições térmicas. Curiosamente, num outro estudo realizado por Epanand e Epanand (Epanand & Epanand, 2002) utilizando as mesmas condições experimentais e analisando dois vírus pertencentes a dois dos mesmos subtipos (H1N1 e H3N2), provou que mesmo estirpes de vírus que pertencem ao mesmo subtipo têm termogramas diferentes. Isto significa que vírus com sequências muito semelhantes têm diferentes características de desnaturação, ou seja, o perfil de desnaturação é muito específico para cada estirpe de vírus, característica que deve ser controlada durante o processo de fabrico (Krell, 2008).

#### 4.2.3.v. Calorimetria Diferencial de Varrimento para avaliar a estabilidade de um anticópro monoclonal (mAb)

Os anticópro monoclonais (mAbs) são hoje parte integrante de produtos biofarmacêuticos usados no tratamento de estados agudos como cancro, doenças virais e doenças cardiovasculares, bem como em doenças crónicas como a asma, a diabetes, o lúpus e a artrite. São proteínas em forma de Y, com duas cadeias longas pesadas (H) e duas curtas e leves (L). A cadeia leve é composta por dois domínios e a cadeia pesada por quatro. Os domínios de ambas as cadeias são chamados de domínios variáveis (VH e VL) no que diz respeito à composição da sequência de aminoácidos. Funcionalmente é a região variável a responsável pela ligação ao antígeno, e a região constante (C) composta por  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  e CL que define a atividade das células imunes.

Estruturalmente, um domínio de Fe (fragmento cristalizável, composto por pares de  $C_{H2}$  e  $C_{H3}$ ) está ligado a dois domínios Fab idênticos (fragmento de ligação ao antigénio) através de uma região de charneira flexível, como demonstra a figura 11 (Morar-Mitrica et al., 2013).

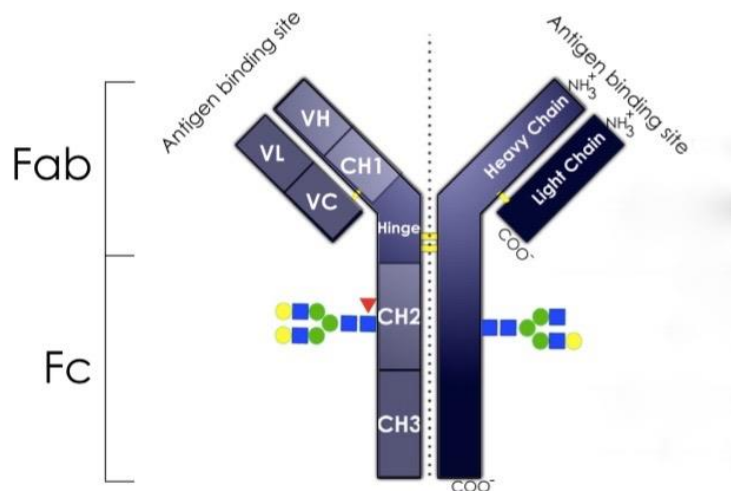


Figura 11 - Representação esquemática da estrutura geral de um anticorpo (Higel et al., 2016).

A principal vantagem da DSC para analisar a estrutura e a estabilidade do mAb é através da identificação e caracterização dos domínios Fab,  $C_{H2}$  e  $C_{H3}$ . Uma análise típica de DSC para um mAb origina um termograma com três transições de desdobraamento representadas por três picos diferentes como demonstra a figura 12. (Morar-Mitrica et al., 2013).

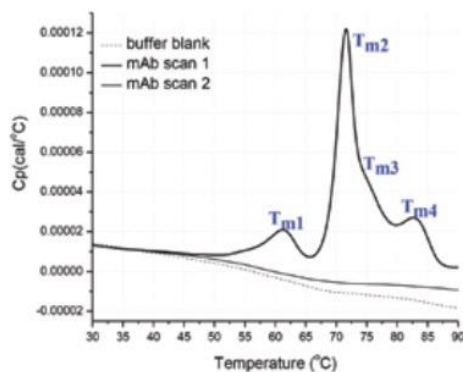


Figura 12 - Análise DSC a mAbs falta ref (Morar-Mitrica et al., 2013)

A primeira transição de pico DSC corresponde ao desdobraimento do domínio C<sub>H2</sub> C<sub>H2</sub>, a segunda ao componente Fab e a terceira ao domínio C<sub>H3</sub>. Demonstrou-se que Fab e Fc desnaturam de forma independente e exibem diferentes sensibilidades ao *stress*. O facto de a DSC conseguir avaliar individualmente o efeito de tensões específicas (stress) relacionadas com a estabilidade dos domínios, torna-a ideal para o desenvolvimento de mAb (Morar-Mitrica et al., 2013).

