

**Pedro de Alcântara Pessoa Filho**

**Aplicações da Termodinâmica Clássica ao estudo de sistemas de interesse  
em processos de recuperação e purificação de proteínas**

**Tese apresentada à Escola Politécnica da  
Universidade de São Paulo para a  
obtenção do título de Livre Docente junto  
ao Departamento de Engenharia Química,  
na especialidade Termodinâmica Química**

**São Paulo, SP  
Fevereiro de 2011**

Pedro de Alcântara Pessôa Filho

Aplicações da Termodinâmica Clássica ao estudo de sistemas de interesse  
em processos de recuperação e purificação de proteínas



Tese apresentada à Escola Politécnica da  
Universidade de São Paulo para a  
obtenção do título de Livre Docente junto  
ao Departamento de Engenharia Química,  
na especialidade Termodinâmica Química

São Paulo, SP  
Fevereiro de 2011

**Pessôa Filho, Pedro de Alcântara**  
**Aplicações da Termodinâmica Clássica ao estudo de**  
**sistemas de interesse em processos de recuperação e purificação**  
**de proteínas / P.A. Pessôa Filho. -- São Paulo, 2011.**  
**168 p.**

**Tese (Livre-Docência) - Escola Politécnica da Universidade**  
**de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.**

**1.Termodinâmica química 2.Equilíbrio líquido-líquido**  
**3.Equilíbrio sólido-líquido 4.Modelos matemáticos 5.Proteínas**  
**6.Polímeros sintéticos 7.Sais I.Universidade de São Paulo. Escola**  
**Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.**



## REITORIA

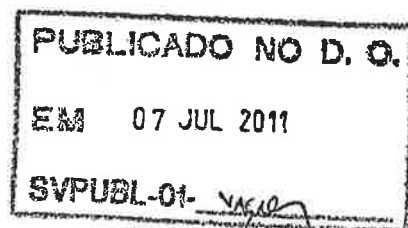
Proc. USP nº 02.1.3305.3.5  
Portaria nº 720  
1144

O REITOR DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, usando de suas atribuições legais, EXPED E a presente Portaria para declarar que tendo PEDRO DE ALCANTARA PESSOA FILHO, Professor Doutor, ref. MS-3, do QDUSP-PG, em Regime de Dedicção Integral à Docência e à Pesquisa, lotado na Escola Politécnica (Departamento de Engenharia Química), obtido o título de Livre-Docente, conforme elementos constantes do Processo USP nº 02.1.3305.3.5, fica, a contar de 28/06/2011, designado para exercer a função de Professor Associado, ref. MS-5, do mesmo Quadro, Parte, Regime e Lotação, nos termos do artigo 84 do Estatuto da Universidade de São Paulo.

Reitoria da Universidade de São Paulo,.

05 JUL 2011

JOÃO GRANDINO RODAS  
Reitor



*À Paula e ao Francisco:*

*que possam as ásperas palavras deste texto lhes soar como declarações de amor.*

*Nos olhos da libélula  
refletem-se  
montanhas distantes.  
(Kobayashi Issa)*

*Unwin, cansado, o deteve.  
- Não multipliques os mistérios - disse. - Estes devem ser simples.  
Lembra a carta roubada de Poe, lembra o quarto fechado de Zangwill.  
- Ou complexos - replicou Dunraven. - Lembra o universo.  
(Jorge Luis Borges)*

## Agradecimentos

Nenhuma obra é resultado único dos esforços de seu autor: esta afirmação é verdadeira principalmente neste caso, em que o texto apresentado sistematiza parte da produção científica de um docente. Agradecer aos orientados e aos colegas que direta ou indiretamente participaram da gestação dos trabalhos aqui apresentados é algo que faço muito menos pelo dever do que pela alegria de poder fazê-lo.

Ser-me-ia impossível, entretanto, nomear todas as pessoas cuja colaboração foi fundamental para que esta tese fosse escrita: é certo que não conseguiria mencionar todos, é certo que ausências injustas ocorreriam. Não quero correr o risco de cometê-las: por essa razão, se nesta página evito citar nomes, faço-o movido tão somente por uma profunda consideração por todos aqueles cujos nomes aqui deveriam estar.

Gostaria primeiramente de lembrar-me aqui dos meus orientados e co-orientados responsáveis por parte da pesquisa aqui relatada, aos quais deixo explícitos meus agradecimentos, não somente pelo trabalho realizado, mas principalmente pela confiança de me haver escolhido como orientador. Não menos agradecido sou aos orientados e co-orientados cuja pesquisa não esteve diretamente envolvida: pela mesma confiança depositada e pelo fato de que nosso trabalho conjunto certamente ajudou a consolidar os conhecimentos necessários para que esta tese fosse escrita. Sou também grato aos docentes e pesquisadores co-autores de alguns dos trabalhos que compõem esta tese, cuja participação foi fundamental para sua qualidade. Finalmente, agradeço a meus colegas cuja ajuda perpassou a redação da obra, ainda que não aparecessem como co-autores de trabalhos.

Os trabalhos apresentados foram desenvolvidos durante meu exercício como Professor Doutor da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, e sou grato também a estas instituições pelas condições dadas para a realização da pesquisa. O Laboratório de Engenharia Bioquímica, em que estou, tem também uma história anterior, essencial para que a pesquisa ocorresse; embora não seja uma instituição em senso estrito, sou grato pelo fato de nele trabalhar. Registro também meus agradecimentos aos órgãos de fomento à pesquisa – FAPESP, CNPq e CAPES, – cujo apoio financeiro foi fundamental para que a pesquisa fosse executada a bom termo.

Enfim, gostaria de agradecer também a pessoas externas à academia: lembro-me aqui principalmente de meus familiares, pelo apoio e pela paciência com o filho, irmão e neto tanta vez ausente. Finalmente, agradeço também àquelas pessoas a quem dedico este trabalho: à Paula, pelo apoio e pela paciência que fazem com que seja um pouco seu o trabalho ao qual seu amor deu alma e ânimo, e ao Francisco, por cedo compreender que a cada manhã devo sair para o que, entre suas primeiras palavras, chama de *o trabalho do papai*: que um dia, ao ler este texto, saiba que também é por seu amor que eu me ausentava. A ambos, mais do que tudo, deve este trabalho o ter sido escrito.



## Resumo

Esta tese apresenta algumas aplicações da Termodinâmica Clássica ao estudo de sistemas de interesse em operações de recuperação e purificação de proteínas, especificamente aqueles relacionados a operações de equilíbrio, como extração e precipitação. Estruturada em capítulos independentes, ela compreende seis estudos relacionados a esta temática geral. O primeiro trabalho descreve a aplicação de uma abordagem diferencial ao cálculo da pressão osmótica em sistemas de múltiplos solventes, no formalismo de Lewis & Randall, apresentando o desenvolvimento matemático e alguns estudos de caso. No segundo trabalho apresenta-se a descrição do equilíbrio líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos formados por copolímeros-bloco PEO-PPO-PEO e carbamato de amônio, estudando-se também a partição de algumas proteínas nestes sistemas. O terceiro trabalho apresenta um estudo sobre o equilíbrio sólido-líquido em sistemas contendo lisozima, sais e água, no qual se aplica uma análise específica aos dados experimentais que permite a determinação da composição da fase sólida. O quarto trabalho compreende um estudo sobre a precipitação de insulina usando dióxido de carbono em altas pressões como agente precipitante ácido, com a aplicação de um modelo termodinâmico adrede desenvolvido. O quinto trabalho apresenta o desenvolvimento de um modelo de energia de Gibbs excedente específico para a modelagem de soluções de polieletrólitos, aplicado na correlação do coeficiente osmótico de soluções de polieletrólitos sintéticos com e sem a adição de sais e no cálculo do equilíbrio líquido-líquido em sistemas aquosos contendo um polieletrólito e um polímero neutro. Finalmente, no último trabalho é apresentada uma nova abordagem para a descrição da curva de solubilidade de proteínas em função do pH, que leva em conta a existência moléculas com diferentes estados de ionização e que permite o cálculo do equilíbrio sólido-líquido a partir da estrutura primária da proteína e das constantes de equilíbrio dos grupos ionizáveis.

**Palavras-chave:** Termodinâmica Química. Equilíbrio líquido-líquido. Equilíbrio sólido-líquido. Modelos matemáticos. Proteínas. Polímeros sintéticos. Sais.

## Abstract

This thesis presents some applications of Classical Thermodynamics to the study of equilibrium operations – such as liquid-liquid extraction and precipitation – of protein downstream processes. It comprises six independent chapters related to this general theme. The first chapter describes the application of a differential approach to the calculation of osmotic pressure in multisolvent systems within the Lewis & Randall framework; it presents the mathematical development and some examples of applications. In the second chapter the liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems formed by PEO-PPO-PEO block copolymers and ammonium carbamate and the partition of some proteins in these systems are described. The third chapter presents a study on the solid-liquid equilibrium of systems containing lysozyme, salts and water, with the application of a specific analysis of experimental equilibrium data which allows the determination of the solid phase composition. The fourth chapter presents a study on the precipitation of insulin using high-pressure carbon dioxide as an acid-precipitating agent, with the application of a thermodynamic model modified for the prediction of the underlying equilibria. The fifth chapter presents the development of an excess Gibbs energy model modified for the description of polyelectrolyte solutions, which was applied in the correlation of osmotic coefficients of polyelectrolyte solutions (with and without the addition of salts) as well as in the modeling of the liquid-liquid equilibrium of aqueous systems containing a polyelectrolyte and a neutral polymer. The last paper presents the development of novel thermodynamic relations for the solubility curves of proteins as a function of pH, which take into account the existence of molecules with different ionization states and allow the calculation of solid-liquid equilibrium from the primary structure of the protein and the equilibrium constants of ionizable groups.

**Keywords:** Chemical Thermodynamics. Liquid-liquid equilibrium. Solid-liquid equilibrium. Mathematical models. Proteins. Synthetic polymers. Salts.

## Sumário

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Sumário	v
1. Introdução	1
1.1. Estrutura da tese	1
1.2. Observações gerais	5
2. Cálculo da pressão osmótica em sistemas de múltiplos solventes por meio de abordagem diferencial	7
2.1. Introdução	7
2.2. Fundamentação teórica	9
2.3. Resultados e discussão	16
2.4. Conclusões	26
2.5. Apêndice A – Expressões auxiliares	26
2.6. Apêndice B – Extensão para múltiplos solutos	27
2.7. Nota adicional	28
2.8. Referências	30
3. Equilíbrio de fases e partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos contendo carbamato de amônio e copolímeros-bloco PEO-PPO-PEO	33
3.1. Introdução	33
3.2. Materiais e métodos	36
3.3. Resultados e discussão	37
3.4. Conclusões	49
3.5. Nota adicional	49
3.6. Referências	51
4. Equilíbrio de fases na precipitação de lisozima por meio da adição de sais	55
4.1. Introdução	55
4.2. Materiais e métodos	59
4.3. Resultados	62

4.4. Conclusões	74
4.5. Nota adicional	75
4.6. Referências	76
5. Precipitação de insulina com dióxido de carbono	81
5.1. Introdução	81
5.2. Materiais e métodos	83
5.3. Modelagem termodinâmica	86
5.4. Resultados e discussão	91
5.5. Conclusões	99
5.6. Nota adicional	100
5.7. Referências	100
6. Modelagem termodinâmica de soluções de polieletrólitos	105
6.1. Introdução	105
6.2. Fundamentação teórica	109
6.3. Resultados e discussão	116
6.4. Conclusões	132
6.5. Nomenclatura	132
6.6. Nota adicional	134
6.7. Referências	135
7. Modelagem termodinâmica da solubilidade de proteínas em função do pH	139
7.1. Introdução	139
7.2. Fundamentação teórica	141
7.3. Resultados e discussão	149
7.4. Conclusões	158
7.5. Nomenclatura	159
7.6. Nota adicional	160
7.7. Referências	161
8. Considerações finais	165

## 1. Introdução

Esta tese de Livre Docência foi escrita com um tema principal: a aplicação de princípios da Termodinâmica Clássica a sistemas de interesse em processos de purificação e recuperação de proteínas.

Conforme o concurso o qual foi escrita (Edital EP/Concursos 001/2011), uma tese de Livre Docência pode ser um trabalho original ou um texto que sistematize criticamente a obra (ou parte dela) do autor; foi esta última minha opção. Este texto é baseado em um conjunto de artigos publicados em periódicos internacionais indexados: *Thermochimica Acta*, *Biochemical Engineering Journal*, *Fluid Phase Equilibria* e *Biotechnology and Bioengineering*. Tais trabalhos foram desenvolvidos por mim mesmo ou por alunos sob orientação e co-orientação; de todos os artigos relacionados eu sou o *corresponding author*, o autor que responde pelo trabalho em sua forma final.

Ainda que unidos por um mesmo motivo condutor, os artigos escolhidos para a composição desta tese não formam um conjunto perfeitamente harmônico, o que é coerente com o fato de serem representativos de uma produção científica não vasta, mas dispersa. Por esta razão, optei por manter, em cada capítulo, a estrutura do artigo que lhe originou, com sua introdução, suas referências e suas conclusões individuais; a única exceção é o Capítulo 4, que aglutina dois artigos inter-relacionados. Escritos originalmente em inglês, os artigos são apresentados vertidos para o português; entretanto, os capítulos não correspondem tão somente à tradução literal dos textos originais, e análises posteriores (incluindo o relacionamento com outras pesquisas realizadas sob minha orientação) foram adicionadas.

### 1.1. Estrutura da tese

Conquanto uma tese devesse ser auto-referenciada, uma pequena introdução sobre o contexto em que os trabalhos foram desenvolvidos pode ajudar a compreender a evolução da pesquisa envolvida – especialmente considerando o caráter heterogêneo e a múltipla autoria dos artigos que originaram cada capítulo. É necessário, até mesmo por razões éticas, esclarecer o papel desempenhado pelos co-autores em cada caso – algo que ainda não é praxe em publicações de Engenharia Química.

O segundo capítulo é oriundo do artigo "*A differential approach to calculating osmotic equilibrium for multisolvent systems*", publicado em 2006 no periódico *Thermochimica Acta*, volume 450, páginas 22-34. O trabalho foi apresentado no 2<sup>nd</sup> *International Symposium on Calorimetry and Chemical Thermodynamics*, e o volume da *Thermochimica Acta* em que foi publicado congrega trabalhos apresentados naquela conferência, submetidos ao processo usual de *peer review*. O tema principal deste capítulo é o cálculo da pressão osmótica, dentro da abordagem de Lewis & Randall, para sistemas com múltiplos solventes. Trata-se do único capítulo desenvolvido inteiramente por mim mesmo; posteriormente, a abordagem foi utilizada na dissertação de mestrado de Anderson Junichi Yano, que estendeu a abordagem para uso com a equação UNIQUAC.

O terceiro capítulo é originado do artigo "*Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous two-phase systems containing ammonium carbamate and block copolymers PEO-PPO-PEO*", que tem como co-autores Mayra Codo de Oliveira e Manoel Américo Nogueira de Abreu Filho. Este artigo foi publicado em 2007 no periódico *Biochemical Engineering Journal*, volume 37, páginas 311-318, e apresenta (como evidente de seu próprio nome) uma investigação do comportamento de fases, incluindo a partição de algumas proteínas, em sistemas aquosos bifásicos contendo copolímeros-bloco PEO-PPO-PEO (F38 e F68) e carbamato de amônio. Trata-se do principal artigo oriundo do projeto de auxílio regular à pesquisa FAPESP 2003/04731-8. Os co-autores deste trabalho foram meus alunos de iniciação científica: Mayra foi bolsista PIBIC-CNPq, e Manoel realizou iniciação científica sem bolsa. Ambos tiveram participação idêntica, e a eles é devido todo o conjunto de dados experimentais. Neste caso, as técnicas experimentais são clássicas na determinação de dados de equilíbrio líquido-líquido, embora não se utilizem modelos de energia de Gibbs excedente para a interpretação dos dados.

O quarto capítulo reúne os artigos "*Phase equilibria for salt-induced lysozyme precipitation: effect of salt type and temperature*" e "*Phase equilibria of lysozyme precipitation with the volatile salt ammonium carbamate*", publicados no periódico *Fluid Phase Equilibria*, respectivamente no volume 281, páginas 32-39, em 2009, e no volume 292, páginas 42-47, em 2010, e têm como co-autores Érika Ohta Watanabe, Éverson Alves Miranda (ambos da Faculdade de Engenharia Química, Unicamp), Gerd Maurer e Ekatherina Popova (ambos da Technische Universität Kaiserslautern). Nele se apresenta

uma investigação sobre o equilíbrio sólido-líquido em sistemas contendo lisozima, sais e água, em conjunto com uma análise sobre a manutenção de atividade enzimática e seu possível relacionamento com o equilíbrio de fases. Este trabalho foi desenvolvido pela então doutoranda Érika Ohta Watanabe, de quem fui o orientador, com a co-orientação do Prof. Éverson Alves Miranda e com participação do Prof. Gerd Maurer, sob cuja supervisão os primeiros ensaios (apresentados em outro artigo não incluído nesta tese) foram realizados. Trata-se de um trabalho conjunto: a Érika foi responsável pela obtenção dos dados experimentais, os professores (principalmente os orientadores) fomos responsáveis pela definição de experimentos, e os quatro fomos responsáveis pela interpretação dos dados e pela redação dos artigos. A co-autoria de Ekatherina Popova é relacionada ao fato de que ela auxiliou os primeiros ensaios realizados pela Érika na TU Kaiserslautern.

O quinto capítulo apresenta um estudo sobre o uso de dióxido de carbono para a precipitação isoelétrica de insulina, e corresponde fundamentalmente ao artigo "*Precipitation of porcine insulin with carbon dioxide*", publicado no periódico *Biotechnology and Bioengineering*, volume 103, páginas 909-919, em 2009, e que tem como autores Alexandre Keiji Tashima (da FEQ-Unicamp), Éverson Alves Miranda, Marcel Ottens, Luuk A. M. van der Wielen (ambos da Delft University of Technology, Holanda), Dennys Corrêa Cintra e José Rodrigo Pauli (ambos da Faculdade de Ciências Médias, Unicamp). Este trabalho foi desenvolvido pelo então doutorando Alexandre Keiji Tashima, orientado pelo Prof. Éverson e co-orientado por mim. Embora ligado a um trabalho em co-orientação (situação única entre os trabalhos que compõem esta tese), sua presença justifica-se pela importância do tratamento termodinâmico no trabalho, área à qual se ligou a atividade de co-orientação; não é por outra razão que sou o *corresponding author* do artigo relacionado. Em sua forma final, trata-se também de um trabalho conjunto: ao Alexandre coube a realização dos experimentos e programação dos modelos termodinâmicos (desenvolvidos em conjunto com este autor); o projeto do equipamento em que se realizaram os experimentos foi feito a seis mãos por ele e seus orientadores. Alguns ensaios preliminares foram realizados na TU Delft (Holanda), com o auxílio dos professores Luuk van der Wielen e Marcel Ottens. Finalmente, ensaios de atividade de insulina, necessários para demonstrar que a técnica não seria danosa à utilização posterior do hormônio, foram conduzidos por Dennys Corrêa Cintra e José Rodrigo Pauli, da Faculdade de Ciências Médias (Unicamp), sob orientação do Prof. Dr.

Lício Augusto Velloso.