Sete mAbs foram analisados por DSC, estando o termograma resultante representado na figura 7 (Morar-Mitrica et al., 2013).

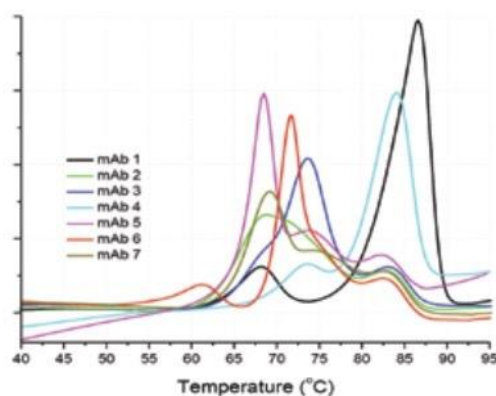


Figura 7- Monitorização DSC de sete mAbs (Morar-Mitrica et al., 2013).

Podem ser observadas duas a quatro transições de desdobraimento, número de picos diferentes, posição dos picos, forma, altura e área são também observáveis, apresentando uma boa gama de estabilidades para os mAbs analisados. O mAb-6 apresenta um domínio C<sub>H2</sub> termodinamicamente estável, há claramente diferentes estabilidades para o domínio Fab, com os mAb-1 e mAb-4 apresentando a maior estabilidade para estas molécula. E o resto dos mAbs analisados inserem-se na categoria de estabilidade média. Com esta demonstração simples desta análise podem-se identificar de forma rápida as características de estabilidade de cada mAbs e definir o seu perfil termodinâmico (Morar-Mitrica et al., 2013).

#### 4.2.3.vi. Impacto do congelamento e secagem de produtos farmacêuticos

O congelamento e a secagem são métodos que fazem parte da conservação e armazenamento de produtos farmacêuticos. No entanto, ambos podem alterar a integridade das proteínas desnaturando-as e levando habitualmente à sua agregação. Na ausência da técnica de DSC, o método de tentativa e erro era o mais utilizado para obtenção das condições de congelamento e secagem ótimas que garantissem a viabilidade das proteínas. Hoje em dia, com a DSC, é possível estudar as melhores condições de armazenamento de forma mais racional através da análise da desnaturação térmica de biomoléculas. Complementarmente, pode determinar-se a temperatura de transição vítrea  $T_g$  (temperatura a cima da qual os materiais adquirem características de líquidos e abaixo da qual as propriedades físicas dos materiais amorfos variam de modo semelhante a uma fase cristalina) de componentes do tampão em que se encontra a proteína (Krell, 2008).

Piedmont e os seus colegas (Piedmonte et al., 2007) realizaram um estudo a fim de demonstrar que a  $T_g$  é uma excelente ferramenta de otimização da estabilidade de amostras congeladas de um Fc (parte constante do anticorpo) por um período de tempo longo. Os autores debruçaram-se sobre o facto de a proteína desnaturar quando armazenada a  $-30^\circ\text{C}$  por um longo prazo. Foi adicionado à proteína 5% (m/V) de sorbitol (como referido anteriormente, é um estabilizador de proteínas) e foram depois analisadas as amostras congeladas por vinte semanas. Os termogramas obtidos após esse período revelaram que ao longo do tempo foram detetadas duas transições  $T_g$  a  $-20^\circ\text{C}$  e  $-8^\circ\text{C}$  as quais se deveram à cristalização do sorbitol. Como este ficou numa fase separada da proteína, o efeito de proteção não se verificou o que levou a agregação desta. Tal não seria suposto acontecer uma vez que se espera que o agente estabilizador se deva manter durante todo o processo de congelação no mesmo estado que a proteína para assegurar integridade da mesma (Krell, 2008).

Noutro estudo, Kreilgaard e os seus colegas (Kreilgaard et al., 1999) demonstraram que para uma lipase, a cristalização do manitol durante a liofilização reduziu a estabilidade da proteína em relação ao observado sem a sua adição (Krell, 2008)

#### 4.2.3.vii. Análise de células bacterianas inteiras

Os perfis de desnaturação térmica das bactérias são complexos por terem vários picos, no entanto, graças à existência de uma base de dados reunidos durante as duas últimas décadas, e que foi sendo atualizada, podemos hoje relacionar esses picos com o desdobramento de ribossomas, DNA e lipídios. Em comparação com os dados obtidos de experiências DSC em estudos de viabilidade, associa-se a morte celular ao desenrolar dos ribossomas. A importância destes estudos é a melhorar a compreensão da inativação térmica de bactérias, e esporos de bactérias, por forma a melhor assegurar a saúde alimentar (Krell, 2008).

Outro exemplo da utilização da DSC traduz-se na análise e estabilização de bactérias congeladas, como as lácteas, muito útil na indústria e alimentos (Krell, 2008).

#### 4.2.3.viii. Outras Aplicações da técnica de DSC

Há outras áreas de aplicação da DSC como por exemplo o estudo de polímeros. A figura 13 demonstra as transições gerais características de uma amostra de tereftalato de polietileno (Ford & Mann, 2012).

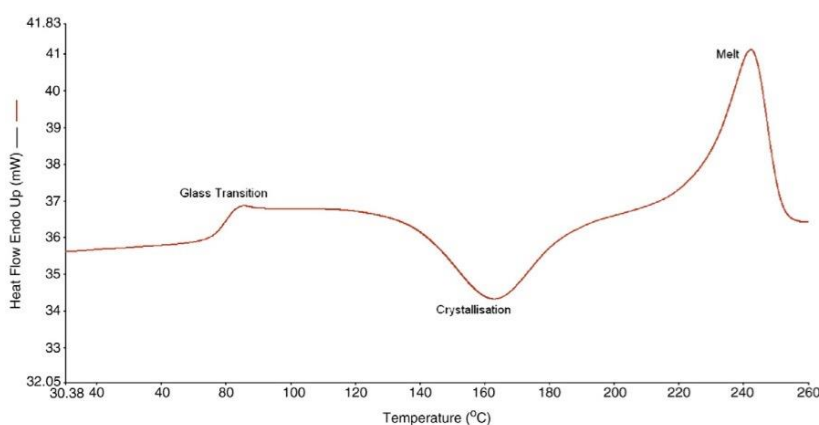


Figura 13 - Análise DSC de um polímero (Ford & Mann, 2012).

A amostra apresenta uma transição vítrea (passagem estado líquido) associada à natureza amorfa do material. A elevadas temperaturas, o termograma apresenta um processo

exotérmico que corresponde à recristalização do polímero, e a uma temperatura ainda mais elevada existe uma transição endotérmica associada à fusão da fração cristalina do polímero. Estas transições são representativas dos fenómenos que podem ocorrer na maioria dos materiais (Ford & Mann, 2012).

Outros pontos de interesse atribuídos a esta técnica relacionam-se com a obtenção de informação sobre a quantidade de substância ativa dispersa e dissolvida num veículo medicamentoso sólido, onde é imprescindível o conhecimento das características de libertação da própria substância ativa. Em relação à libertação modificada de substâncias ativas, a DSC tem um papel fundamental no desenvolvimento de biopolímeros para encapsulação de substâncias ativas pois alguns são termosensíveis o que os leva a incharem em função da temperatura sendo necessário controlar a taxa de libertação da substância ativa (Krell, 2008).

O uso de técnicas DSC para estudo da solubilidade em polímeros engloba uma mistura de substância ativa num polímero através de uma gama de concentrações dessa substância que depois é analisada. A endotérmica da substância ativa através da sua fusão durante o processo de aquecimento. Através dos valores de entalpia de fusão encontrados e com as concentrações já conhecidas da substância ativa, é possível a construção de um gráfico, que interceptando a entalpia a zero obtem-se a solubilidade da substância ativa no polímero em torno do seu ponto de fusão (Ford & Mann, 2012).