O sexto capítulo apresenta um estudo sobre a modelagem termodinâmica de soluções de polieletrólitos. O texto é fundamentalmente oriundo do artigo "*An extension of the Pitzer equation for the excess Gibbs energy of aqueous electrolyte systems to aqueous polyelectrolyte solutions*", publicado no periódico *Fluid Phase Equilibria*, volume 269, páginas 25-35, em 2008, com co-autoria do Prof. Gerd Maurer. Em uma primeira análise, poder-se-ia considerar que este trabalho não está diretamente relacionado à temática da tese – porquanto somente polieletrólitos sintéticos tenham sido estudados. Entretanto, deve-se considerar que polieletrólitos sintéticos são efetivamente usados em processos de purificação de proteínas, por exemplo, como agentes precipitantes, sendo suas soluções sistemas de interesse para tais processos. Além disso, os resultados obtidos podem ser usados na modelagem de soluções de algumas biomoléculas, uma vez que proteínas e DNA são, essencialmente, polieletrólitos. Efetivamente, esta abordagem tem sido investigada para a modelagem de soluções protéicas, embora os resultados ainda sejam preliminares. Embora sua gestação fosse um pouco anterior, este artigo foi terminado em 2007-2008, durante um período de pós-doutorado que realizei na TU Kaiserslautern com bolsa CAPES (processo BEX 2941/07-4).

O último capítulo, como o primeiro, é um estudo mais fundamental sobre a solubilidade de proteínas em função do pH. Trata-se do único capítulo cujos resultados ainda não foram publicados, embora tenham sido enviados à publicação (especificamente ao periódico *Fluid Phase Equilibria*), e corresponde ao trabalho de iniciação científica e mestrado (como aluno especial) de Luís Fernando Mercier Franco; o trabalho também está inserido no contexto do projeto FAPESP 2008/11232-1. A abordagem apresentada baseia-se no cálculo da curva de solubilidade de uma proteína, em função do pH, a partir do cálculo da fração de moléculas protéicas neutras. No contexto do trabalho, retomou-se também uma abordagem desenvolvida por Linderstrøm-Lang e Grönwall, que na primeira metade do século passado propuseram uma descrição para a curva de solubilidade. A ausência de conhecimento mais profundo sobre estruturas protéicas impediu que estes autores chegassem a uma forma mais detalhada da equação, o que foi feito neste trabalho. Foi possível demonstrar que ambas as soluções levam aos mesmos resultados, e que é possível calcular adequadamente a curva de solubilidade em função do pH. Neste caso, deve-se ao Luís Fernando não



somente a programação das rotinas correspondentes, mas também a parte mais substancial da dedução das expressões correspondentes a partir das condições gerais.

## 1.2. Observações gerais

Como dito anteriormente, em virtude da relativa independência de cada tema, optou-se por indicar a bibliografia de cada trabalho após cada capítulo; sua apresentação, entretanto, foi padronizada de modo a garantir o respeito às informações preconizadas na norma técnica brasileira. A estrutura dos capítulos mantém coerência com a estrutura dos artigos que os originaram; assim, por exemplo, a adoção de uma seção de nomenclatura depende de o artigo original ter ou não tal seção.

Em alguns casos, tabelas extensas de dados foram suprimidas do texto final para que a leitura se tornasse mais fluente – isso é o caso, por exemplo, dos conjuntos de dados de equilíbrio de fases nos Capítulos 5 e 6. Menção específica é feita quando isso ocorre: os dados podem ser sempre obtidos do artigo que originou aquele capítulo específico.

Sobre as epígrafes deste trabalho, o haikai de Kobayashi Issa foi traduzido por Paulo Franchetti e Elza Taeko Doi; a citação de Jorge Luis Borges, retirada do conto *Abenjacan, o Bokari, morto no seu labirinto*, do livro *O Aleph*, foi traduzida por Flávio José Cardozo.

Esta tese foi escrita utilizando-se a grafia “antiga”, ou seja, anterior ao Acordo Ortográfico de 1990: a transição para a nova ortografia completar-se-á somente em 2012, vigendo ambas até então (conforme o Decreto 6583 de 29 de setembro de 2008).



## **2. Cálculo da pressão osmótica em sistemas de múltiplos solventes por meio de abordagem diferencial**

### **Resumo**

Neste capítulo apresenta-se uma abordagem diferencial para o cálculo da pressão osmótica em sistemas de múltiplos solventes conforme o formalismo de Lewis & Randall. A relação entre a pressão osmótica e a composição do sistema é estabelecida por meio de equações diferenciais exatas que descrevem caminhos em que o potencial químico dos solventes é mantido constante, e essas equações são resolvidas numericamente. Embora não seja possível obter uma expressão analítica para a pressão osmótica sequer para o caso de uma solução ideal, o sistema de equações diferenciais não apresentou dificuldades numéricas em sua resolução. São descritos exemplos do uso da metodologia proposta considerando, para a energia de Gibbs excedente, as equações de Margules de um parâmetro e de Flory-Huggins, o que permite a avaliação da influência da não-idealidade da fase líquida no desempenho do método – e mostra que ela pode ser usada mesmo em casos em que haja separação de duas fases líquidas.

### **2.1. Introdução**

Existe uma ampla variedade de sistemas em que ocorre o equilíbrio osmótico, não somente em diversos campos da indústria química, mas também em áreas aparentemente não relacionadas, o que torna desnecessário frisar o quão significativo é o fenômeno em si. Entretanto, especificamente para a modelagem termodinâmica, a descrição do equilíbrio osmótico é importante pelo fato de que ela pode ocorrer como etapa intermediária em cálculos de equilíbrio de fases. Por exemplo, o uso de modelos baseados no formalismo de McMillan & Mayer [1] para o cálculo de equilíbrio líquido-líquido subentende a igualdade da pressão osmótica como condição necessária [2].

Além dos sistemas em que efetivamente ocorre a osmose, diversos tipos de misturas podem ser descritos como um soluto dissolvido em um meio – seja uma substância pura ou uma mistura; por exemplo, um eletrólito em uma solução aquosa, uma proteína em uma solução aquosa salina. Se houver um processo subjacente ao cálculo, o papel dos constituintes do sistema (solutos ou solventes) depende do processo

em si. Apenas para apresentar um exemplo, no processamento osmótico de alimentos, a água é usualmente considerada o único solvente, e todas as substâncias solúveis, solutos [3]. Entretanto, para o propósito de descrever o estado termodinâmico de um sistema, pode haver um certo grau de arbitrariedade (uma vez que não há um equilíbrio osmótico real subjacente), e a escolha de quais compostos sejam solutos ou solventes depende de qual modelo será usado para descrever o sistema. Por exemplo, eletrólitos são considerados solventes quando dissolvidos em uma solução de aquosa alcoólica, e as propriedades (por exemplo, a permissividade do meio) necessárias ao cálculo do termo de longo alcance dos modelos de energia de Gibbs excedente podem ser consideradas como uma média entre aquelas de água e álcool [4,5]. Entretanto, eletrólitos são considerados co-solventes no estudo do comportamento de proteínas em solução aquosa contendo sais [2].

Cálculos de equilíbrio osmótico em sistemas de múltiplos solventes são comuns no contexto de descrições de propriedades de solução no formalismo de McMillan & Mayer. Esse tipo de abordagem tem recebido atenção crescente devido a seu uso na descrição do comportamento de fases de soluções protéicas [6-9]: uma vez que é muito difícil realizar simulações do tipo Monte Carlo ou de Dinâmica Molecular levando em conta todas as espécies presentes, considera-se que todas as substâncias (exceto a proteína) constituem o *solvente*, cujas propriedades são calculadas como uma média ponderada das propriedades dos compostos que o constituem. Outro campo em que essa abordagem é fundamental é a descrição de soluções salinas em sistemas de múltiplos solventes. A partir do trabalho pioneiro de Cardoso e O'Connell [4], muitos dos trabalhos publicados nesta área relacionam-se à conversão entre os formalismos de McMillan & Mayer e de Lewis & Randall [5-10]. Independentemente de qualquer aspecto teórico, entretanto, modelos em ambos os formalismos são largamente encontrados na literatura [11].

Uma metodologia para o cálculo do equilíbrio osmótico conforme o formalismo de Lewis & Randall é apresentada neste trabalho. Equações diferenciais que relacionam a pressão e a composição são obtidas e resolvidas numericamente para sistemas-modelos. Usando a abordagem apresentada, não somente o estado de equilíbrio osmótico pode ser calculado (o que seria possível de ser realizado resolvendo-se as condições de equilíbrio), mas também a curva de pressão osmótica em função da concentração de soluto pode ser obtida. A abordagem é completamente geral e,

portanto, pode ser utilizada para calcular o equilíbrio osmótico para qualquer sistema cuja descrição seja feita neste formalismo.

## 2.2. Fundamentação teórica

Na modelagem termodinâmica de soluções, é comum distinguirem-se dois diferentes tipos de descrição: as abordagens de Lewis & Randall e de McMillan & Mayer. O formalismo de Lewis & Randall corresponde à descrição clássica de misturas: expressões para a energia de Gibbs excedente são desenvolvidas nesse contexto. As variáveis independentes que definem um estado termodinâmico, nesse caso, são temperatura, pressão e composição, e o potencial químico (ou a atividade) de cada espécie pode ser obtido como função dessas variáveis independentes por meio de diferenciação adequada. Por outro lado, no formalismo de McMillan & Mayer, uma solução é descrita como uma coleção de moléculas de soluto em um meio contínuo: o solvente (puro ou mistura) é considerado simplesmente como o meio no qual ocorrem as interações entre moléculas de solutos. Neste formalismo, modelos são constituídos por uma transformação de Legendre da energia de Helmholtz e têm como variáveis independentes o volume, as frações de soluto e o potencial químico do solvente: o potencial químico do soluto e a pressão osmótica podem ser obtidas por diferenciação adequada. Uma das características mais importantes a serem salientadas é que o formalismo de Lewis & Randall não estabelece nenhuma distinção *a priori* entre solutos e solventes (quando expressões assimétricas para a energia de Gibbs são utilizadas, essa distinção é introduzida pelo modelo), enquanto o formalismo de McMillan & Mayer subentende uma distinção inequívoca entre eles. Embora o assunto desse trabalho – o cálculo da pressão osmótica – seja comumente relacionado ao formalismo de McMillan & Mayer, todo o desenvolvimento será baseado em modelos de energia de Gibbs desenvolvidos no formalismo de Lewis & Randall.

Consideremos um sistema com composição  $\xi'_S$ , com  $i = 1, \dots, n$  (em que  $S$  representa os solventes e  $\xi$  representa alguma fração, por exemplo, mássica, volumétrica ou numérica) e  $\xi'_R$  (em que  $R$  representa o soluto), separado de outro sistema contendo apenas os solventes, por meio de uma membrana semipermeável que permite a passagem de moléculas de solvente, mas não de soluto. Um esquema geral desse equilíbrio é apresentado na Figura 2.1; a célula A é chamada “solução interna” e a célula B, “solução externa” [2]. O equilíbrio pode se estabelecer se houver uma diferença

de pressão entre as duas soluções; a condição de equilíbrio, além da igualdade de temperaturas em ambas as fases, será:

$$\mu'_{S_i}(T, p', \xi'_{S_i}, \xi'_R) = \mu''_{S_i}(T, p'', \xi''_{S_i}, \xi''_R = 0) \quad , i = 1, \dots, n \quad (2.1)$$

em que  $\mu_i$  é o potencial químico do composto  $i$ . Um método possível de resolver esse sistema de equações seria simplesmente modificar algoritmos já existentes de cálculo de equilíbrio líquido-líquido. A complexidade introduzida pela consideração da pressão como variável não é, em si mesmo, muito grande, mas a convergência poderia ser mais lenta em virtude da pouca sensibilidade da fase líquida a mudanças na pressão (quando distante de condições críticas).

Célula A	Célula B
$\xi'_{S_i}, i = 1, \dots, n$	$\xi''_{S_i}, i = 1, \dots, n$
$\xi'_R$	$\xi''_R = 0$
$p'$	$p''$
$T$	$T$

Figura 2.1. Esquema geral de uma célula de equilíbrio osmótico em um sistema de múltiplos solventes.

Uma solução alternativa pode ser obtida pela consideração de que, no espaço de variáveis  $(\xi, p)$ , ambos os estados pertencem a um subespaço em que:

$$\mu'_{S_i}(T, p', \xi'_{S_i}, \xi'_R) = \mu_{S_i}(T, p, \xi_{S_i}, \xi_R) \quad (2.2)$$

Cada célula é especificada por  $n+2$  variáveis: temperatura, pressão e  $n$  frações (lembrando que o número total de componentes é  $n+1$ ). Portanto, para ambas as células o número total de variáveis independentes é  $2n+4$ . As condições de equilíbrio impõem a igualdade de temperatura e potencial químico de cada solvente em ambas as células, resultando em  $n+1$  equações restritivas. Assim, o número total de graus de liberdade é de  $n+3$ . A composição, temperatura e pressão da célula A são definidas *a priori*, diminuindo os graus de liberdade para 1: uma vez que a fração de soluto na célula B seja determinada ( $\xi''_R = 0$ ), o problema está completamente definido (por hipótese, a pressão  $p'$  é suficientemente alta para que a pressão  $p''$  seja estritamente positiva). Embora a

pressão osmótica seja calculada quando a fração de soluto na célula B se anula, o problema é matematicamente bem determinado para qualquer outro valor de  $\xi_R''$ .

Assim, usando a fração de soluto  $\xi_R$  como parâmetro, a equação (2.2) define um subespaço em que:

$$\frac{d\mu_{S_i}}{d\xi_R} = 0 \quad (2.3)$$

Como dito anteriormente, no formalismo de Lewis & Randall o potencial químico de qualquer espécie (solvente ou soluto) pode ser expresso como função de temperatura, pressão e composição. Assim, essa equação pode ser reescrita como:

$$d\mu_{S_i} = \sum_{j=1}^n \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial \xi_{S_j}} \right)_{T,p,[\xi]} d\xi_{S_j} + \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial p} \right)_{T,[\xi]} dp = 0 \quad (2.4)$$

Para evitar o uso excessivo de índices, o subscrito  $[\xi]$  é usado para indicar que somente as frações pertinentes são mantidas constantes em cada derivação – ou seja, todas as frações usadas para definir o estado *exceto* a fração com respeito à qual a derivada é calculada. Deve-se também considerar a restrição:

$$\sum_{j=1}^n d\xi_{S_j} + d\xi_R = 0 \quad (2.5)$$

Escolha-se arbitrariamente um dos solventes para ser usado como referência, e cuja composição será eliminada usando a equação (2.5); chamando-se  $S_k$  este solvente de referência, o seguinte conjunto de equações é obtido:

$$\sum_{j=1, j \neq k}^n \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial \xi_{S_j}} \right)_{T,p,[\xi]} - \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial \xi_{S_k}} \right)_{T,p,[\xi]} \right) d\xi_{S_j} - \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial \xi_{S_k}} \right)_{T,p,[\xi]} d\xi_R + \bar{V}_{S_i} dp = 0 \quad (2.6)$$

Na curva de equilíbrio

$$\sum_{j=1, j \neq k}^n \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial \xi_{S_j}} \right)_{T,p,[\xi]} - \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial \xi_{S_k}} \right)_{T,p,[\xi]} \right) \frac{d\xi_{S_j}}{d\xi_R} + \bar{V}_{S_i} \frac{dp}{d\xi_R} = \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial \xi_{S_k}} \right)_{T,p,[\xi]} \quad (2.7)$$

Este é um sistema de  $n$  equações diferenciais com  $n$  funções. A equação (2.7) descreve uma cadeia de células osmóticas com diferenças infinitesimais na concentração de soluto. Assim, para uma certa composição e pressão, é possível determinar como a composição e a pressão devem variar em um caminho no qual o potencial químico de todas as espécies seja mantido constante. A derivada da fração do composto  $S_k$  pode ser calculada pela equação seguinte:

$$\frac{d\xi_{S_k}}{d\xi_R} = - \sum_{j=1, j \neq k}^n \frac{d\xi_{S_j}}{d\xi_R} - 1 \quad (2.8)$$

A partir das condições da solução interna, é possível calcular por integração numérica a composição da solução externa e obter uma função  $\Pi(\xi_R)$ . Este é um problema de valor de contorno, uma vez que o valor de  $\Pi(\xi'_R)$  não é conhecido. Entretanto, se os volumes parciais puderem ser considerados independentes da pressão – o que é uma hipótese razoável para a maioria das soluções líquidas – o conjunto resultante de equações é um problema de valor inicial. Este tipo de metodologia, em que se definem equações diferenciais que devem ser satisfeitas em um caminho formado por estados de equilíbrio, é conhecido como *abordagem diferencial* [12].

### 2.2.1. Estudo de sistemas ternários

Consideremos inicialmente um sistema ternário composto por um único soluto e dois solventes ( $S_1$  e  $S_2$ ). Nesse caso, obtém-se o seguinte conjunto de equações:

$$d\mu_{S_1} = \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} d\xi_{S_1} + \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} d\xi_{S_2} + \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial p} \right)_{T,\xi_{S_1},\xi_{S_2}} dp = 0 \quad (2.9)$$

$$d\mu_{S_2} = \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} d\xi_{S_1} + \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} d\xi_{S_2} + \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial p} \right)_{T,\xi_{S_1},\xi_{S_2}} dp = 0 \quad (2.10)$$

Seguindo o procedimento previamente delineado, consideremos o solvente  $S_1$  como referência. Assim:

$$\left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} (-d\xi_{S_2} - d\xi_R) + \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} d\xi_{S_2} + \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial p} \right)_{T,\xi_{S_1},\xi_{S_2}} dp = 0 \quad (2.11)$$

$$\left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} (-d\xi_{S_2} - d\xi_R) + \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} d\xi_{S_2} + \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial p} \right)_{T,\xi_{S_1},\xi_{S_2}} dp = 0 \quad (2.12)$$

Rearranjando:

$$\left( \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} - \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} \right) d\xi_{S_2} - \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} d\xi_R + \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial p} \right)_{T,\xi_{S_1},\xi_{S_2}} dp = 0 \quad (2.13)$$

$$\left( \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} - \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} \right) d\xi_{S_2} - \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} d\xi_R + \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial p} \right)_{T,\xi_{S_1},\xi_{S_2}} dp = 0 \quad (2.14)$$



Dessas equações resultam:

$$dp = -\frac{1}{\bar{V}_{S_1}} \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} - \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} \right) d\xi_{S_2} + \frac{1}{\bar{V}_{S_1}} \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} d\xi_R \quad (2.15)$$

$$dp = -\frac{1}{\bar{V}_{S_2}} \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} - \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} \right) d\xi_{S_2} + \frac{1}{\bar{V}_{S_2}} \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} d\xi_R \quad (2.16)$$

em que  $\bar{V}_i$  é o volume parcial do componente  $i$ . Assim, acoplando as equações anteriores:

$$\frac{d\xi_{S_2}}{d\xi_R} = \frac{\frac{1}{\bar{V}_{S_2}} \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} - \frac{1}{\bar{V}_{S_1}} \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}}}{\frac{1}{\bar{V}_{S_1}} \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} - \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} \right) + \frac{1}{\bar{V}_{S_2}} \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} - \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} \right)} \quad (2.17)$$

Para o composto  $S_1$ , obtém-se:

$$\frac{d\xi_{S_1}}{d\xi_R} = \frac{\frac{1}{\bar{V}_{S_1}} \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} - \frac{1}{\bar{V}_{S_2}} \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}}}{\frac{1}{\bar{V}_{S_1}} \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} - \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} \right) + \frac{1}{\bar{V}_{S_2}} \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} - \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} \right)} \quad (2.18)$$

A derivada da pressão pode ser calculada indistintamente por qualquer uma das equações anteriores:

$$\frac{dp}{d\xi_R} = -\frac{1}{\bar{V}_{S_1}} \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} - \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} \right) \frac{d\xi_{S_2}}{d\xi_R} + \frac{1}{\bar{V}_{S_1}} \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} \quad (2.19)$$

que pode ser simplificada por:

$$\frac{dp}{d\xi_R} = \frac{\frac{1}{\bar{V}_{S_1} \bar{V}_{S_2}} \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} - \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} \right)}{\frac{1}{\bar{V}_{S_1}} \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} - \left( \frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} \right) + \frac{1}{\bar{V}_{S_2}} \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_2}} \right)_{T,p,\xi_{S_1}} - \left( \frac{\partial \mu_{S_2}}{\partial \xi_{S_1}} \right)_{T,p,\xi_{S_2}} \right)} \quad (2.20)$$

A expressão acima não depende (como não deveria depender) de qual composto é escolhido como referência.

### 2.2.2. Hipóteses simplificadoras

Consideremos que uma expressão para o potencial químico seja conhecida:

$$\mu_i(T, p, \xi) = \mu_i^{ref}(T, p^{ref}, \xi^{ref}) + RT \ln a_i(T, p, \xi) \quad (2.21)$$

em que  $a_i$  é a atividade do composto  $i$ . É procedimento usual separar a atividade em duas contribuições:

$$a_i(T, p, \xi) = a_i^{PI}(T, \xi) \cdot a_i^{PD}(T, p, \xi) \quad (2.22)$$

A contribuição independente da pressão (PI) é aquela usualmente obtida a partir de modelos de energia de Gibbs excedente, e a contribuição dependente da pressão (PD) é dada por:

$$a_i^{PD}(T, p, \xi) = \exp\left(\int_{p^{ref}}^p \frac{\bar{V}_i}{RT} dp\right) \quad (2.23)$$

Essa contribuição é usualmente desconsiderada em cálculos de equilíbrio em baixas pressões (tanto líquido-líquido quanto líquido-vapor), mas deve ser considerada em cálculos de pressão osmótica. Outra hipótese simplificadora usual é a consideração de que o volume parcial seja independente da pressão; far-se-á aqui também a hipótese de que seja independente da composição (ou seja, o volume excedente é nulo). Assim, obtém-se para o composto  $S_1$  em um sistema ternário, por exemplo:

$$\left(\frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial \xi_{S_1}}\right)_{\xi_{S_2}, p} = RT \left(\frac{\partial \ln a_{S_1}^{PI}}{\partial \xi_{S_1}}\right)_{\xi_{S_2}} \quad (2.24)$$

$$\left(\frac{\partial \mu_{S_1}}{\partial p}\right)_{\xi_{S_1}, \xi_{S_2}} = \bar{V}_{S_1} \quad (2.25)$$

e similarmente para o composto  $S_2$ . Como dito anteriormente, com essas hipóteses o problema de valores de contorno é transformado em um problema de valor inicial, permitindo uma integração direta.

### 2.2.3. A equação de Gibbs-Duhem

Para uma transformação não-isobárica, a equação de Gibbs-Duhem pode ser escrita:

$$x_R d\mu_R + \sum_{i=1}^n x_{S_i} d\mu_{S_i} = V dp \quad (2.26)$$

em que  $x_i$  é a fração numérica do composto  $i$  e  $V$  é o volume por quantidade de matéria da mistura. Em um caminho definido pela equação (2.7), não haverá alteração no potencial químico do solvente. Portanto:

$$x_R d\mu_R = V dp \quad (2.27)$$

Uma vez que  $\mu_R$ ,  $V$  e  $p$  são funções de  $x_R$ , a equação (2.27) pode, em princípio, ser integrada. Considerando a expressão geral para o potencial químico, equação (2.21), obtém-se:

$$\int_{\mu_R(x_R \rightarrow 0)}^{\mu_R(x_R)} x_R d\mu_R = \int_0^{x_R} V \frac{dp}{dx_R} dx_R \quad (2.28)$$

O termo direito desta equação pode ser calculado a partir da equação (2.27), enquanto o termo esquerdo da equação pode ser calculado por:

$$\int_{\mu_R(x_R \rightarrow 0)}^{\mu_R(x_R)} x_R d\mu_R = x_R \mu_R \Big|_{x_R \rightarrow 0}^{x_R} - \int_0^{x_R} \mu_R dx_R = x_R RT \ln a_R - RT \int_0^{x_R} \ln a_R dx_R \quad (2.29)$$

Esta equação deve ser verificada não somente para a composição da solução interna, mas também para qualquer composição intermediária no caminho de integração. Embora seja tentador simplificá-las, estas equações devem ser calculadas numericamente, pois o caminho de integração não é conhecido *a priori*. Além disso, não se pode esquecer que a atividade, nesta equação, inclui o termo dependente da pressão conforme a equação (2.22). A equação (2.29), portanto, pode ser utilizada para verificar se o caminho calculado pela equação (2.7) corresponde efetivamente a um caminho em que o potencial químico do solvente permanece constante.

#### 2.2.4. Implementação

O conjunto de equações diferenciais definido pela equação (2.7) foi resolvido usando o método de Runge-Kutta de quarta ordem, com o auxílio da linguagem de programação Maple™. Os resultados finais foram verificados tanto pelo critério de equilíbrio osmótico definido pela equação (2.1) quanto pela aplicação da equação de Gibbs-Duhem para todo o caminho de integração. Todos os cálculos foram realizados com a precisão padrão do programa, mas por questão de clareza somente 4 dígitos significativos são apresentados no texto que se segue.

### 2.3. Resultados e discussão

A metodologia aqui apresentada foi usada no cálculo do equilíbrio osmótico em sistemas em fase líquida cuja não-idealidade era descrita por diversos modelos de  $G^{EX}$  (especificamente, Margules, Flory-Huggins, Wilson, NRTL e UNIQUAC), com eficácia similar. Como o objetivo do trabalho é o estabelecimento da metodologia, resultados para sistemas hipotéticos (usados como modelo) são apresentados em primeiro lugar; resultados para um sistema real (uma proteína em solução polimérica, descrita pela equação de Flory-Huggins) são apresentados posteriormente.

#### 2.3.1. Solução ternária ideal

As equações anteriores tornam-se bastante simples na descrição de uma fase líquida constituída por uma solução ideal, mas sequer neste caso é possível obter uma solução analítica para a composição da solução externa. Defina-se  $\xi$  como a fração numérica, e seja  $V_i$  o volume da espécie  $i$  pura. Deste modo:

$$\frac{dx_{S_1}}{dx_R} = -\frac{x_{S_1} V_{S_1}}{x_{S_1} V_{S_1} + x_{S_2} V_{S_2}} \quad (2.30)$$

e, analogamente:

$$\frac{dx_{S_2}}{dx_R} = -\frac{x_{S_2} V_{S_2}}{x_{S_1} V_{S_1} + x_{S_2} V_{S_2}} \quad (2.31)$$

Para a pressão, a seguinte equação é obtida.

$$\frac{dp}{dx_R} = \frac{RT}{x_{S_1} V_{S_1} + x_{S_2} V_{S_2}} \quad (2.32)$$

Pode-se perceber que nem mesmo nesta situação uma solução analítica geral pode ser obtida. Entretanto, a mesma impossibilidade também ocorre para a formulação dada pela equação (2.1). Resultados numéricos para cálculos envolvendo soluções ternárias ideais são apresentados na próxima seção como casos triviais da equação de Margules.

#### 2.3.2. Soluções ternárias não-ideais - a equação de Margules

Para avaliar como a não-idealidade da mistura líquida afetaria o desempenho da metodologia proposta, considerou-se uma solução cuja não-idealidade fosse dada pela equação de Margules de um parâmetro. Embora este modelo não seja largamente empregado em cálculos de equilíbrio de fases, ele é a expressão mais simples de energia

de Gibbs excedente que contempla a não idealidade da fase líquida. Uma vez que o objetivo do trabalho é a investigação da metodologia em si, conclusões gerais são aplicáveis independentemente desta escolha.

A expressão para a energia de Gibbs excedente ( $G^{EX}$ ) para uma mistura de solventes  $S_1$  e  $S_2$  e um soluto  $R$  é dada por:

$$\frac{G^{EX}}{RT} = A_{S_1R} x_{S_1} x_R + A_{S_2R} x_{S_2} x_R + A_{S_1S_2} x_{S_1} x_{S_2} \quad (2.33)$$

em que  $A_{ij}$  é o parâmetro ajustável relacionado aos compostos  $i$  e  $j$ . As derivadas pertinentes são apresentadas no Apêndice A.

Para caracterizar mais adequadamente a mistura de solventes, define-se a fração livre de soluto ( $y_{S_1}$ ) pela equação:

$$y_{S_1} = \frac{x_{S_1}}{x_{S_1} + x_{S_2}} \quad (2.34)$$

Alguns exemplos de cálculos de equilíbrio osmótico são apresentados na Tabela 2.1, considerando  $V_{S_1} = 18,0 \text{ cm}^3\text{mol}^{-1}$  e  $V_{S_2} = 200,0 \text{ cm}^3\text{mol}^{-1}$ . Estes resultados permitem uma análise direta da influência dos parâmetros (e, portanto, da não-idealidade) na pressão osmótica calculada e na composição da célula externa. Por exemplo, para os sistemas 1 a 4 da Tabela 2.1, os desvios positivos do comportamento ideal entre os solventes, relacionados a valores mais altos do parâmetro  $A_{S_1S_2}$  na equação (2.33), resultam em concentrações menores do solvente com menor volume ( $S_1$ ) na célula de equilíbrio, enquanto desvios negativos levam a concentrações maiores. Para os sistemas 5 a 8, pode-se inferir que desvios positivos do comportamento ideal entre um soluto e um dos solventes aumentam a concentração deste solvente na célula de equilíbrio, enquanto desvios negativos resultam em decréscimo nesta concentração. Embora tais resultados pareçam não indicar diferenças expressivas na composição da célula externa, a situação muda significativamente quando desvios altamente positivos do comportamento ideal estão presentes: o sistema 9, em que os solventes estão próximos da miscibilidade parcial, apresenta desvios elevados na composição da célula de equilíbrio e na pressão osmótica calculada. Diferenças grandes do comportamento ideal também podem ser observadas para frações de soluto elevadas, como nos sistemas 10 e 11; mesmo para o comportamento ideal mostrado no sistema 10, a hipótese de que a proporção entre os solventes seja constante (em ambas as células) não refletiria os

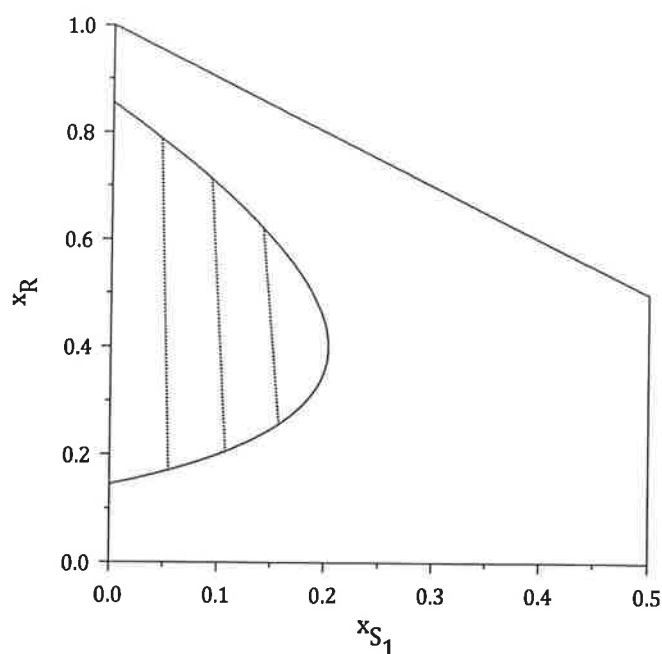
resultados dos cálculos. No que diz respeito à metodologia em si, além do fato de que estes equilíbrios puderam ser diretamente calculados, outra característica significativa do procedimento é que o tempo computacional não é sensível à não-idealidade da mistura.

**Tabela 2.1.** Resultados para a pressão osmótica calculada para sistemas descritos pela equação de Margules a 298,15 K.

Sistema	$A_{S_1S_2}$	$A_{S_1R}$	$A_{S_2R}$	$x'_R$	$y'_{S_1}$	$x''_{S_1}$	$\Pi$ / bar
1	0,0	0,0	0,0	0,02	0,5	0,4916	4,563
2	0,5	0,0	0,0	0,02	0,5	0,4888	4,563
3	1,0	0,0	0,0	0,02	0,5	0,4833	4,554
4	-1,0	0,0	0,0	0,02	0,5	0,4944	4,551
5	0,0	1,0	0,0	0,02	0,5	0,4966	4,544
6	0,0	-1,0	0,0	0,02	0,5	0,4866	4,559
7	0,0	0,0	1,0	0,02	0,5	0,4868	4,470
8	0,0	0,0	-1,0	0,02	0,5	0,4964	4,635
9	1,9	0,0	0,0	0,02	0,5	0,3865	4,188
10	0,0	0,0	0,0	0,1	0,5	0,4576	23,14
11	1,0	0,0	0,0	0,1	0,5	0,4173	22,93

Para verificar se esta abordagem é aplicável também para situações em que haja separação de fases líquidas, foi considerado um sistema hipotético com o comportamento de fases presente na Figura 2.2. Os parâmetros da equação de Margules deste sistema são  $A_{S_1R} = 0,5$ ,  $A_{S_2R} = 2,5$  e  $A_{S_1S_2} = 0,20$ , e os volumes dos componentes puros são os mesmos dos exemplos anteriores. Os resultados para o equilíbrio osmótico calculado para as três composições de equilíbrio mostradas nesta figura são apresentados na Tabela 2.2. Em todos os casos, a pressão osmótica calculada e a composição da célula de equilíbrio são iguais (no limite da precisão numérica). Uma vez que se considerou que os volumes parciais não dependiam da composição, este resultado poderia ter sido antecipado diretamente a partir da equação (2.1). No que diz respeito à metodologia em si, estes resultados sugerem que ela pode ser usada em situações em que ocorra separação de fases: uma vez que nenhuma restrição é feita

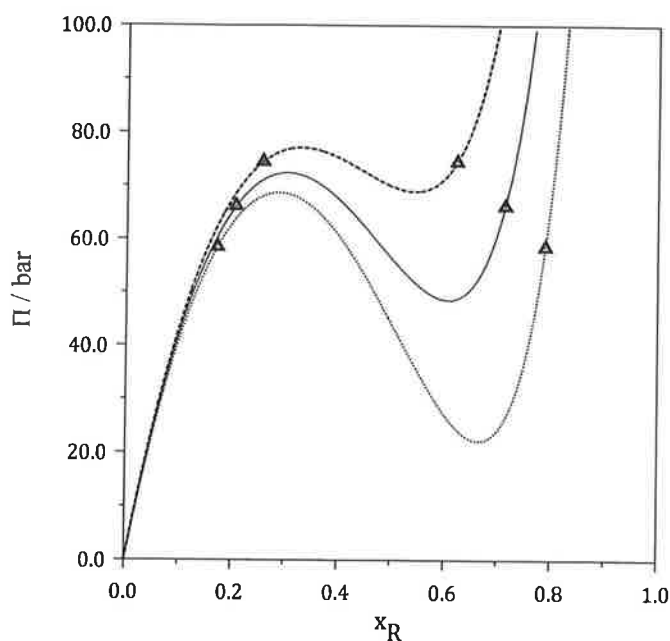
sobre a estabilidade ao longo do caminho de integração, sistemas instáveis podem nele existir. Neste caso, a analogia com a curva gerada por uma equação volumétrica de estado segue-se diretamente: na Figura 2.3, a pressão osmótica para sistemas com potencial químico constante são apresentadas, e cada curva apresenta um dos sistemas descrito na Tabela 2.2.



**Figura 2.2.** Equilíbrio de fases em um sistema hipotético formado por um soluto parcialmente solúvel em um solvente. Linha contínua – curva binodal, linhas tracejadas – linhas de amarração.

**Tabela 2.2.** Resultados para cálculos de pressão osmótica em sistemas apresentado equilíbrio líquido-líquido a 298,15 K: soluto parcialmente solúvel em um dos solventes

Sistema	Fase	$x'_R$	$x'_{S_1}$	$x''_{S_1}$	$\Pi$ / bar
12	I	0,1712	0,05452	0,04289	58,48
	II	0,7885	0,04533	0,04289	58,48
13	I	0,2060	0,1072	0,08319	66,09
	II	0,7132	0,09219	0,08319	66,09
14	I	0,2567	0,1575	0,1210	74,41
	II	0,6216	0,1413	0,1210	74,41



**Figura 2.3.** Pressão osmótica para sistemas com potencial químico de solvente constante. Curva tracejada – curva para o sistema 12 (conforme Tabela 2.2), linha contínua – curva para o sistema 13, e linha pontilhada – curva para o sistema 14. Símbolos (triângulos): pontos de equilíbrio.

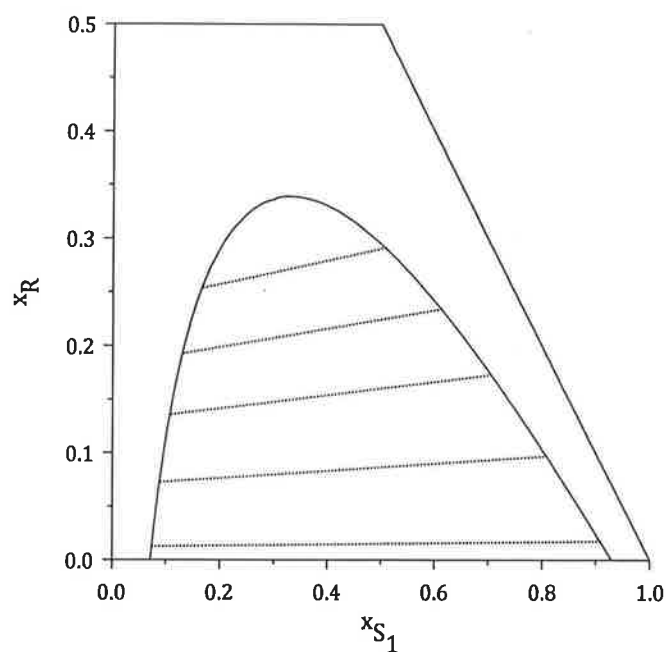
Entretanto, resultados diversos são obtidos quando os solventes apresentam miscibilidade parcial. Um exemplo pode ser dado pela equação de Margules com parâmetros  $A_{S_1R} = 0,1$ ,  $A_{S_2R} = 0,5$  e  $A_{S_1S_2} = 3,0$ , cuja curva de equilíbrio é apresentada na Figura 2.4; resultados para o cálculo de equilíbrio osmótico para as composições de equilíbrio mostradas nesta figura são apresentadas na Tabela 2.3. Nem a pressão osmótica calculada nem a composição da célula externa são as mesmas – elas tampouco correspondem às composições de equilíbrio para um sistema livre de solvente: estas composições seriam  $x_{S_1}^I = 0,9293$  e  $x_{S_1}^{II} = 0,07072$ . Uma análise mais cuidadosa mostra que a composição da célula externa rica no solvente  $S_1$  encontra-se na região de duas fases do diagrama, e naturalmente separar-se-ia em duas fases líquidas. Este fato não seria um problema na descrição de sistemas reais, uma vez que nestas condições o par  $S_1$  e  $S_2$  dificilmente seria considerado *a priori* como um solvente composto. Entretanto, este exemplo mostra que é necessário ter cuidado na modelagem de sistemas em que o papel dos compostos constituintes é arbitrário – deve-se frisar que, em princípio, todas as hipóteses subjacentes ao desenvolvimento teórico são satisfeitas. Este resultado não significa que seja impossível estabelecer um equilíbrio osmótico com sistemas com tais



composições, uma vez que o critério de igualdade de potenciais químicos mostra que o equilíbrio calculado para a outra fase satisfaz as condições de equilíbrio da equação (2.1).