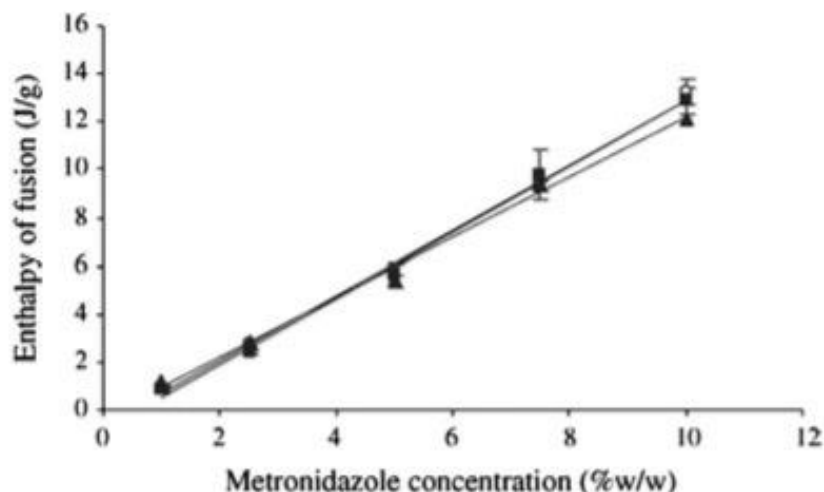


Figura 14 - Representação gráfica da relação da concentração de Metronidazol e a sua Entalpia de fusão (Ford & Mann, 2012).

Foi medida a solubilidade do metronidazol inserido numa matriz de silicone usando varrimento rápido representada a análise na figura a cima. Traçando o contra a concentração da substância ativa, extrapolou-se a zero o  $\Delta H_F$  obtendo-se linhas retas correspondentes aos valores de solubilidade do metronidazol calculados com a interseção do eixo das abcissas, sendo estes  $6.156\text{mg g}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C min}^{-1}$ , no entanto, a fração de calor aos  $400^\circ\text{C min}^{-1}$  já foi  $2.16\text{mg g}^{-1}$ . Esta diferença demonstra um dos problemas relacionados com a velocidade de exploração normal, as amostram podem sofrer alterações sob condições experimentais devido ao período de varredura ser mais longo para atingir a temperatura de fusão do substância ativa. Blade et al. Confirmaram que a rápida taxa de aquecimento e de varredura surgem com o propósito de fornecer informações mais precisas relativas a quantidade de uma substância ativa cristalino numa dispersão sólida, por serem mais rápidas não há o risco da amostra alterar durante o processo (Ford & Mann, 2012).

#### 4.2.3.ix. Bio-polímeros

Referindo novamente as transições vítreas, aquelas que contém proteínas e polímeros de elevado peso molecular tornam-se na maioria dos casos muito difíceis de determinar devido à fraqueza da transição. Liu et ali. utilizaram o varrimento rápido em DSC para

caracterização de amostras com transições vítreas fracas, recorreu ao amido contendo diferentes teores de água. A quando da utilização da DSC convencional, obteve taxas de 50°C/min e foi incapaz de detetar a  $T_g$  do amido contendo 13% de humidade. Pelo varrimento rápido as taxas variaram entre 50°C min<sup>-1</sup> e 300°C min<sup>-1</sup> determinou a  $T_g$  do amido contendo 13,3, 11,6 e 8,7% de húmidas. Analisando os resultados após extrapolação para a taxa de aquecimento de zero, estimou a  $T_g$  como 59,2°C, 61,4°C e 67,3°C. Para 13,3, 11,6 e 8,7% de humidade. A importância a reter deste estudo foi o fato das transições vítreas são mais facilmente visualizadas nas taxas de aquecimento mais rápidas da DSC de varrimento rápido. (Ford & Mann, 2012).

### 4.3. Calorimetria de solução

Esta técnica calorimétrica foi desenvolvida a fim de quantificar misturas de sacarose cristalina ou amorfa e varfarina sódica através da diferença de energias que se verificam na dissolução das duas formas sólidas. Nestes estudos observou-se uma relação linear entre a percentagem da forma cristalina presente na amostra estudada, e o calor da dissolução. Esta técnica veio a revelar-se muito rápida, precisa e conveniente na determinação da percentagem de cristalinidade de excipientes ou substâncias ativas comuns. Estas vantagens são particularmente importantes no estudo de formulações cuja percentagem de fase cristalina/amorfa se encontra abaixo do limite inferior de deteção da DSC ou da difração de raios X de pós -PXRD (Gao & Rytting, 1997).

A percentagem de fase cristalina tem uma papel fundamental na biodisponibilidade traduzido pela relação que existe com a taxa de dissolução da substância ativa, a sua estabilidade fisico-química e a sua compactação aquando da produção de comprimidos (Gao & Rytting, 1997).

Numa perspetiva histórica, Pikal et al. em 1978 (Pikal et al., 1978) iniciaram a calorimetria de solução na indústria farmacêutica para quantificar a cristalinidade dos antibióticos beta-lactâmicos através da medição dos calores de dissolução. Na década de 1980, Guillory e Erb (Guillory et al., 1985) estudaram as propriedades do estado sólido de produtos farmacêuticos com a finalidade de determinar o grau de cristalinidade e assim caracterizar as formas e solvatos polimórficos de maneira a obter informação relativa à quantidade e composição de misturas binárias de diferentes formas polimórficas. Todos estes estudos revelaram limitações relativas ao uso único de substâncias medicamentosas simples, não estando ainda disponível um método para a mesma quantificação em sistemas mais complexos. Contudo, mesmo tendo aplicabilidade apenas para formulações simples, a sua utilização é relevante e habitual quer no desenvolvimento quer no controlo de qualidade (Gao & Rytting, 1997).

Neste tipo de análise térmica, a mudança de temperatura produzida pela interação física durante a mistura de duas soluções, ou de um sólido e um líquido, é monitorizada em função do tempo em condições de temperatura constante. Esta traduz-se na reação :

$S+L \leftrightarrow SL_1$ , onde S representa o substrato e L o ligando livre. Neste sistema em equilíbrio, consideramos a variação da entalpia padrão e o efeito total do calor relativo às moles de  $SL_1$  traduzido na relação:  $Q = SL_1 * \Delta H^0$ . Como esta técnica calorimétrica mede o calor gerado durante a dissolução do substrato,  $SL_1$  corresponde à quantidade total de amostra, e  $\Delta H^0$  o calor de solução da diluição infinita para qualquer valor de L (solvente) fixo. Assim, podemos caracterizar quantitativamente o calor da dissolução através da medição do calor total gerado neste processo. Se for um sistema binário onde não haja interação, o calor específico total da dissolução corresponde à soma dos calores específicos de cada componente individualmente (Gao & Rytting, 1997).

Na DSC, ao contrário da calorimetria de solução, as medições são feitas a altas temperaturas, o que pode resultar em alterações da estrutura durante o processo de aquecimento para amostras termolábeis como sendo os hidratos ou solvatos, ou substâncias ativas que poderiam sofrer decomposição ou libertação do solvente antes do ponto de fusão (Gao & Rytting, 1997).

A microcalorimetria isotérmica, tem uma sensibilidade específica de quatro ordens de grandeza superior à DSC convencional. No entanto, ao contrário da calorimetria de solução, só pode ser utilizada para materiais amorfos que cristalizem espontaneamente a determinada humidade ou na presença de determinados vapores orgânicos (Gao & Rytting, 1997).

Na calorimetria de solução, o calor é diretamente medido à temperatura desejada e a amostra é parcialmente cristalina. Se o material amorfo estiver na sua forma pura, e as diferenças de energia entre a forma amorfa e cristalina forem consideráveis, este método é potencialmente mais preciso que os referidos anteriormente (Gao & Rytting, 1997).

Uma desvantagem deste método é o facto de habitualmente incluir na medida da entalpia de solução, ou de imersão, processos como quebra de ligações, penetração de líquidos, moldagem, solvatação, rearranjo e alterações conformacionais, tornando-se difícil por vezes quantificar cada um destes processos individuais. Nesse sentido, Craig e Newton (Craig & Newton, 1991) criaram um modelo na tentativa de quantificar o processo de dissolução correlacionando os dados de calor da solução com os resultados

realizadora por DSC. Contudo, o método é limitado a sistemas em que a entalpia de molhamento varia com a estrutura do cristal (Gao & Rytting, 1997).

Outra desvantagem é o facto de ser necessário dispor do produto em análise com 100% de cristalinidade e 100% amorfo para efeitos de calibração. Materiais puros vindos de diferentes fontes, ou gerados por diferentes métodos, podem diferir na medição do calor da solução (Gao & Rytting, 1997).

Por último, outra limitação deste método é o próprio solvente. O composto em estudo deve ter uma taxa de dissolução muito elevada no solvente escolhido originando grandes variações entálpicas. Para uma formulação, os restantes excipientes envolvidos na análise deverão ser humedecidos durante o processo no solvente escolhido. O calor produzido durante o processo de dissolução necessita de calibração através de uma quantidade conhecida de calor. A correção pode ser calculada com precisão por apenas um período de tempo limitado. Isto também limita o método para experiências que se completam no período de uma a duas horas uma vez que o efeito térmico da dissolução é diluído por dissipação e perdas no próprio calorímetro. A sensibilidade do método também é dependente do material, já que a diferença de energia entre as formas amorfa e cristalina, pode variar dependendo das formas sólidas que contenha a amostra e do próprio solvente (Gao & Rytting, 1997).