**Tabela 2.3.** Resultados para a pressão osmótica calculada para sistemas com separação de fases líquidas a 298,15 K, solventes parcialmente miscíveis.

Sistema	Fase	$x'_R$	$x'_{S_1}$	$x''_{S_1}$	$\Pi$ / bar
15	I	0,001170	0,9279	0,9291	1,311
	II	0,0008302	0,07089	0,07062	0,4297
16	I	0,002339	0,9265	0,9288	2,622
	II	0,001661	0,07105	0,07052	0,8595
17	I	0,01050	0,9166	0,9273	11,79
	II	0,007490	0,07224	0,06983	3,869



**Figura 2.4.** Diagrama de equilíbrio de fases para um sistema hipotético formado por dois solventes parcialmente miscíveis. Curva contínua – curva binodal, linhas tracejadas – linhas de amarração.

### 2.3.3. Soluções ternárias não-ideais – a equação de Flory-Huggins

Um teste mais severo para esta metodologia seria uma situação em que houvesse um grande desvio do comportamento ideal devido não somente a interações específicas entre os componentes, mas também a diferenças entre os volumes por quantidade de matéria. Para verificar este fato, a equação de Flory-Huggins, que leva em conta estas diferenças, pode ser considerada:

$$\frac{G^{EX}}{RT} = x_{S_1} \ln \frac{\phi_{S_1}}{x_{S_1}} + x_{S_2} \ln \frac{\phi_{S_2}}{x_{S_2}} + x_R \ln \frac{\phi_R}{x_R} + \frac{(x_{S_1} V_{S_1} + x_{S_2} V_{S_2} + x_R V_R)}{V_{ref}} (\chi_{S_1 S_2} \phi_{S_1} \phi_{S_2} + \chi_{S_1 R} \phi_{S_1} \phi_R + \chi_{S_2 R} \phi_{S_2} \phi_R) \quad (2.35)$$

em que  $\phi_i$  é a fração volumétrica do composto  $i$  e  $\chi_{ij}$  é o parâmetro de interação entre os compostos  $i$  e  $j$ . As derivadas pertinentes da equação de Flory-Huggins são apresentadas no Apêndice A; elas são escritas em termos de frações volumétricas, que podem ser calculadas mais facilmente neste caso.

Os parâmetros da equação foram escolhidos de modo a que ela pudesse reproduzir qualitativamente o comportamento da albumina de soro bovino (BSA) em soluções aquosas de polietileno glicol (PEG) de tamanho de cadeia  $6000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Considerou-se  $S_1$  o polímero ( $V_{S_1} = 5000,0 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $S_2$  a água ( $V_{S_2} = 18,0 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e  $R$  a proteína ( $V_R = 60000,0 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ ), e os seguintes parâmetros foram usados:  $\chi_{S_2 R} = 0,44$  (como sugerido por Guo et al. [13]),  $\chi_{S_1 S_2} = 0,37$  (obtido pelo ajuste de dados de atividade de água de Großmann et al. [14]), e  $\chi_{S_1 R} = 0,00$  (uma vez que este parâmetro deve ser pequeno, mas não há informação confiável sobre seu valor). A água foi escolhida como composto de referência.

A equação de Gibbs-Duhem pode ser transformada de modo a eliminar o cálculo de frações numéricas. A equação (2.27) pode assim ser reescrita:

$$\phi_R d\mu_R = V_R dp \quad (2.36)$$

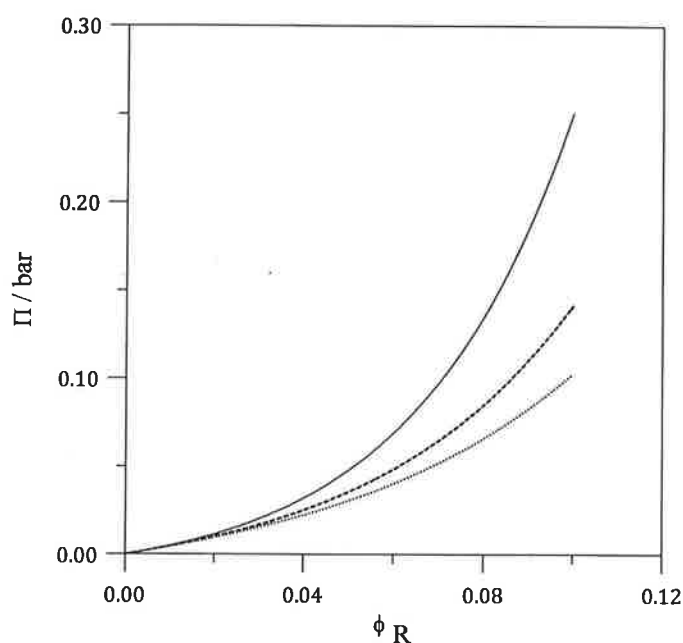
que leva a uma forma alternativa da equação (2.29):

$$\phi_R \ln a_R - \int_0^{\phi_R} \ln a_R d\phi_R = \frac{V_R \Pi(\phi_R)}{RT} \quad (2.37)$$

O equilíbrio de fases que ocorre quando uma proteína em solução é precipitada pela adição de polímeros neutros é muitas vezes modelado descrevendo-se a pressão

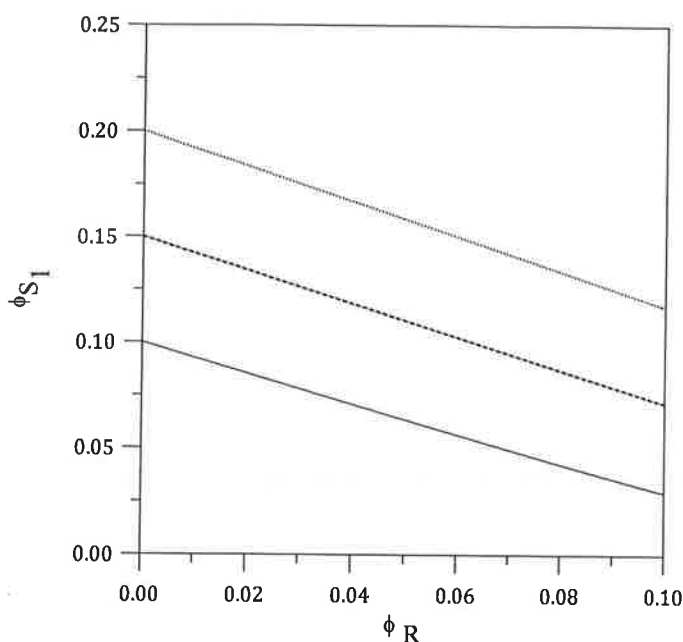
osmótica das fases sobrenadante e precipitado por equações apropriadas a cada fase. O equilíbrio de fases é subsequentemente calculado obtendo-se a composição em que pressão osmótica e potencial químico do soluto são iguais [15]; como condição necessária, a composição da solução externa deve ser a mesma [2]. O desenvolvimento anterior pode ser útil na descrição da pressão osmótica da fase sobrenadante. Neste caso, a metodologia deve ser aplicada na ordem inversa – iniciando-se com a solução externa e obtendo-se a pressão osmótica como função da fração volumétrica do soluto.

As Figuras 2.5 e 2.6 apresentam, respectivamente, a pressão osmótica e a fração de polímero como função da fração protéica, usando a composição da solução externa como parâmetro. Ambas as curvas são construídas diretamente, o que permite, em princípio, que este tipo de equilíbrio de fases seja calculado usando modelos de energia de Gibbs excedente. Deve-se frisar que o decréscimo na concentração polimérica observado na Figura 2.6 não corresponde somente ao efeito da adição de um novo componente – o que resultaria em uma proporção constante entre  $\phi_{s_1}$  e  $\phi_{s_2}$  nestas curvas.



**Figura 2.5.** Pressão osmótica como função da fração de soluto e da composição da célula externa. Linha contínua,  $\phi_{s_1}'' = 0,10$ ; linha tracejada,  $\phi_{s_1}'' = 0,15$ ; linha pontilhada,

$$\phi_{s_1}'' = 0,20.$$

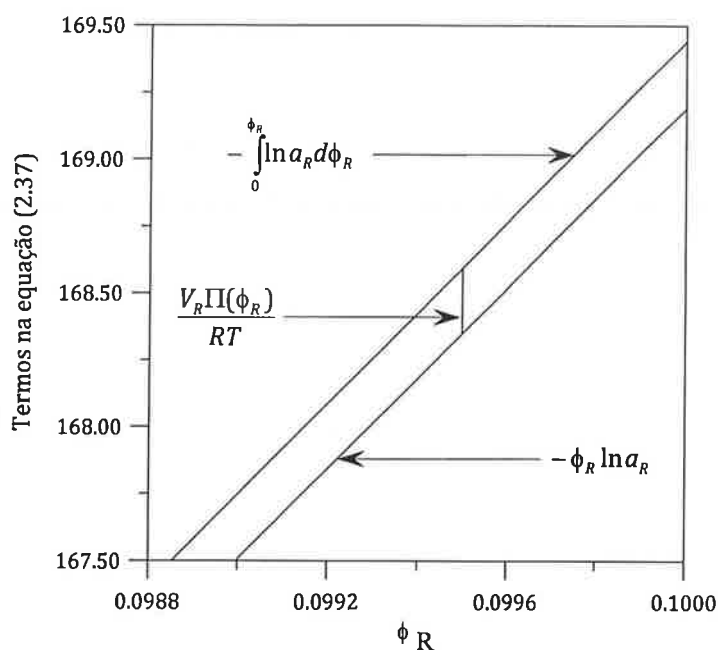


**Figura 2.6.** Fração de solvente ( $S_1$ ) como função da fração de soluto e composição da solução externa. Linha contínua,  $\phi_{S_1}^* = 0,10$ ; linha tracejada,  $\phi_{S_1}^* = 0,15$ ; linha pontilhada,  $\phi_{S_1}^* = 0,20$ .

O comportamento da equação de Gibbs-Duhem pode ser visto na Figura 2.7. Observa-se que os termos no lado esquerdo da equação são muito próximos e que o valor do termo do lado direito é consideravelmente menor que o valor absoluto daqueles termos. Apesar disso, as diferenças entre os dois lados da equação (2.37), quando calculados independentemente, são sempre inferiores a  $10^{-5}$ .

Ao se atentar somente às curvas de potencial químico constante para o solvente (Figuras 2.3 e 2.5), poder-se-ia considerar que esta metodologia seria passível de uso em lugar de algoritmos clássicos para o cálculo de equilíbrio líquido-líquido, uma vez que o estado de equilíbrio corresponde à pressão osmótica para a qual o potencial químico do soluto é igual em ambas as fases – o que levaria a uma diminuição no número de interações necessárias para o cálculo do equilíbrio. Além disso, como se pode ver no Apêndice B, o procedimento pode ser facilmente estendido para cálculos envolvendo qualquer número de solutos. Entretanto, é necessário considerar que o número de operações numéricas que devem ser realizadas para a solução da equação (2.7) aumenta com o aumento do número de solventes. É possível estender esta metodologia para o cálculo de equilíbrio líquido-líquido a partir de uma composição global de alimentação, mas esta abordagem pode não ser factível: a ausência de informação sobre a composição

da solução externa no início do procedimento é equivalente ao desconhecimento da temperatura em um cálculo tipo *flash*. Tal dificuldade pode ser contornada pela introdução de outro *loop* de iterações, mas isso poderia diminuir a eficácia geral de todo o algoritmo.



**Figura 2.7.** Termos na equação de Gibbs-Duhem.

Como observação final, um uso possível desta metodologia inclui o relacionamento entre os formalismos de McMillan & Mayer e Lewis & Randall. Há uma controvérsia substancial acerca deste assunto, não somente em como esta conversão pode ser feita, mas também sobre a própria possibilidade de se modelarem sistemas de múltiplos solventes no formalismo de McMillan & Mayer se estes solventes forem muito dissimilares. Embora não seja o objetivo deste trabalho resolver esta controvérsia, pode-se considerar que a abordagem apresentada facilita o uso de expressões oriundas do formalismo de Lewis & Randall na interpretação de resultados obtidos por experimentos e simulações comumente associados ao formalismo de McMillan & Mayer. Embora com argumentos distintos, esta observação concorda com a conclusão geral do trabalho de Breil e Mollerup [16], para os quais toda teoria de soluções – e portanto todo resultado experimental ou de simulação – pode ser interpretado dentro do formalismo de Lewis & Randall.

## 2.4. Conclusões

Neste trabalho uma abordagem diferencial para o cálculo do equilíbrio osmótico em sistemas de múltiplos solventes é apresentada. Esta metodologia permite o cálculo do equilíbrio osmótico pela definição de um conjunto de equações diferenciais, que podem ser diretamente integradas para sistemas em fase líquida cujo volume possa ser considerado independente da pressão, evitando-se neste caso um procedimento iterativo. Foram apresentados exemplos usando as equações de Margules e Flory-Huggins, mas a abordagem é completamente geral e independente da equação usada para descrever a não-idealidade da fase líquida. A metodologia permite também o cálculo da curva de pressão osmótica como função da fração de soluto, e é numericamente estável mesmo quando aplicada a situações em que haja equilíbrio líquido-líquido.

## 2.5. Apêndice A – Expressões auxiliares

Para a equação de Margules, obtêm-se as seguintes equações:

$$\ln a_{S_1}^{PI} = \ln x_{S_1} + A_{S_1S_2} x_{S_2}^2 + A_{S_1R} x_R^2 + (A_{S_1S_2} + A_{S_1R} - A_{S_2R}) x_{S_2} x_R \quad (2.38)$$

$$\left( \frac{\partial \ln a_{S_1}^{PI}}{\partial x_{S_1}} \right)_{x_{S_2}} = \frac{1}{x_{S_1}} - 2A_{S_1R} x_R - (A_{S_1S_2} + A_{S_1R} - A_{S_2R}) x_{S_2} \quad (2.39)$$

$$\left( \frac{\partial \ln a_{S_1}^{PI}}{\partial x_{S_2}} \right)_{x_{S_1}} = 2A_{S_1S_2} x_{S_2} - 2A_{S_1R} x_R + (A_{S_1S_2} + A_{S_1R} - A_{S_2R})(x_R - x_{S_2}) \quad (2.40)$$

Para a equação de Flory-Huggins, as equações pertinentes são as seguintes:

$$\ln a_{S_1}^{PI} = 1 + \ln \phi_{S_1} - V_{S_1} \left( \frac{\phi_{S_1}}{V_{S_1}} + \frac{\phi_{S_2}}{V_{S_2}} + \frac{\phi_R}{V_R} \right) \quad (2.41)$$

$$+ \frac{V_{S_1}}{V_{ref}} (\chi_{S_1S_2} \phi_{S_2} + \chi_{S_1R} \phi_R - (\chi_{S_1S_2} \phi_{S_1} \phi_{S_2} + \chi_{S_1R} \phi_{S_1} \phi_R + \chi_{S_2R} \phi_{S_2} \phi_R))$$

$$\left( \frac{\partial \ln a_{S_1}^{PI}}{\partial \phi_{S_1}} \right)_{\phi_{S_2}} = \frac{1}{\phi_{S_1}} - 1 + \frac{V_{S_1}}{V_R} + \frac{V_{S_1}}{V_{ref}} ((\chi_{S_2R} - \chi_{S_1R} - \chi_{S_1S_2}) \phi_{S_2} + \chi_{S_1R} \phi_R) \quad (2.42)$$

$$\left( \frac{\partial \ln a_{S_1}^{PI}}{\partial \phi_{S_2}} \right)_{\phi_{S_1}} = -V_{S_1} \left( \frac{1}{V_{S_2}} - \frac{1}{V_R} \right) + \frac{V_{S_1}}{V_{ref}} \left( (\chi_{S_1 S_2} - \chi_{S_1 R})(1 - \phi_{S_1}) - \chi_{S_2 R}(\phi_R - \phi_{S_2}) \right) \quad (2.43)$$

Expressões análogas podem ser obtidas para outros compostos apenas trocando os índices, uma vez que as expressões são simétricas.

## 2.6. Apêndice B – Extensão para múltiplos solutos

A dificuldade de usar a abordagem aqui apresentada aumenta ligeiramente na situação em que haja  $n$  solventes e  $m$  solutos. Neste caso, obtém-se a equação:

$$d\mu_{S_i} = \sum_{j=1}^n \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial \xi_{S_j}} \right)_{T,p,\{\xi\}} d\xi_{S_j} + \sum_{j=1}^{m-1} \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial \xi_{R_j}} \right)_{T,p,\{\xi\}} d\xi_{R_j} + \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial p} \right)_{T,\{\xi\}} dp \quad (2.44)$$

É necessário definir um caminho de integração de antemão. Uma vez que a integração deve ser feita de uma composição inicial  $(\xi_{S_j}^0, \xi_{R_j}^0)$  a uma composição final em que concentrações de soluto sejam nulas, pode-se definir o seguinte parâmetro:

$$\lambda = 1 - \frac{\xi_{R_j}}{\xi_{R_j}^0} \quad (2.45)$$

de modo que  $\lambda = 0,0$  corresponde à composição da solução interna, e  $\lambda = 1,0$  corresponde à composição da solução externa. A integração deve ser conduzida por um caminho em que essa proporção seja constante. Assim:

$$d\xi_{R_j} = -\xi_{R_j}^0 d\lambda \quad (2.46)$$

Obtendo-se:

$$d\mu_{S_i} = \sum_{j=1}^n \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial \xi_{S_j}} \right)_{T,p,\{\xi\}} d\xi_{S_j} - \left( \sum_{j=1}^{m-1} \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial \xi_{R_j}} \right)_{T,p,\{\xi\}} \xi_{R_j}^0 \right) d\lambda + \left( \frac{\partial \mu_{S_i}}{\partial p} \right)_{T,\{\xi\}} dp \quad (2.47)$$

Considerando a restrição:

$$\sum_{j=1}^n d\xi_{S_j} + \sum_{j=1}^m d\xi_{R_j} = 0 \Rightarrow \sum_{j=1}^n d\xi_{S_j} + \left( \sum_{j=1}^m \xi_{R_j}^0 \right) d\lambda = 0 \quad (2.48)$$

Escolhendo  $S_k$  como o solvente de referência:

$$\sum_{j=1, j \neq k}^n \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_j}}{\partial \xi_{S_j}} \right)_{T,p, [\xi]} - \left( \frac{\partial \mu_{S_j}}{\partial \xi_{S_k}} \right)_{T,p, [\xi]} \right) d\xi_{S_j} - \left( \sum_{j=1}^{m-1} \left( \frac{\partial \mu_{S_j}}{\partial \xi_{R_j}} \right)_{T,p, [\xi]} \xi_{R_j}^0 \right) d\lambda + \bar{V}_i dp = 0 \quad (2.49)$$

Portanto:

$$\sum_{j=1, j \neq k}^n \left( \left( \frac{\partial \mu_{S_j}}{\partial \xi_{S_j}} \right)_{T,p, [\xi]} - \left( \frac{\partial \mu_{S_j}}{\partial \xi_{S_k}} \right)_{T,p, [\xi]} \right) \frac{d\xi_{S_j}}{d\lambda} - \left( \sum_{j=1}^{m-1} \left( \frac{\partial \mu_{S_j}}{\partial \xi_{R_j}} \right)_{T,p, [\xi]} \xi_{R_j}^0 \right) + \bar{V}_i \frac{dp}{d\lambda} = 0 \quad (2.50)$$

Também considerando:

$$\frac{d\xi_{S_k}}{d\lambda} = - \sum_{j=1, j \neq k}^n \frac{d\xi_{S_j}}{d\lambda} - \sum_{j=1}^m \xi_{R_j}^0 \quad (2.51)$$

Para o caso de um único soluto, essas equações têm a mesma forma apresentada anteriormente.