### III. Conclusão

O estabelecimento de uma compreensão física e estrutural abrangente dos eventos que dão origem aos fenómenos termodinâmicos em sistemas bioquímicos é uma tarefa difícil, que se situa além das abordagens computacionais atualmente disponíveis para a análise da estrutura molecular e das interações. No entanto, as melhorias na instrumentação e nos métodos experimentais, juntamente com a evolução das abordagens termodinâmicas para áreas tão diversas como o dobramento/desdobramento de proteínas e a descoberta de novos medicamentos, levam a uma grande variedade de novos dados experimentais. A correlação desses dados com estudos físicos da estrutura de biomoléculas como as proteínas e da sua termodinâmica, tem o potencial de expandir significativamente a nossa compreensão de como os sistemas biológicos realmente funcionam.

Os métodos de análise térmica têm hoje em dia uma vasta aplicabilidade ao nível da indústria farmacêutica, quer no estudo do estado sólido de novos compostos, quer para o controlo de matérias-primas, para a estabilidade das mesmas e de produtos finais, para estudos de compatibilidade e para o desenvolvimento de novas formulações químicas ou biológicas.

As técnicas biofísicas, em particular a calorimetria, provaram ser imprescindíveis no desenvolvimento de produtos biofarmacêuticos. Particularmente as aplicações de DSC, são de grande relevo para a classificação desses produtos, sua caracterização, e previsão da sua estabilidade. É pois, uma técnica implícita nas principais abordagens ao desenvolvimento bem sucedido de biofármacos.

A ITC é a única técnica que pode elucidar acerca da entalpia e dos componentes entrópicos da afinidade de uma ligação. Uma vez que os componentes de entalpia e entropia estão relacionados com parâmetros estruturais, como demais foi apresentado neste trabalho, eles são utilizados como guia para a conceção molecular, como forma de validar previsões computacionais à base da estrutura de ligação e da energia (QSAR), e como uma maneira de desenvolver correlações estrutura/energia rigorosas. Ao longo

dos anos. a ITC foi considerada a técnica de referência para medir as interações moleculares, o que é evidenciado pelo grande número de estudos que relatam o uso desta técnica na medição da afinidade de ligação simples e para cálculos termodinâmicos complexos. A vantagem de decifrar os parâmetros termodinâmicos que sustentam as afinidades de ligação é o fornecimento de informação sobre os mecanismos moleculares de uma interação para melhor compreender a química e física de como as moléculas interagem umas com as outras. Tendencialmente, a ITC será cada vez mais empregue como uma ferramenta central desempenhando um papel proeminente na caracterização e conceção molecular, na conceção geral e de substâncias ativas em particular, descobrindo os mais potentes, em combinação com outras abordagens experimentais.

A calorimetria de solução tem sido utilizada para determinar quantitativamente a cristalinidade, bem como os processos de conversão no estado sólido. Pode também ser útil para examinar as alterações de cristalinidade de substâncias sólidas, de substâncias ativas ou das formulações durante o desenvolvimento da forma de dosagem sólida. Um dos desafios no uso desta técnica é o estabelecimento de uma relação linear entre o calor da dissolução e a percentagem de substância ativa cristalina presente na amostra.