## 2.7. Nota adicional

Duas observações, oriundas de análises e resultados posteriores, podem ser feitas ao trabalho aqui exposto. A primeira é referente aos resultados apresentados na Tabela 2.3. No trabalho de mestrado de Anderson Junichi Yano [17], observou-se que a situação apresentada (duas fases em equilíbrio gerando pressões osmóticas distintas) se repetia em alguns casos (mas não todos) em que os solventes apresentam miscibilidade parcial. Investigações ulteriores mostraram que o problema é, na verdade, numérico, e refere-se à ocorrência de uma situação em que:

$$\frac{d\xi_{S_k}}{d\xi_R} \rightarrow \infty \quad (2.52)$$

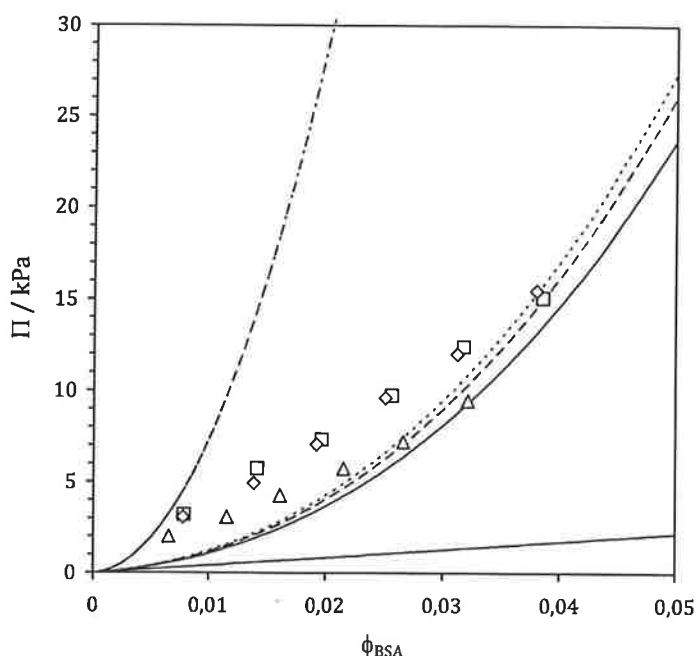
o que leva diretamente a:

$$\frac{dp}{d\xi_R} \rightarrow \infty \quad (2.53)$$

Esta situação pode ocorrer para o ponto com maior concentração de soluto, cujo caminho de integração passa necessariamente pela região bifásica. Como comentado anteriormente, esta ocorrência não é importante em si, pois em tal situação (solventes com miscibilidade parcial) não se aplicaria a metodologia aqui proposta: trata-se mais de uma advertência de que não há liberdade absoluta para a definição arbitrária do que seja solvente ou soluto em sistemas nos quais o papel de cada composto não seja fisicamente definido.



Uma segunda observação diz respeito aos resultados para a pressão osmótica gerada por uma proteína em solução polimérica, apresentados na Figura 2.5. Obter a evidência experimental de tal comportamento é muito difícil – até mesmo por que o tempo para que o equilíbrio seja atingido pode tornar o experimento impraticável. A doutoranda Kelly Cristina Nascimento Alves obteve, como parte de sua pesquisa, dados de pressão osmótica de BSA em soluções de PEG 2000 em pH 5,0 em um osmômetro coloidal [18]. Considerando que a densidade destas soluções seja próxima de  $1,0 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , poder-se-ia construir a partir dos dados consistentes (ou seja, dos conjuntos de dados cujo limite, para a concentração nula de proteína, fornece adequadamente a massa molar da proteína) a Figura 2.8.



**Figura 2.8.** Pressão osmótica para sistemas contendo BSA em soluções de PEG 2000 em pH = 5,0 a 298,15 K.  $\diamond$  - 0,5%,  $\square$  - 1,0%,  $\Delta$  - 2,0% (em fração mássica de PEG). Equação de Flory-Huggins: linha contínua,  $\phi_{s_1}'' = 0,02$ ; linha tracejada,  $\phi_{s_1}'' = 0,01$ ; linha pontilhada,  $\phi_{s_1}'' = 0,005$ . Curvas auxiliares: (---) - pressão osmótica para uma solução ideal; (.....) - pressão osmótica para equação de Flory-Huggins com parâmetro nulo.

Para as curvas preditas pela equação de Flory-Huggins, utilizaram-se os mesmos parâmetros anteriores, exceto a massa do polímero ( $2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e seu volume ( $1670 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Observa-se que a metodologia permite prever corretamente as tendências e obter resultados qualitativamente adequados. Não se poderia esperar uma

concordância quantitativa, vez que parâmetros não foram ajustados à curva, nem tampouco se poderia esperar que a equação de Flory-Huggins, com parâmetros obtidos de fontes diversas, fosse completamente adequada à descrição do sistema. Na verdade, chega a ser surpreendente que os resultados sejam tão próximos, especialmente ao se observar que esta concordância não é devida ao fato de as soluções serem razoavelmente diluídas: por comparação, apresentam-se também as curvas da pressão osmótica da BSA em água considerando a idealidade em sentido "clássico" (atividade igual à fração numérica) e considerando simplesmente o parâmetro de interação da equação de Flory-Huggins nulo. No primeiro caso, os valores são muito inferiores aos experimentais, e no segundo caso, muito superiores.

## 2.8. Referências

- [1] McMillan WG Jr, Mayer JE, The statistical thermodynamics of multicomponent systems, *J. Chem. Phys.*, **13**, 276-304, 1945.
- [2] Curtis RA, Newman J, Blanch HW, Prausnitz JM, McMillan-Mayer solution thermodynamics for a protein in a mixed solvent, *Fluid Phase Equilibria*, **192**, 131-153, 2001.
- [3] Sereno AM, Hubinger MD, Comesaña JF, Correa A, Prediction of water activity of osmotic solutions, *J. Food. Eng.*, **49**, 103-114, 2001.
- [4] Cardoso MJEM, O'Connell JP, Activity coefficients in mixed solvent electrolyte solutions, *Fluid Phase Equilibria*, **33**, 315-326, 1987.
- [5] Wu R-S, Lee LL, Vapor-liquid equilibria of mixed solvent electrolyte solutions: ion size effects based on the MSA theory, *Fluid Phase Equilibria*, **78**, 1-24, 1992.
- [6] Guo R, Guo M, Narsimhan G, Thermodynamics of precipitation of globular proteins by non-ionic polymers, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **35**, 3015-3026, 1996
- [7] Jiang J, Prausnitz JM, Molecular thermodynamics for protein precipitation with a polyelectrolyte, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 5560-5569, 1999.
- [8] Kim SG, Bae YC, Salt-induced protein precipitation in aqueous solution: single and binary protein systems, *Macromolecular Research*, **11**, 53-61, 2003
- [9] Solms N, Anderson CO, Blanch HW, Prausnitz JM, Molecular thermodynamics for fluid-phase equilibria in aqueous two-protein systems, *AIChE J.*, **48**, 1292-1300, 2002
- [10] Lee LL, Thermodynamic consistency and reference scale conversion in multisolvent electrolyte system, *J. Mol. Liq.*, **87**, 129-147, 2000

- [11] Anderko A, Wang P, Rafal M, Electrolyte solutions: from thermodynamic and transport property models to the simulation of industrial processes, *Fluid Phase Equilibria*, **194-197**, 123-142, 2002.
- [12] Tester JW, Modell, M, *Thermodynamics and its applications*, Prentice Hall, Upper Saddle River, 1997.
- [13] Guo R, Guo M, Narsimhan G, Thermodynamics of precipitation of globular proteins by nonionic polymers, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **35**, 3015-3026, 1996.
- [14] Großmann C, Tintinger R, Zhu J, Maurer G, Aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dextran - experimental results and modeling of thermodynamic properties, *Fluid Phase Equilibria*, **106**, 111-138, 1995
- [15] Fornasiero F, Ulrich J, Prausnitz JM, Molecular thermodynamics of precipitation, *Chem. Eng. Proc.*, **38**, 463-475, 1999
- [16] Breil MP, Mollerup JM, The McMillan-Mayer framework and the theory of electrolyte solutions, *Fluid Phase Equilibria*, **242**, 129-135 2006.
- [17] Yano AJ, *Aplicação da abordagem diferencial ao cálculo do equilíbrio osmótico em sistemas de múltiplos solventes*. Dissertação de Mestrado: Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- [18] Alves KCN, *Estudo sobre a não-idealidade de soluções protéicas*. Exame de Qualificação de Doutorado: Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.



### **3. Equilíbrio de fases e partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos contendo carbamato de amônio e copolímeros bloco PEO-PPO-PEO**

#### **Resumo**

Neste capítulo descrevem-se o equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos formados por copolímeros-bloco F38 ou F68 e carbamato de amônio e a partição de algumas proteínas (albumina de soro bovino, lisozima,  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\gamma$ -globulina) nestes sistemas. Diagramas de fase foram determinados a 4 °C (F38) e a 25 °C (F38 e F68): a região bifásica no sistema contendo F68 é muito restrita, o que não ocorre com o F38. Coeficientes de partição, definidos como a razão entre a concentração protéica na fase rica em polímero e aquela na fase rica em sal, variaram na faixa de 0,1 a 0,8 para a albumina de soro bovino, 0,5 a 2,0 para lisozima, 1,0 a 2,5 para  $\alpha$ -lactalbumina, 0,1 a 1,0 para  $\beta$ -lactoglobulina e 0,3 a 1,0 para  $\gamma$ -globulina, dependendo do tamanho da cadeia polimérica, temperatura e comprimento da linha de amarração. As tendências distintas do coeficiente de partição mostram que o grau de separação entre duas proteínas pode ser alto em algumas circunstâncias, o que sugere que o sistema contendo F38 e carbamato de amônio seja uma alternativa a ser considerada no planejamento de processos de separação de proteínas.

#### **3.1. Introdução**

O uso de sistemas aquosos bifásicos (abreviados ATPS, da expressão inglesa equivalente) para a separação de misturas de moléculas biológicas pode ser considerado uma técnica bem estabelecida. O número de aplicações destes sistemas tem crescido continuamente desde o trabalho pioneiro de Albertsson na década de 60, que mostrou o potencial de usá-los para a separação de misturas complexas de biomoléculas [1]. Aplicações recentes destes sistemas incluem não somente processos de purificação visando à escala de produção (como a purificação de proteínas recombinantes de grãos de milho [2], imunoglobulina G do plasma sanguíneo [3] e o isolamento da  $\alpha$ -toxina de *Clostridium perfringens* a partir do meio fermentativo para a produção de vacinas [4]), mas também aplicações de escala estritamente laboratorial (por exemplo, em análises proteômica [5] e genômica [6]).

A separação de fases que resulta em um ATPS ocorre quando dois polímeros, ou um polímero e um sal, são adicionados à água em certas faixas de composição (embora se deva lembrar de que nem todos os polímeros e sais levam a esta separação de fases). Os pares usuais de substâncias que induzem esta separação de fases incluem o polietileno glicol (PEG) e dextrana (o sistema mais largamente estudado), polivinil álcool e dextrana, PEG e sulfato de amônio, e PEG e sulfato de sódio. Além de pesquisa sobre novos usos de ATPS, subsiste pesquisa intensa sobre a descrição de novos sistemas, ou seja, sobre o uso de novos constituintes [7-8]. É compreensível este interesse: aumentar o número de sistemas descritos significa expandir a possibilidade de separar uma molécula alvo de seu ambiente, e pode ocorrer que alguns sistemas sejam adequados para algumas separações definidas, mas não para outras: quando um polímero e um sal induzem a formação de um ATPS, tanto o diagrama de fases quanto o comportamento de proteínas dependem de qual sal e qual polímero estão presentes.

Uma classe de polímeros sintéticos, cuja utilização em novos ATPS tem sido objeto de pesquisas por suas propriedades, é a classe dos copolímeros-bloco PEO-PPO-PEO, ou seja, copolímeros formados por três cadeias homogêneas: um bloco de polióxido de etileno (abreviado PEO), um bloco de polióxido de propileno (abreviado PPO) e um bloco simétrico de PEO. Estes copolímeros são usualmente identificados por seu nome comercial, que é composto de uma letra indicativa de seu estado físico em condições ambientes (L para líquidos, P para pastas e F para flocos), um ou dois algarismos representando o tamanho da cadeia de PPO em uma escala padronizada, e um último algarismo representando a fração mássica de EO no polímero. Por exemplo, os copolímeros P104 e P108 são pastas e têm cadeias de PPO de tamanho semelhante (aproximadamente 56 unidades monoméricas), mas cadeias PEO de tamanhos diferentes (40% e 80% em massa de toda a molécula, respectivamente).

O uso de copolímeros-bloco PEO-PPO-PEO para a constituição de ATPS é interessante, pois pode resultar em coeficientes de partição mais extremos, aumentando, deste modo, a eficiência e a seletividade desta operação unitária. A pesquisa sobre o uso destes polímeros em ATPS iniciou-se com Skuse et al. [9], que estudaram a partição de proteínas em sistemas formados por hidroxipropilcelulose e P105, e Kitahara et al. [10], que estudaram a partição de proteínas em ATPS formados por F68 e sulfato de amônio.

Diagramas de fases de ATPS formados por copolímeros-bloco L64, F68 e P105 e dextrana foram apresentados por Svensson et al. [11]. Estes autores observaram uma mudança acentuada na inclinação da linha de amarração quando a temperatura era alterada, o que indica alterações no comportamento agregativo do copolímero-bloco (ou seja, na ocorrência ou não de micelas ou meso-fases). A partição de aminoácidos e peptídeos em sistemas formados por dextrana T500 e o copolímero P105 foi estudada por Svensson et al [12]; estes autores observaram que o coeficiente de partição de aminoácidos é próximo a 1,0, mas o coeficiente de partição de oligopeptídeos aumenta consideravelmente quando o número de resíduos de triptofano na molécula aumenta. O coeficiente de partição de proteínas em sistemas formados por F68 ou P105 e dextrana T500 foi estudado por Svensson et al. [13]: os autores obtiveram valores mais extremos de coeficiente de partição quando comparado a sistemas semelhantes contendo polietileno glicol. A partição de insulina em ATPS formados por L62, L64 e F68 e fosfato de potássio foi estudada por Haraguchi et al. [14]; como exemplo da flexibilidade destes sistemas, os autores observaram que a mudança na cadeia de PEO faz com que o coeficiente de partição mudasse de 5,0 para mais de 50,0 – uma mudança acentuada, pois este último valor corresponde à partição totalmente em uma fase. Diagramas de fases de sistemas contendo L35 ou F68 e fosfato de potássio [15] ou sulfatos [16] e de sistemas contendo F38, F68, F108, P103 ou P105 e dextrana [17] também mostram comportamentos de fase diferentes daqueles de ATPS formados por PEG.

Os sais mais comumente utilizados na formação de ATPS são o sulfato de sódio, o sulfato de amônio, o fosfato de sódio, o fosfato de potássio e o citrato de sódio; além deles, o carbamato de amônio é uma alternativa recentemente apresentada. O uso deste sal na formação de ATPS foi descrito pela primeira vez por van Berlo et al. [18, 19], que determinaram diagramas de fases de sistemas contendo carbamato de amônio e PEG de cadeia 2000 g·mol<sup>-1</sup>, 4000 g·mol<sup>-1</sup> e 10000 g·mol<sup>-1</sup>. Estes autores estudaram também a partição de alguns aminoácidos nestes sistemas, e observaram que o coeficiente de partição segue uma tendência que pode ser relacionada a sua hidrofobicidade. Dallora et al. [20] estudaram a partição de albumina de soro bovino, lisozima e tripsina em ATPS formados por PEG e carbamato de amônio, observando que os coeficientes de partição são mais extremos que o usual em ATPS contendo outros sais.

O equilíbrio químico que ocorre em uma solução aquosa de carbamato de amônio inclui a ionização da amônia e do dióxido de carbono (resultando nos íons amônio e

bicarbonato), a formação dos íons carbonato (a partir do bicarbonato) e carbamato (a partir da amônia e do bicarbonato), conforme as reações seguintes:



Assim, espécies iônicas e moleculares coexistem em equilíbrio numa solução de carbamato de amônio; como as espécies moleculares são voláteis, o sal pode ser removido da solução por decréscimo de pressão ou acréscimo de temperatura, o que reduz a solubilidade das espécies moleculares. A atratividade do uso de carbamato de amônio em processos de recuperação de bioprodutos é comumente associada a esta característica de "sal volátil", embora restrições ambientais e de materiais (relacionadas à corrosão) possam constituir obstáculos intransponíveis para que esta característica seja efetivamente vantajosa. A literatura apresenta um único processo usando eletrólitos voláteis – incluindo seu reciclo – que pode ser considerado factível: a precipitação de caseína usando dióxido de carbono como ácido volátil [21]. Entretanto, como mostrado por Dallora et al. [20], o uso de carbamato de amônio para a indução da separação de fases pode ser atrativo independentemente de seu caráter volátil.

Neste trabalho, o equilíbrio de fases e a partição de algumas proteínas (albumina de soro bovino, lisozima,  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\gamma$ -globulina) em sistemas aquosos bifásicos formados por carbamato de amônio e os copolímeros-bloco F38 e F68 são apresentados. Os experimentos mostraram que é muito difícil trabalhar com sistemas contendo F68; entretanto, os sistemas formados por F38 resultam em um bom grau de separação entre proteínas, constituindo um sistema promissor a ser considerado em processos de recuperação de proteínas.

## 3.2. Materiais e métodos

### 3.2.1. Materiais

Copolímeros bloco F38 (copolímero de estrutura média  $\text{EO}_{40}\text{PO}_{16}\text{EO}_{40}$ ) e F68 ( $\text{EO}_{76}\text{PO}_{29}\text{EO}_{76}$ ) foram doados pela BASF S. A. (São Bernardo do Campo, Brasil). Carbamato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{COO}$ ) foi adquirido da Fluka (Buchs, Suíça). Lisozima de clara de ovo, albumina de soro bovino (BSA),  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\gamma$ -



globulina (uma mistura de imunoglobulinas) foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Todos os compostos foram utilizados sem purificação posterior. Água milli-Q foi utilizada em todos os experimentos.

### 3.2.2. Métodos

*Equilíbrio de fases.* Sistemas aquosos bifásicos eram produzidos pela mistura de água e soluções previamente preparadas de carbamato de amônio (37% em massa<sup>1</sup>) e copolímero (30% para o F68 e 40% para o F38), com subsequente agitação. Os sistemas eram deixados em repouso por 48h em banho termostático Láctea-Julabo, cuja temperatura era controlada em 0,1 °C. Composições de equilíbrio eram determinadas pela análise da quantidade de polímero (por secagem) e de sal (por meio de retro-titulação após tratamento com excesso de ácido sulfúrico) de alíquotas retiradas de ambas as fases. O pH das fases em equilíbrio é próximo de 9,5 e não foi controlado [20]. O procedimento experimental fora verificado anteriormente pela reprodução de sistemas da literatura [20].

*Coefficientes de partição.* O procedimento é semelhante ao da determinação de composições de equilíbrio. Na produção dos ATPS, proteína era adicionada a uma concentração de aproximadamente 1,0 mg·cm<sup>-3</sup>. Alíquotas eram retiradas de ambas as fases, e sua concentração protéica era determinada usando o método de Bradford, após diluição apropriada, com medidas de absorvância realizada em um espectrofotômetro Beckman DU530.