#### IV. Bibliografia

- Bucci, R., Magrì, A.D. & Magrì, A.L., 2000. DSC IN THE CHEMICAL ANALYSIS OF DRUGS Determination of diclofenac in pharmaceutical formulations. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 61, pp.369-76.
- Cherkasov, A. et al., 2014. QSAR Modeling: Where have You Been? Where Are You Going To? *Journal of Medical Chemistry*, 57, pp.4977-5010.
- Craig, D.Q.M. & Newton, J.M., 1991. Characterisation of polyethylene glycol solid dispersions using differential scanning calorimetry and solution calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics*, 76, pp.17-24.
- D.Giron, 2002. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 68, pp.335-57.
- Doyle, M.L., 1997. Characterization of binding interaction by isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, pp.31-35.
- Eband, R.M. & Eband, R.F., 2002. Thermal denaturation of influenza virus and its relationship to membrane fusion. *Biochemical Journal*, 365, pp.841-48.
- Ford, J.L. & Mann, T.E., 2012. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, pp.422-30.
- Freire, E., 2008. Do Enthalpy and Entropy Distinguish First in Class From Best In Class? *Drug Discovery Today*, 13, pp.869-74.
- Gao, D. & Rytting, J.H., 1997. Use of solution calorimetry to determine the extent of crystallinity of drugs and excipients. *International Journal of Pharmaceutics*, 151, pp.183-92.
- Garber, E. & Demarest, S., 2007. A broad range of Fab stabilities within a host of therapeutic IgGs. 355, pp.751-57.
- Ghai, R., Collins, B.M. & Falconer, R.J., 2012. Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research-survey of the literature from 2010. *Journal of Molecular Recognition*, pp.32-52.
- Ghai, R., Falconer, R.J. & Collins, B.M., 2012. Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research-survey of literature from 2010. *Molecular Recognition*, 25, pp.32-52.

Guillory, Keith, J. & Erb., D.M., 1985. *Using solution calorimetry to quantitate binary mixtures of three crystalline forms of sulfamethoxazole*. [Online] Available at: [www.pharmamanufacturing.com](http://www.pharmamanufacturing.com) [Accessed 29 May 2016].

Haines, P.J., 1995. *Thermal Methods of analysis Principles, Applications and Problems*. 1st ed.

Higel, F., Seidi, A., Sorgel, F. & Friess, W., 2016. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 100, pp.94-100.

Johnson, M., 2013. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, pp.100-09.

Kreilgaard, L. et al., 1999. Effects of additives on the stability of Humicola lanuginosa lipase during freeze-drying and storage in the dried solid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, pp.281-90.

Krell, T., 2008. Microcalorimetry: a response to challenges in modern biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 1(2), pp.126-36.

L. Selva, R. et al., 2010. Recent trends and some applications of isothermal titration calorimetry in biotechnology. *Biotechnology Journal*, pp.85-98.

Ladbury, J.E. & Chowdhry, B.Z., 1996. Chemistry & Biology. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. pp.791-801.

Leavitt, S. & Freire, E., 2001. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Structural Biology*, 11, pp.560-66.

Martins, J.P.A. & Ferreira, M.M.C., 2013. QSAR modeling: um novo pacote computacional open source para gerar e validar modelos QSAR. *Química Nova*, 36(4).

Morar-Mitrica, S., Nesta, D. & Crotts, G., 2013. Differential Scanning Calorimetry (DSC) for Biopharmaceutical Development: Old concepts, new applications. In *BioPharma Asia.*, 2013.

Ohtaka, H. & Freire, E., 2005. Adaptive inhibitors of the HIV-1 protease. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 88, pp.193-208.

Osanai, H. et al., 2013. A study of the interaction of drugs with liposomes with isothermal titration calorimetry. *Journal of Biophysical Chemistry*, pp.11-21.

Piedmonte, D. et al., 2007. Sorbitol crystallization can lead to protein aggregation in frozen protein aggregation in frozen protein formulations. *Pharmaceutical Research*, 67, pp.136-46.

Pierce, M.M., Raman, C.S. & Nall, B.T., 1999. Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. *Methods*, pp.213-21.

Pikal, M., Lukes, A., Lang, J. & Gaines, K., 1978. Quantitative crystallinity determinations for beta-lactam antibiotics by solution calorimetry: correlations with stability. 67, pp.767-73.

Remmele, J.R., Nightlinger, N., Srinivasan, S. & Gombotz, W., 1998. Interleukin-1 receptor (IL-1R) liquid formulation development using differential scanning calorimetry. *Pharm Res*, 15, pp.200-8.

Sarver, R.W. et al., 2007. Binding thermodynamics of substituted diaminopyrimidine renin inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 360, pp.30-40.

Shoifet, E., Schulz, G. & Schick, C., 2015. Temperature modulated differential scanning calorimetry - extension to high and low frequencies. *Thermochimica Acta*, 603, pp.227-36.

Wang, B. & Lin, Q., 2013. Temperature-modulated differential scanning calorimetry in a MEMS device. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 180, pp.60-65.

Weber, P.C. & Salemme, F.R., 2003. Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 13, pp.115-21. Available at: [www.current-opinion.com](http://www.current-opinion.com) [Accessed 8 April 2016].