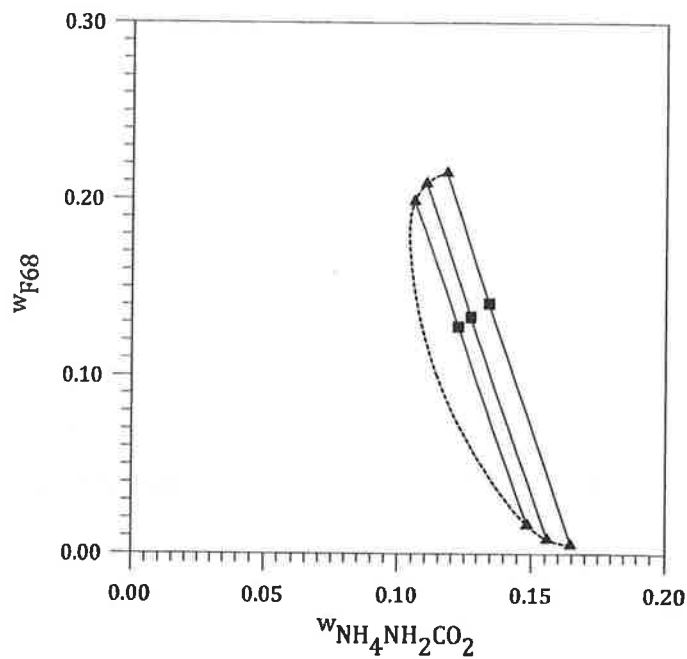
Todos os experimentos e medidas foram realizados ao menos em triplicata.

## 3.3. Resultados e discussão

### 3.3.1. Diagramas de fases

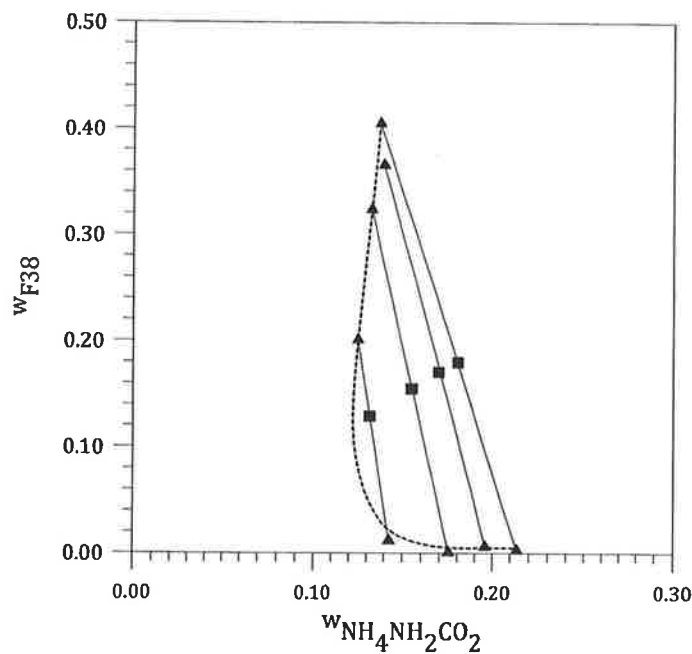
O equilíbrio de fases foi determinado para sistemas contendo ambos os copolímeros a 25 °C; estes resultados são apresentados nas Figuras 3.1 e 3.2. Também foi possível obter o diagrama de fases para sistemas contendo F38 a 4 °C (Figura 3.3), mas foi impossível trabalhar com o F68 nesta temperatura: neste caso, embora tenha sido observada uma separação de fases, as composições não puderam ser analisadas pois a fase rica em polímero tinha aspecto de gel e não podia ser corretamente manipulada.

<sup>1</sup> Todas as porcentagens e frações apresentadas neste capítulo são mássicas.



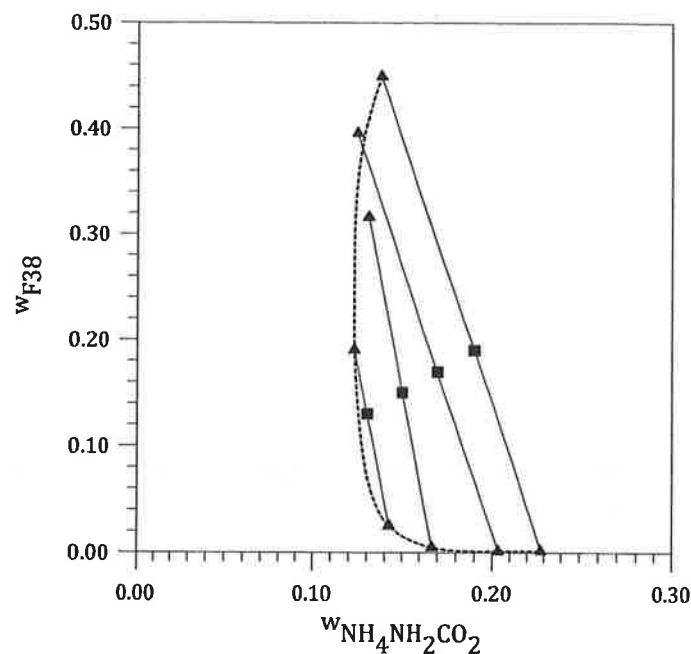
**Figura 3.1.** Diagrama de fases do sistema contendo F68 e carbamato de amônio a 25 °C.

■ - composições globais; ▲ - composições de fases em equilíbrio; linhas contínuas - linhas de amarração; linha tracejada - curva binodal.



**Figura 3.2.** Diagrama de fases do sistema contendo F38 e carbamato de amônio a 25 °C.

■ - composições globais; ▲ - composições de fases em equilíbrio; linhas contínuas - linhas de amarração; linha tracejada - curva binodal.



**Figura 3.3.** Diagrama de fases do sistema contendo F38 e carbamato de amônio a 4 °C.

■ – composições globais; ▲ – composições de fases em equilíbrio; linhas contínuas – linhas de amarração; linha tracejada – curva binodal.

Estes resultados mostram que as concentrações globais de polímero e sal necessárias para a obtenção de separação de fases são similares às aquelas de sistemas contendo PEG e carbamato de amônio [18-20]. A fração mássica de sal na fase rica em polímero é significativa, o que é relativamente comum em ATPS formados por polímeros e sais. A fração salina nesta fase aumenta quando a fração global deste componente aumenta, o que é um comportamento incomum, mas de pouca importância no que se refere à partição de biomoléculas.

As figuras anteriores também mostram que a região bifásica do diagrama de fases para o sistema contendo F68 é muito pequena: concentrações globais maiores levam à formação de uma fase rica em polímero altamente viscosa, com aspecto de gel, e concentrações globais menores não resultam em separação de fases. Além disso, ocorre uma mudança nas densidades relativas das fases em equilíbrio em alguns destes sistemas. Em ATPS formados por sal e polímero, a fase rica em polímero constitui normalmente a fase superior; neste caso, entretanto, observou-se que em sistemas próximos ao ponto crítico a fase topo é a fase rica em sal. Isso significa que o sistema contendo F68 tem importância prática menor: ele será considerado doravante somente para a análise de tendências gerais de comportamento.

Uma comparação entre as Figuras 3.2 e 3.3 mostra que a temperatura não tem influência significativa no comportamento de fases do sistema F38 e carbamato de amônio. Outros sistemas contendo o copolímero bloco F68 (que tem a mesma fração de PEO) também apresentam comportamento similar, como se pode ver em Haraguchi et al. [14] e Silva et al. [15]. Uma razão provável para este comportamento reside no fato de que o F38 não apresenta micelização nestas condições: como o equilíbrio de micelização é muito dependente da temperatura, ele seria responsável por mudanças significativas no diagrama de fases com respeito a esta variável de estado. Além disso, o carbamato de amônio não tem natureza cosmotrópica, o que torna o diagrama de fases menos dependente do efeito *salting-out* e, portanto, da temperatura.

### 3.3.2. Coeficientes de partição de proteínas

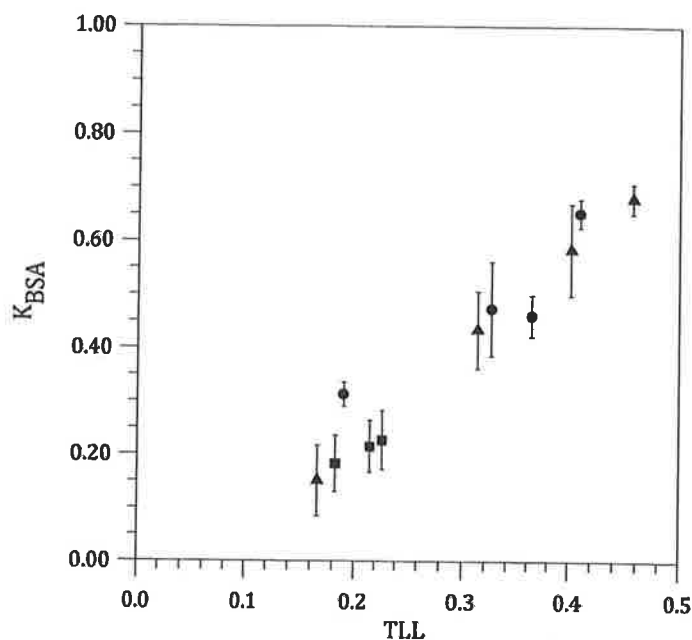
O coeficiente de partição das proteínas estudadas é apresentado nas Figuras 3.4 a 3.8. Devido à mudança observada na densidade das fases, definiu-se o coeficiente de partição de uma proteína  $b$  como:

$$K_b = \frac{c_b^{\text{polímero}}}{c_b^{\text{sal}}} \quad (3.5)$$

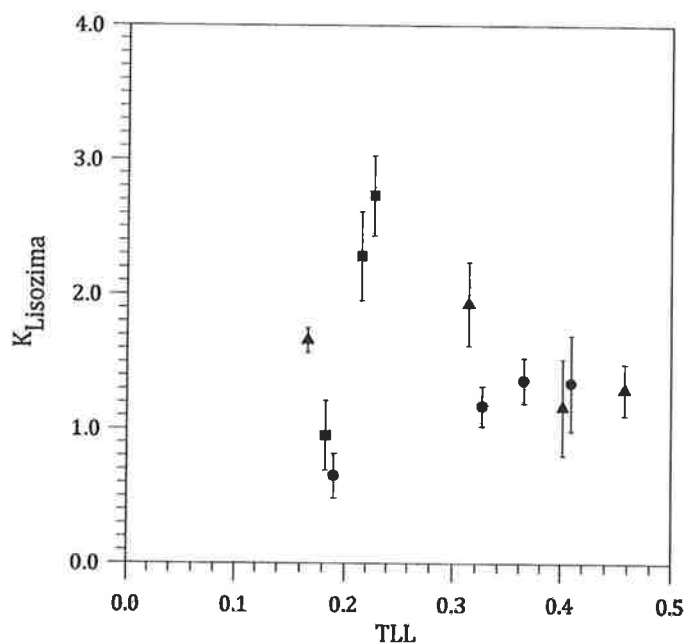
em que  $c_b^{\text{polímero}}$  é a concentração da proteína na fase rica em polímero, analogamente para  $c_b^{\text{sal}}$ . Nestas figuras, o coeficiente de partição é apresentado em função do comprimento da linha de amarração (abreviado TLL da expressão inglesa equivalente), que é calculado por meio de:

$$\text{TLL} = \sqrt{(w_{\text{polímero}}^{\text{topo}} - w_{\text{polímero}}^{\text{fundo}})^2 + (w_{\text{sal}}^{\text{topo}} - w_{\text{sal}}^{\text{fundo}})^2} \quad (3.6)$$

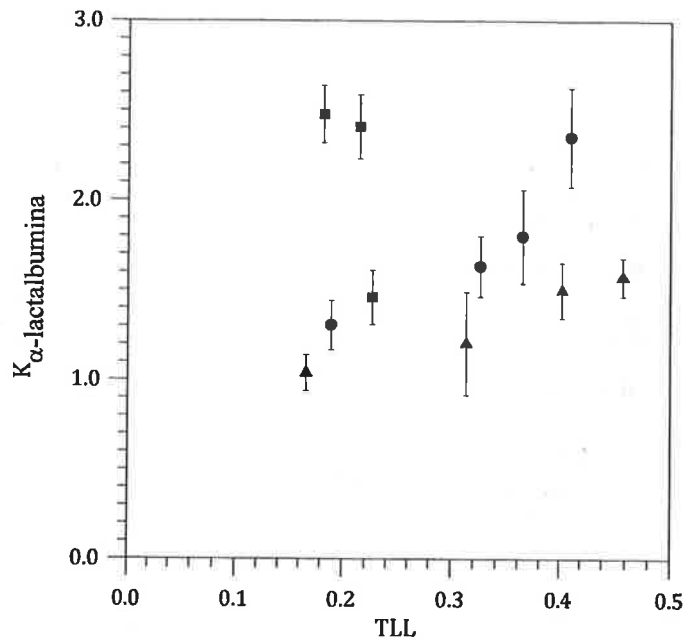
em que  $w$  é a fração mássica de cada composto (polímero ou sal) em uma fase (topo ou fundo). O coeficiente de partição é apresentado como função do TLL, pelo fato de que este parâmetro apresenta um comportamento monotônico no diagrama de fases, permitindo a identificação inequívoca da linha de amarração correspondente à qual o coeficiente se relaciona e, simultaneamente, permitindo uma inferência do quão dissimilares são as fases em equilíbrio – quanto maior o valor do TLL, maior será a diferença entre as composições das fases e, conseqüentemente, entre muitas das propriedades dependentes destas composições.



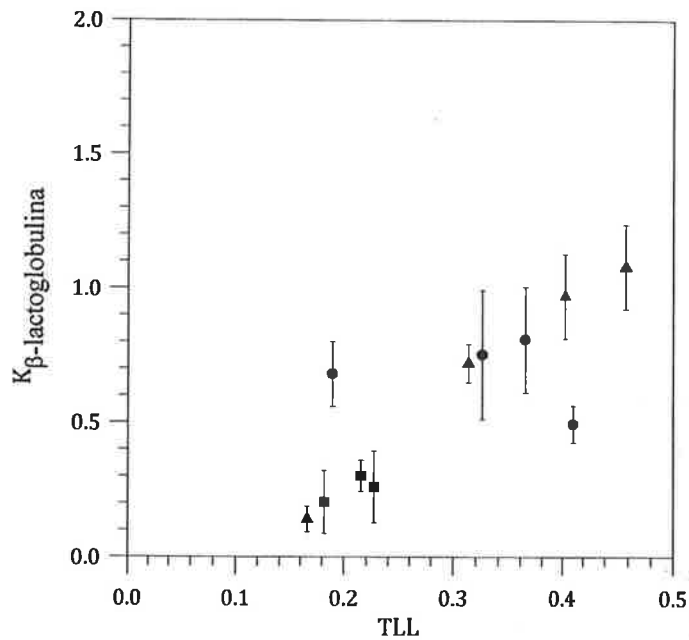
**Figura 3.4.** Partição de albumina de soro bovino em sistemas aquosos bifásicos contendo carbamato de amônio e copolímeros bloco PEO-PPO-PEO. Quadrados – sistemas contendo F68 a 25 °C; circunferências – sistemas contendo F38 a 25 °C; triângulos – sistemas contendo F38 a 4 °C.



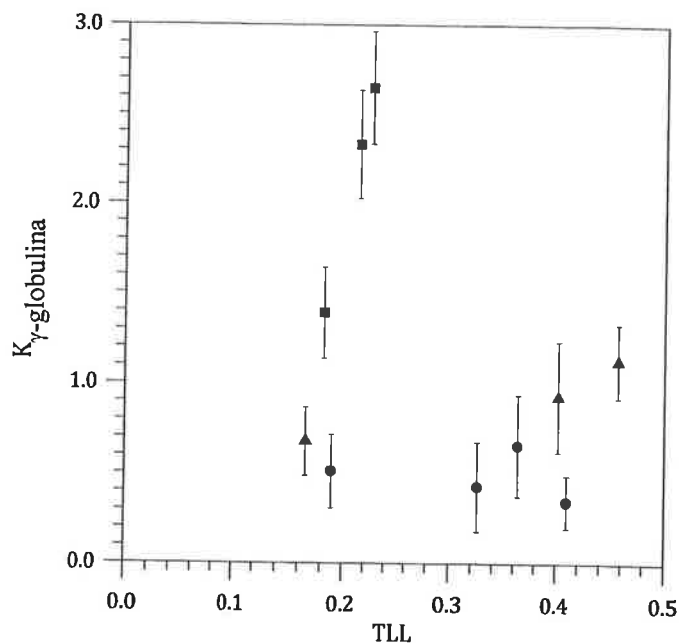
**Figura 3.5.** Partição de lisozima de clara de ovo em sistemas aquosos bifásicos contendo carbamato de amônio e copolímeros bloco PEO-PPO-PEO. Quadrados – sistemas contendo F68 a 25 °C; circunferências – sistemas contendo F38 a 25 °C; triângulos – sistemas contendo F38 a 4 °C.



**Figura 3.6.** Partição de  $\alpha$ -lactalbumina em sistemas aquosos bifásicos contendo carbamato de amônio e copolímeros bloco PEO-PPO-PEO. Quadrados – sistemas contendo F68 a 25 °C; circunferências – sistemas contendo F38 a 25 °C; triângulos – sistemas contendo F38 a 4 °C.



**Figura 3.7.** Partição da  $\beta$ -lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos contendo carbamato de amônio e copolímeros bloco PEO-PPO-PEO. Quadrados – sistemas contendo F68 a 25 °C; circunferências – sistemas contendo F38 a 25 °C; triângulos – sistemas contendo F38 a 4 °C.



**Figura 3.8.** Partição de  $\gamma$ -globulina em sistemas aquosos bifásicos contendo carbamato de amônio e copolímeros bloco PEO-PPO-PEO. Quadrados – sistemas contendo F68 a 25 °C; circunferências – sistemas contendo F38 a 25 °C; triângulos – sistemas contendo F38 a 4 °C.

Embora não seja factível isolar completamente a influência de cada fator que pode afetar o comportamento de uma proteína em um ATPS, é possível relacionar as tendências observadas com as características tanto dos sistemas quanto das proteínas, o que permite a identificação dos fatores que mais influenciam esta partição. Deve-se frisar que uma análise estatística (em senso estrito) não pode ser conduzida neste tipo de experimento, pois não é possível relacionar um valor numérico único a alguns dos aspectos considerados (como o volume excluído), e algumas propriedades só podem ser manipuladas indiretamente.

A Figura 3.4 apresenta o coeficiente de partição da BSA. Para todos os sistemas, o valor do coeficiente de partição desta proteína é inferior a 1,0, o que pode ser devido a seu tamanho (a BSA é uma proteína relativamente grande) e a seu caráter hidrofílico. Há uma tendência de crescimento do valor de  $K_b$  com o aumento do TLL, o que é um comportamento atípico: valores mais elevados de TLL são relacionados a sistemas nos quais a diferença entre as composições das fases em equilíbrio é maior, o que comumente resulta em coeficientes de partição mais extremos – que podem ser maiores

(quando  $K_b$  é maior que 1,0) ou menores ( $K_b$  menor que 1,0) que em sistemas com valores menores de TLL.

Os resultados para sistemas contendo lisozima são apresentados na Figura 3.5. Em quase todos os sistemas, o coeficiente de partição desta proteína é maior que 1,0, e este valor depende muito pouco do valor de TLL para sistemas contendo F38 – as diferenças são pouco significativas para sistemas à mesma temperatura. Este comportamento relaciona-se ao fato de esta enzima ser uma proteína relativamente pequena, aproximadamente neutra no pH dos sistemas (ela tem uma carga positiva baixa), e hidrofóbica. Embora o desvio experimental não pareça excessivo em uma primeira análise, deve-se frisar que os resultados para os sistemas formados por F68 podem ser questionáveis, pois a concentração global de proteína teve de ser diminuída para que se evitasse precipitação na interface.

Os dados para a  $\alpha$ -lactalbumina são apresentados na Figura 3.6. O comportamento desta proteína é relativamente próximo da lisozima: ambas as proteínas têm tamanhos similares, mas pontos isoelétricos diferentes ( $\alpha$ -lactalbumina tem um pI inferior a 7,0) e diferentes hidrofobicidades. Para o sistema contendo F38 a 25 °C, há um aumento no coeficiente de partição com o aumento do TLL, tendência semelhante àquela da BSA.

Como pode ser visto na Figura 3.7, a  $\beta$ -lactoglobulina segrega-se na fase rica em polímero, comportamento que provavelmente se relaciona a seu caráter hidrofílico. Não se espera que efeitos de volume excluído sejam fundamentais: a  $\beta$ -lactoglobulina é uma proteína pequena com tendência à dimerização, mas a ocorrência de dimerização nas condições destes sistemas é incerta.

Finalmente, os resultados para sistemas contendo  $\gamma$ -globulina são apresentados na Figura 3.8. Para sistemas contendo F38, os valores do coeficiente de partição são pequenos, o que indicaria um efeito predominante de exclusão de volume. Contrariamente à BSA e à  $\beta$ -lactoglobulina, o ponto isoelétrico da  $\gamma$ -globulina é próximo a 7,0, o que significa que o efeito de carga deve ser menor neste caso. Entretanto, para sistemas contendo F68 o coeficiente de partição é maior que 1,0, o que é o oposto da tendência esperada.

Das análises prévias sobre o comportamento individual das proteínas, é patente que um dos principais fatores a afetar a partição é o efeito de volume excluído. De modo geral, entende-se por efeito de volume excluído o fato de que quanto maior for o



tamanho de uma biomolécula, tanto maior será sua partição na fase rica em sal, por razões ligadas a saturação geométrica. Ao se comparar o comportamento da BSA e da  $\alpha$ -lactalbumina (que são proteínas hidrofílicas com pontos isoelétricos similares, mas tamanhos diferentes), nota-se que o tamanho da proteína é um fator importante a afetar a partição nestes ATPS. Entretanto, a forma das curvas para BSA e para a  $\beta$ -lactoglobulina e o comportamento da  $\gamma$ -globulina inequivocamente indicam que outros fatores também têm papel relevante.

Outro parâmetro importante a ser analisado é a hidrofobicidade superficial; de fato, este é algumas vezes o fator preponderante na partição de proteínas [22]. Nestes sistemas, a fase rica em polímero é mais hidrofóbica que a fase rica em sal, devido à presença de grupos hidrofóbicos (como o óxido de propileno) e ao fato de que a fração de água livre disponível para interagir e solvatar é menor nesta fase. Ao contrário do que é usual em ATPS, o sal utilizado (carbamato de amônio) não tem um comportamento fortemente cosmotrópico (o que pode ser visto, por exemplo, no fato de que concentrações mais altas deste sal são necessárias para induzir a precipitação de proteínas [23]), o que significa que a hidrofobicidade da fase rica em sal é maior neste sistema do que em ATPS semelhantes.

Entre as proteínas investigadas neste trabalho, a BSA a  $\alpha$ -lactalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina tem caráter mais hidrofílico, enquanto a  $\gamma$ -globulina e a lisozima são mais hidrofóbicas. A comparação entre  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina mostra que as mesmas tendências usualmente observadas em ATPS são seguidas: a  $\alpha$ -lactalbumina se concentra na fase rica em polímero, enquanto a  $\beta$ -lactoglobulina se particiona preferencialmente na fase rica em sal [24]. Neste caso, entretanto, as tendências observadas podem-se relacionar à maior presença de resíduos expostos de triptofano na  $\alpha$ -lactalbumina, o que favorece a partição na fase rica em polímero [12], e explica a razão de o comportamento da  $\alpha$ -lactalbumina ser tão próximo ao comportamento da lisozima, que é mais hidrofóbica. Entretanto, quando a lisozima e as duas proteínas do soro de leite são analisadas simultaneamente, a influência da hidrofobicidade no fenômeno de partição é evidente. Assim, com respeito a este aspecto tomado isoladamente, pode-se esperar que proteínas hidrofóbicas se concentrem na fase rica em polímero, enquanto as hidrofílicas se particionem na fase rica em sal.

Para algumas proteínas (BSA e  $\beta$ -lactoglobulina) um comportamento monotônico é observado: o coeficiente de partição é inferior a 1,0, mas aumenta com o aumento do

comprimento da linha de amarração. Esta tendência pouco comum pode ser analisada por meio da equação de Albertsson [1]:

$$\ln K_b = \ln K_b^0 - \frac{zF}{RT} \Delta\phi \quad (3.7)$$

em que  $K_b^0$  é o coeficiente de partição que a proteína teria se tivesse carga líquida nula,  $z$  é a carga da proteína,  $F$  é a constante de Faraday,  $R$  é a constante dos gases,  $T$  é a temperatura absoluta e  $\Delta\phi$  é a diferença de potencial elétrico entre as fases. Espera-se que o valor absoluto de  $\Delta\phi$  seja maior para valores mais altos de TLL. Como BSA e  $\beta$ -lactoglobulina têm carga negativa elevada no pH do sistema, a diferença de potencial elétrico influencia fortemente seu coeficiente de partição, o que resulta no comportamento observado.

O comportamento da  $\gamma$ -globulina é sutil e merece uma observação à parte: seu coeficiente de partição é maior que 1.0 para sistemas contendo F68 e menor que 1,0 para sistemas contendo F38. Uma vez que pH e temperatura são os mesmos, este comportamento não pode ser relacionado a fatores intrínsecos à molécula protéica. Além disso, embora possa haver alguma micelização em soluções de F68, é improvável que este comportamento possa ser relacionado à ocorrência de encapsulação, por exemplo, devido ao tamanho da molécula protéica. Nesse caso, embora uma resposta definitiva não possa ser dada, a ocorrência de alguma interação específica entre domínios hidrofóbicos na superfície da proteína e o bloco PPO do copolímero pode ser a razão para o comportamento observado: como a molécula do F38 é menor, esta interação pode ser insuficiente para sobrepujar os efeitos de tamanho.

Além das propriedades das proteínas, o coeficiente de partição é função também do polímero constituinte. Como ambos os polímeros têm a mesma razão de grupos óxido de etileno e óxido de propileno, as diferenças de comportamento devem ser relacionadas, em princípio, ao tamanho da cadeia – que pode afetar o comportamento de duas maneiras, tanto alterando as composições das fases em equilíbrio quanto por meio do efeito de exclusão de volume. A mudança na composição é evidente pelos diferentes diagramas a 25 °C: a região bifásica para sistemas contendo F68 é menor que para sistemas contendo F38. No que diz respeito especificamente aos efeitos de exclusão de volume, o coeficiente de partição em sistemas contendo F68 é ligeiramente superior àquele em sistemas contendo F38 para as proteínas cujo coeficiente de partição é maior que 1,0 (lisozima e  $\alpha$ -lactalbumina). Este comportamento é o oposto do que se esperaria

pela consideração somente de efeitos de exclusão de volume. Como dito anteriormente, a formação de micelas que poderiam encapsular as moléculas protéicas não é uma hipótese plausível: estes polímeros não formam micelas em temperatura ambiente, mesmo nas concentrações mais altas da fase rica em polímero, como se pode inferir pela extrapolação das curvas apresentadas em Alexandridis et al. [25]. Além disso, o coeficiente de partição não decresce com o aumento de TLL, o que significa que outros efeitos sobrepujam a exclusão de volume. Ao se combinar esta análise com a do comportamento da BSA e da  $\beta$ -lactoglobulina, observa-se que, embora a exclusão de volume tenha um papel importante na definição do comportamento de uma proteína nestes sistemas, ela constitui um efeito entre outros.

A temperatura também pode alterar o comportamento de partição tanto pela alteração do equilíbrio líquido-líquido subjacente quanto pela alteração de interações entre espécies presentes. Entretanto, neste caso a temperatura tem um papel menor no comportamento da partição: as diferenças entre coeficientes de partição a 4 °C e a 25 °C estão, de modo geral, dentro das incertezas experimentais. Exceto por razões específicas relacionadas à manutenção da atividade, para estes sistemas não há vantagem em trabalhar em temperaturas mais baixas: pelo contrário, em temperaturas mais baixas as viscosidades são maiores, e a dificuldade de manuseio dos sistemas aumenta, como ocorre na maioria dos APTS.

Finalmente, pode-se acrescentar que, a despeito de qualquer análise teórica sobre os coeficientes de partição, é muito difícil manipular sistemas contendo F68. A região bifásica é muito pequena, e mudanças mínimas na composição de um sistema podem levar ou à formação de uma fase polimérica com consistência de gel ou à ausência de separação de fases. O fato de os valores de TLL serem pequenos resulta em baixos valores de tensão interfacial, o que torna a coalescência lenta. Por estas razões, sistemas contendo F68 e carbamato de amônio podem ter uso muito restrito, se tanto, em protocolos de escala laboratorial.

O grau de separação que pode ser conseguido para uma mistura de duas proteínas pode ser inferido da razão entre os coeficientes de partição das proteínas puras (que pode ser definida como um *fator de separação* entre elas): se este valor é muito maior ou muito menor que 1,0, as proteínas particionar-se-ão preferencialmente em fases diferentes. Ao se comparar o sistema contendo F38 e carbamato de amônio a outros APTS para os quais dados de partição podem ser encontrados na literatura,

conclui-se que o grau de separação que pode ser alcançado nestes sistemas é comparável ou, algumas vezes, maior que para outros sistemas<sup>2</sup>. Nos dados apresentados em Andrews et al. [22] para a partição de diversas proteínas, observa-se que um grau de separação comparável entre BSA e lisozima pode ser conseguido somente em sistemas formados por citrato de sódio, enquanto a resolução entre BSA e  $\alpha$ -lactalbumina é sempre menor (ambas particionam-se preferencialmente na mesma fase). A separação entre  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina tem sido extensivamente estudada na literatura; o grau de separação conseguido neste caso é comparável, por exemplo, àquele obtido em sistemas formados por PEG e sulfato de amônio [24]. Dados para imunoglobulina G e albumina sérica humana (cujo comportamento de partição é semelhante ao da BSA) em ATPS formados por PEG e fosfato de potássio, na situação em que cloreto de sódio não é adicionado, mostram um comportamento similar àquele do sistema F38 e carbamato de amônio [3]. Entretanto, o sistema PEG e carbamato de amônio leva a uma maior separação entre lisozima e BSA [20]. Esta análise mostra que o comportamento da partição nestes sistemas é comparável ao que se espera para um ATPS, embora somente duas proteínas (BSA e  $\gamma$ -globulina) possam ser efetivamente concentradas em um único estágio.

Outro ponto interessante dos dados apresentados nas Figuras 3.4 a 3.8 é o fato de que graus de separação maiores podem ser obtidos para valores menores de TLL em alguns casos – por exemplo, para os pares BSA e lisozima,  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, e mesmo para BSA e  $\gamma$ -globulina (neste caso, com uma baixa seletividade). Isso é pouco comum: como mencionado anteriormente, coeficientes de partição costumam ser mais extremos para valores maiores de TLL, e a separação que se obtém nestas circunstâncias é, como regra, maior. Pode ser preferível trabalhar em valores mais baixos de TLL, uma vez que a baixa concentração dos compostos formadores de fase minimiza os requisitos de pós-tratamento, embora a tensão interfacial seja também menor. Este comportamento do coeficiente de partição é significativo, uma vez que a temperatura não é uma condição cuja manipulação possa aumentar o grau de separação. Embora esta análise seja apenas indicativa do que pode ocorrer em sistemas reais, ela ilustra o potencial apresentado por estes sistemas para processos de purificação e recuperação de misturas protéicas.

<sup>2</sup> Alguns pares aqui considerados são estudados como modelos de comportamento, não ocorrendo necessariamente juntos em misturas naturais – como a BSA e a lisozima, por exemplo.

Uma conclusão geral deste trabalho é que o sistema contendo F38 e carbamato de amônio pode ser uma alternativa a ser considerada no planejamento de processos de purificação e recuperação de bioprodutos: os dados aqui apresentados demonstram que elevados graus de separação podem ser conseguidos usando estes sistemas. Obviamente, o uso deste sistema para a separação de uma biomolécula-alvo a partir de um caldo de fermentação ou de qualquer outro meio demandará análises específicas a respeito não somente da partição, mas também das operações posteriores e da manutenção de atividade biológica, investigação que está além do escopo deste trabalho.

### 3.4. Conclusões

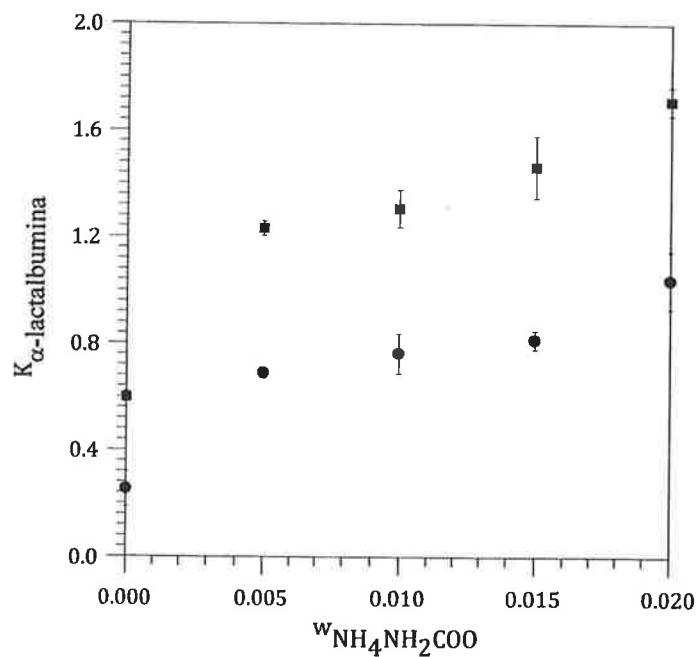
Neste trabalho foram apresentados o comportamento de fases de sistemas aquosos bifásicos contendo copolímeros-bloco e carbamato de amônio e a partição de algumas proteínas (BSA, lisozima,  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\gamma$ -globulina) nestes sistemas. Sistemas foram produzidos usando os copolímeros F68 e F38; enquanto os sistemas contendo F68 apresentaram uma região bifásica restrita, os sistemas contendo F38 apresentaram uma região bifásica mais ampla, e puderam ser manuseados também em temperaturas mais baixas. A partição de proteínas é dependente de características das proteínas e dos sistemas: em termos gerais, BSA e  $\beta$ -lactoglobulina particionam-se preferencialmente na fase rica em sal, enquanto a lisozima e a  $\alpha$ -lactalbumina concentram-se na fase rica em polímero – a  $\gamma$ -globulina particiona-se preferencialmente na fase rica em sal em sistemas contendo F38 e na fase rica em polímero em sistemas contendo F68. As diversas tendências do coeficiente de partição, que permitem um elevado grau de separação em valores menores de TLL, mostram que o sistema contendo F38 e carbamato de amônio tem potencial a ser explorado em processos de purificação e recuperação de bioprodutos.

### 3.5. Nota adicional

A influência do sal carbamato de amônio é mais complexa do que outros sais: estudos posteriores mostraram que a relação entre cosmotropicidade e manutenção de atividade enzimática (sais cosmotrópicos são bons agentes precipitantes – e bons formadores de sistemas aquosos bifásicos, – e enzimas precipitadas pela adição destes sais usualmente mantêm a atividade) *não* é válida no caso do carbamato de amônio [26]. No caso específico de sistemas aquosos bifásicos, a adição de pequenas quantidades de

carbamato de amônio a sistemas formados por outros sais tem um efeito considerável sobre o coeficiente de partição de proteínas: um estudo a este respeito, visando a entender melhor os mecanismos envolvidos, foi desenvolvido pela bolsista de iniciação científica Carolina Camargo [27].

Como exemplo, na Figura 3.9 apresenta-se o comportamento da  $\alpha$ -lactalbumina em um sistema específico formado por PEG e sulfato de sódio (cuja composição global era 20% em massa de polímero e 10% em massa de sal) com a adição de carbamato de amônio. A adição altera o coeficiente de partição significativamente – mais do que se esperaria pela mudança no diagrama de fases (que se refletiria em pequenas alterações na TLL: note-se que a quantidade total de carbamato adicionada é muito pequena). A alteração do pH não é explicação para o comportamento, pois nos sistemas isentos de carbamato o pH também foi mantido em 9,8: a explicação mais plausível é a ação do carbamato de amônio na estrutura da água, por exemplo, alterando a camada de hidratação nas moléculas de PEG.



**Figura 3.9.** Partição da  $\alpha$ -lactalbumina em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG e sulfato de sódio, em função da fração mássica global de carbamato de amônio, a 25 °C.

Quadrados – sistemas contendo PEG 4000; circunferências – sistemas contendo PEG

10000.

### 3.6. Referências

- [1] Albertsson P-A, *Partition of cell particles and macromolecules*, 3<sup>rd</sup> ed., New York, Wiley, 1986.
- [2] Gu Z-R, Glatz CE, Aqueous two-phase extraction for protein recovery from corn extracts, *J. Chromatogr. B*, **845**, 38-50, 2007.
- [3] Rosa PAJ, Azevedo AM, Aires Barros MR, Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies. *J. Chromatogr. A*, **1141**, 50-60, 2007.
- [4] Cavalcanti MTH, Porto TS, Barros Neto B, Lima-Filho JL, Porto ALF, Pessoa Jr. A, Aqueous two-phase systems extraction of  $\alpha$ -toxin from *Clostridium perfringens* type A, *J. Chromatogr. B*, **833**, 135-140, 2006.
- [5] Frerix A, Geilenkirchen P, Muller M, Kula MR, Hubbuch J, Separation of genomic DNA, RNA, and open circular plasmid DNA from supercoiled plasmid DNA by combining denaturation, selective renaturation and aqueous two-phase extraction, *Biotechnol. Bioeng.*, **96**, 57-66, 2007.
- [6] Bai H, Yang F, Yang X, Novel prefractionation method can be used in proteomic analysis, *J. Proteome Res.*, **5**, 840-845, 2006.
- [7] Hernandez-Mireles T, Rito-Palomares M, New aqueous two-phase systems based on poly(ethylene oxide sulfide) (PEOS) and potassium phosphate for the potential recovery of proteins, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 997-1002, 2006.
- [8] Deng G, Yao SJ, Lin DQ, Partitioning of proteins using a hydrophobically modified ethylene oxide/SDS aqueous two-phase system. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 1209-1214, 2005.
- [9] Skuse DR, Norrisjones R, Yalpani M, Brooks DE, Hydroxypropyl cellulose poly(ethylene glycol)-co-poly(propylene glycol) aqueous 2-phase systems - system characterization and partition of cells and proteins, *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 785-790, 1992.
- [10] Kitahara T, Kamihira M, Takeuchi H, Application of Pluronic F68 for aqueous two-phase extraction of proteins, *J. Chem. Eng. Japan*, **26**, 183-188, 1993.
- [11] Svensson M, Linse P, Tjerneld F, Phase behavior in aqueous two-phase systems containing micelle-forming block-copolymers, *Macromolecules*, **28**, 3597-3503, 1995.
- [12] Svensson M, Joabsson F, Linse P, Tjerneld F, Partitioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing self-aggregating block

- copolymer – Effects of temperature, salts and surfactants, *J. Chromatogr. A*, **761**, 91-101, 1997.
- [13] Svensson M, Berggren K, Veide A, Tjerneld F, Aqueous two-phase systems containing self-associating block copolymers – partitioning of hydrophilic and hydrophobic biomolecules, *J. Chromatogr. A*, **839**, 71-83, 1999.
- [14] Haraguchi LH, Mohamed RS, Loh W, Pessôa Filho PA, Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymers and potassium phosphate, *Fluid Phase Equilibria*, **215**, 1-15, 2004.
- [15] Silva LHM, Silva MCH, Mesquita AF, Nascimento KS, Coimbra JSR, Minim LA, Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + salt + water two-phase systems at different temperatures and pH, *J. Chem. Eng. Data*, **50**, 1457-1461, 2005.
- [16] Silva MCH, Silva LHM, Amim Jr J, Guimarães RO, Martins JP, Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixtures of triblock copolymers L35 and F68 with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, *J. Chem. Eng. Data*, **51**, 2260-2264, 2006.
- [17] Tada ES, Loh W, Pessoa Filho PA, Phase equilibrium in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide-propylene oxide block copolymers and dextran, *Fluid Phase Equilibria*, **218**, 221-228, 2004.
- [18] van Berlo M, Luyben KCAM, van der Wielen LAM, Poly(ethylene glycol)-salt aqueous two-phase systems with easily recyclable volatile salts, *J. Chromatogr. B*, **711**, 61-68, 1998.
- [19] van Berlo M, Ottens M, Luyben KCAM, van der Wielen LAM, Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems with recyclable volatile salts, *J. Chromatogr. B*, **743**, 317-325, 2000.
- [20] Dallora NLP, Klemz JGD, Pessoa Filho PA, Partitioning of model proteins in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium carbamate, *Biochem. Eng. J.*, **34**, 92-97, 2007.
- [21] Tomasula PM, Craig Jr. JC, McAloon AJ, Economic analysis of a continuous casein process using carbon dioxide as precipitant, *J. Dairy Sci.*, **81**, 3331-3342, 1998.
- [22] Andrews BA, Schmidt AS, Asenjo JA, Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of surface hydrophobicity and charge, *Biotech. Bioeng.*, **90**, 380-390, 2005.
- [23] Watanabe EO, Pessôa Filho PA, Miranda EA, Mohamed RS, Evaluation of the use of volatile electrolyte system produced by ammonia and carbon dioxide in water for the



salting-out of proteins: precipitation of porcine trypsin, *Biochem. Eng. J.*, **30**, 124-129, 2006.

[24] Rodrigues LR, Venâncio A, Teixeira JA, Partitioning and separation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in polyethylene glycol/ammonium sulfate aqueous two-phase systems, *Biotechnol. Letters*, **23**, 1893-1897, 2001.

[25] Alexandridis P, Holzwarth JF, Hatton TA, Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association, *Macromolecules*, **27**, 2414-2425, 1994.

[26] Silva LL, Pessôa Filho PA, Miranda EA, Evaluation of the effect of ammonium carbamate on the stability of proteins, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **85**, 962-967, 2010.

[27] Camargo C, *Estudo da influência da adição de carbamato de amônio à partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos*, Relatório final de bolsa de iniciação científica FAPESP, processo 2006/04873-5, São Paulo, 2007.



## 4. Equilíbrio de fases na precipitação de lisozima por meio da adição de sais

### Resumo

Neste capítulo apresenta-se um estudo sobre o equilíbrio sólido-líquido que se estabelece na precipitação de lisozima por meio da adição de sais. Experimentos de precipitação foram conduzidos a 5,0 °C, 15,0 °C e 25,0 °C e em pH 7,0 com sulfato de amônio, sulfato de sódio e cloreto de sódio, e em pH alcalino (aproximadamente 9,4) com carbamato de amônio. Nestes experimentos, uma separação completa das fases coexistentes (sólida e líquida) não pôde ser alcançada; entretanto, foi possível determinar a composição da fase precipitado (chamada de *precipitado verdadeiro*) por meio de uma técnica de extrapolação das linhas de amarração. A atividade enzimática da lisozima também foi determinada, e o balanço de atividade sugere que a manutenção de atividade enzimática pode estar ligada ao tipo de precipitado formado.

### 4.1. Introdução

A adição de alguns sais a soluções protéicas aquosas muitas vezes resulta em uma diminuição na solubilidade da proteína, ocasionando uma separação de fases, com a formação de uma fase líquida pobre em proteína e uma fase sólida rica em proteína – fenômeno conhecido pela expressão inglesa *salting-out*. Este fenômeno é base de processos de precipitação e cristalização induzidos pela adição de sais, largamente empregados como métodos razoavelmente seletivos e de baixo custo para a concentração e purificação de proteínas a partir de soluções aquosas [1]. O projeto e a operação eficiente desta operação unitária, bem como de outras operações relacionadas (por exemplo, a partição em sistemas aquosos bifásicos), requerem o conhecimento do comportamento de fases destes sistemas [2] – ao menos, no caso específico do equilíbrio sólido-líquido, da curva de solubilidade das proteínas envolvidas em função da concentração salina. Processos de precipitação são desenvolvidos em escala laboratorial, e o aumento de escala e a otimização deveriam (idealmente) ser baseados em informações confiáveis do diagrama de fases [3], embora na prática sejam muitas vezes conduzidos empiricamente. Dados de equilíbrio de fases também são necessários ao desenvolvimento de modelos termodinâmicos para a correlação, extrapolação e

predição de condições nas quais uma proteína possa ser precipitada ou cristalizada, e estes modelos podem ser utilizados para reduzir a faixa de condições que devem ser investigadas em detalhe [4]. Além disso, dados de equilíbrio de fases para qualquer sistema particular podem contribuir para o desenvolvimento de modelos termodinâmicos adequados para a descrição do equilíbrio de fases de sistemas semelhantes.

A literatura sobre a precipitação de proteínas por meio de *salting-out* pode ser dividida em duas classes principais. Em uma delas, ênfase é posta na solubilidade da proteína (ou seja, na concentração da proteína na fase sobrenadante) e sua dependência de variáveis como tipo e concentração de agentes precipitantes, pH e temperatura [5-9]. Efetivamente, a curva de solubilidade é a informação mínima necessária ao entendimento desta operação unitária. A outra abordagem enfoca as características do precipitado, por exemplo, o tamanho das partículas precipitadas e a densidade dos agregados [10-12]. Entretanto, a composição das duas fases coexistentes, que geraria o que mais propriamente se pode chamar de diagrama de fases, raramente é investigada. Os trabalhos de Dervichian [13], Dervichian e Mossé [14] e Moretti et al. [15] encontram-se entre os raros exemplos deste tipo de pesquisa. As principais razões para a escassez de trabalhos nesta área ligam-se aos problemas que podem surgir na execução destes experimentos: por exemplo, cinéticas lentas de reação e precipitação podem impedir que o sistema atinja o equilíbrio em um tempo factível, e tanto a cinética quanto o equilíbrio podem depender de um número elevado de variáveis, por exemplo, pH, força iônica, tipo de sal e temperatura [16].

No trabalho aqui apresentado, diagramas de equilíbrio de fases de sistemas aquosos contendo lisozima e quatro diferentes sais foram determinados experimentalmente em temperaturas entre 5,0 °C e 25,0 °C. Além disso, a possível relação entre este equilíbrio e a atividade enzimática também foi investigada.

A lisozima de clara de ovo foi selecionada para o estudo por diversas razões. Ela está disponível em alta pureza e a custo acessível e pode ser facilmente precipitada e cristalizada. Os ensaios de precipitação foram conduzidos com sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio. Estes sais foram escolhidos de modo a permitir uma discussão sobre a influência dos cátions ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Na}^+$ ) e ânions ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{NH}_2\text{CO}_2^-$ ) no diagrama de fases. Além disso, o sulfato de amônio é o agente precipitante mais empregado para precipitação de proteínas, o sulfato de sódio é também um agente

precipitante conhecido [17], o cloreto de sódio é usualmente empregado para a precipitação em processos farmacêuticos, e o carbamato de amônio, um sal volátil, tem sido recentemente investigado neste tipo de processo [18].

O primeiro trabalho sobre a cristalização de lisozima pela adição de sais foi publicado por Alderton e Fevold [19], que usaram cloreto de sódio como agente precipitante. Embora o sulfato de amônio seja largamente empregado para a precipitação e cristalização de proteínas, há comparativamente poucos trabalhos sobre a precipitação de lisozima com este sal; Riès-Kautt et al. [20] foram os primeiros a descrever a precipitação de lisozima pela adição de sulfato de amônio. Forsythe et al. [21] cristalizaram lisozima usando sulfato de amônio em soluções de pH variando de 4,0 a 7,8 e observaram que a morfologia do cristal formado depende da concentração inicial da proteína e da temperatura. Em concentrações de proteína inferiores a  $100 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  foram obtidos cristais tetragonais, e em concentrações mais altas (próximas a  $150 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ ), cristais ortorrômnicos. A solubilidade dos cristais de lisozima usualmente decresce com o aumento da concentração de sal, e o fenômeno oposto (*salting-in*) não foi relatado até o momento na literatura aberta [22]. A solubilidade de cristais tetragonais de lisozima não é influenciada pelo pH, enquanto a solubilidade de cristais ortorrômnicos decresce com o aumento do pH [23-25]. A solubilidade de lisozima em água aumenta com o aumento da temperatura, mas a influência da temperatura decresce com o aumento da força iônica [26].

A efetividade de sais em causar a precipitação ou cristalização de proteínas é comumente relacionada ao caráter cosmotrópico de seus ânions, conforme a série de Hofmeister [16]. Diversos pesquisadores [23, 27, 28] observaram que o cloreto é mais efetivo para o *salting-out* da lisozima que o acetato ou o citrato. Este fato indica que na precipitação da lisozima os ânions seguem uma ordem inversa à de Hofmeister:  $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7^- > \text{CH}_3\text{CO}_2^- \sim \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{SO}_4^{2-}$ . Não há uma explicação única e inequívoca para este comportamento, mas Riès-Kautt e Ducruix [29] propuseram algumas explicações. Estes autores observaram que, na precipitação de proteínas, os ânions seguem a série de Hofmeister quando o pH da solução está acima do ponto isoelétrico (pI) da proteína, mas seguem a ordem inversa para valores de pH inferiores ao pI: o ponto isoelétrico da lisozima é aproximadamente 11,3. Riès-Kautt e Ducruix assumiram que os ânions interagem com as proteínas por meio de um mecanismo semelhante à adsorção, provavelmente nos resíduos carregados positivamente. Este

fenômeno diminui a carga líquida (que se torna menos positiva), o que resulta em decréscimo da solubilidade<sup>1</sup>. Boström et al. [30] e Moreira et al. [31] demonstraram que este fenômeno pode ser mais adequadamente entendido por meio de um potencial de dispersão iônica a agir entre cada íon salino e a proteína. As forças de dispersão são oriundas de flutuações eletrodinâmicas e dependem da polarizabilidade de cada íon, ou seja, são muito específicas. Estes autores apresentaram resultados de cálculos do modelo que são consistentes com dados experimentais de lisozima em soluções contendo tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) e cloreto; conforme estes cálculos, os potenciais atrativos de dispersão iônica são mais fortes para o  $\text{SCN}^-$  que para o  $\text{Cl}^-$ . Isso parece uma explicação adequada para o fato de que interações proteína-proteína são mais atrativas em soluções de tiocianatos que de cloretos. Boström et al. [32] assumiram uma adsorção forte de contra-íons  $\text{SCN}^-$  abaixo do pI, o que leva a uma redução do número total de íons no plano intermediário entre as superfícies protéicas e, portanto, a uma redução na repulsão (quando comparada ao caso correspondente dos íons cloreto). Os autores realizaram cálculos para diferentes cátions e notaram que abaixo do pI (situação em que cátions são co-íons), a troca de íons sódio por potássio aumenta a repulsão, o que aparentemente explica os resultados de Riès-Kautt e Ducruix [28] e Bénas et al. [33], de que abaixo do pI a solubilidade da lisozima decresce de acordo com a série de cátions de Hofmeister,  $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Mg}^{2+}$ .

Apesar do efeito de cátions e ânions na solubilidade da lisozima ter sido largamente estudado, diagramas de fase de sistemas contendo sais e lisozima não são bem conhecidos. Informação adicional sobre o comportamento de fases pode ser encontrada em Coen et al. [34], Moretti et al. [15] e Muschol e Rosenberger [35], mas somente Coen et al. [34] apresentam diagramas de fase completos, com a composição de ambas as fases em equilíbrio e a morfologia dos sólidos. Em um trabalho recente, Popova et al. [36] apresentaram dados de equilíbrio sólido-líquido de sistemas contendo sais (sulfato de sódio ou amônio) e lisozima em diferentes valores de pH e usaram uma metodologia (por meio de extrapolação) para determinar a composição da fase sólida,

---

<sup>1</sup> Observe-se que essa é a explicação dada por Riès-Kautt e Ducruix. Como será visto posteriormente (Capítulo 7), uma abordagem diversa indica que a alteração na solubilidade é devida à mudança na fração de moléculas neutras em cada caso.

sendo possível concluir que, neste caso, a composição da fase sólida não depende do pH da fase sobrenadante.

## 4.2. Materiais e métodos

### 4.2.1. Materiais

Lisozima de clara de ovo de galinha (L6876), três vezes cristalizada, submetida à diálise e liofilizada, foi obtida da Sigma (Alemanha e EUA) e utilizada sem purificação adicional. Sulfato de amônio, sulfato de sódio e cloreto de sódio, todos de grau reagente, foram obtidos da Merck (Alemanha), e carbamato de amônio foi obtido da Aldrich (Alemanha). Para os ensaios de atividade enzimática utilizou-se o (substrato) *Micrococcus lysodeikticus* (M3770) da Sigma (EUA). Hidróxido de sódio e ácido fosfórico, utilizados para o ajuste de pH, foram obtidos da Merck (Alemanha). Para o preparo de soluções tampão,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foram obtidos da Riedel-de-Häen e da Merck (Alemanha), e tris-(hidroximetil)-aminometano foi obtido da Merck (Alemanha). Água deionizada em equipamento Milli-Q (Millipore, EUA) foi usada em todos os experimentos.

### 4.2.1. Métodos

*Experimentos de precipitação.* Soluções aquosas de lisozima (frações mássicas entre 5% e 20%<sup>2</sup>) e de sal (frações mássicas: sulfato de sódio, 20%; sulfato de amônio, 40%; cloreto de sódio, 25%, e carbamato de amônio, 35%) eram previamente preparadas. Sistemas eram produzidos pela adição lenta (gota a gota) de diferentes massas de solução salina a diferentes massas de solução de proteína, em tubos de centrífuga de 10 cm<sup>3</sup>, de modo a produzir 5 g de uma mistura de composição desejada. Em sistemas contendo sulfato de sódio, em alguns casos foi necessário adicionar sal em forma cristalina à solução de proteína (para que se obtivessem sistemas com elevada concentração salina), respeitando-se seu limite de solubilidade. A seguir, a mistura era mantida sob agitação em temperatura constante (5,0 °C, 15,0 °C e 25,0 °C) em banho termostático (modelo TE-2000, Tecnal, Brasil) por aproximadamente 24 h para a temperatura de 25,0 °C e de 96 h para os ensaios realizados a 5,0 °C e 15,0 °C. Após atingir o equilíbrio, as fases sobrenadante e precipitado eram separadas por

<sup>2</sup> Todas as porcentagens apresentadas neste capítulo referem-se a frações mássicas.

centrifugação a 2000g durante 3 h (centrífuga 5804R Eppendorf, Alemanha). Com o auxílio de uma seringa acoplada a um filtro de tamanho de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ , a fase sobrenadante era retirada e a massa desta fase, determinada, enquanto que a fase precipitado permanecia no tubo de centrífuga, para posterior dissolução em água e determinação de sua composição.

*Determinação da composição da fase sobrenadante.* Para a determinação da concentração protéica, alíquotas desta fase eram diluídas de 10 a 200 vezes em água e medidas de absorvância, realizadas (em espectrofotômetro DU650 Beckman, EUA). Para baixas concentrações de proteína (de 0,001 mg proteína / g água a 0,1 mg proteína / g água) utilizou-se o comprimento de onda de 205 nm; para concentrações maiores (0,1 mg proteína / g água a 0,8 mg proteína / g água), medidas de absorvância foram realizadas a 280 nm. Curvas de calibração considerando a influência do sal nas absorvâncias a 205 nm e 280 nm foram determinadas (dados não apresentados: cf. Watanabe [37]). Para o sistema lisozima + carbamato de amônio + água, medidas de concentração de proteína foram realizadas utilizando-se apenas o comprimento de onda de 280 nm, devido à elevada influência do sal nas medidas a 205 nm. A concentração dos sais era determinada por medida de condutividade (condutivímetro DM-31 Digimed, Brasil), com curvas de calibração de condutividade em função da concentração adrede preparadas. O efeito da concentração de lisozima na medida de condutividade do sal foi previamente avaliado e considerado desprezível [37]. A incerteza na fração mássica de lisozima é estimada em  $10^{-7}$  em soluções mais diluídas (com concentrações da ordem de  $10^{-5}$ ) e em  $10^{-4}$  em soluções mais concentradas (concentrações da ordem de  $10^{-1}$ ), e a incerteza na fração mássica de sal é estimada em 0,003.

*Determinação da composição da fase precipitado.* A fase precipitado, mantida no tubo de centrífuga após a retirada da fase sobrenadante, era inicialmente dissolvida em água (aproximadamente 5  $\text{cm}^3$ ), e transferida para outro recipiente, de massa previamente conhecida. Este recipiente era levado à liofilização a 1,0 kPa por aproximadamente 72 h (liofilizador L101 Liobras, Brasil). Após este período de tempo, a medida de massa do recipiente contendo proteína e sal, livre de água, era realizada para a determinação da quantidade de água do precipitado (exceto para sistemas contendo carbamato de amônio). A seguir, uma amostra da fase precipitado liofilizada (0,02 g a 0,08 g), livre de água, era dissolvida em aproximadamente 50 g de água para a determinação da concentração de proteína, por meio de medida de absorvância a 280



nm. Quando o sal utilizado era o sulfato de sódio, a quantificação do sal era feita por meio de incineração a 700 °C por aproximadamente 5 h (mufla Heraeus Sepatech, Alemanha), por medida de massa do resíduo final, que consistia apenas de óxido de sódio. Nos sistemas contendo carbamato de amônio, a concentração de sal no precipitado era obtida por balanço de massa. A incerteza experimental da fração mássica de lisozima é estimada em  $5 \cdot 10^{-5}$  (para frações mássicas de 0,05) e 0,001 (para frações mássicas de aproximadamente 0,2), e a incerteza experimental da fração mássica de água é de 0,02.

*Determinação da atividade enzimática da lisozima.* A determinação da atividade enzimática de lisozima foi adaptada do método apresentado por Shugar [38], que consiste no acompanhamento da taxa de degradação do substrato *Micrococcus lysodeikticus* pela proteína, medida por meio da variação da absorbância a 450 nm com o tempo. Em uma cubeta de polipropileno de capacidade 3,0 cm<sup>3</sup> adicionavam-se 0,1 cm<sup>3</sup> de solução de lisozima 0,05 mg·cm<sup>-3</sup> em solução tampão de fosfato de potássio em pH 6,24 de 0,066 mol·L<sup>-1</sup>. Em seguida, adicionavam-se 2,5 cm<sup>3</sup> de solução de *Micrococcus lysodeikticus* 150 µg·cm<sup>-3</sup>, preparado na mesma solução tampão da proteína. Após rápida homogeneização, registrava-se a variação da absorbância a 450 nm durante aproximadamente 5 min, utilizando-se um espectrofotômetro acoplado a um banho termostatizado a 25,0 °C. A unidade de atividade (UA) é dada pela quantidade de lisozima que degrada o *Micrococcus lysodeikticus* a uma taxa de variação de absorbância (a 450 nm) de 0,001 por minuto nestas condições. A atividade específica, que expressa o número de unidades de atividade por miligrama de proteína é dada pela expressão:

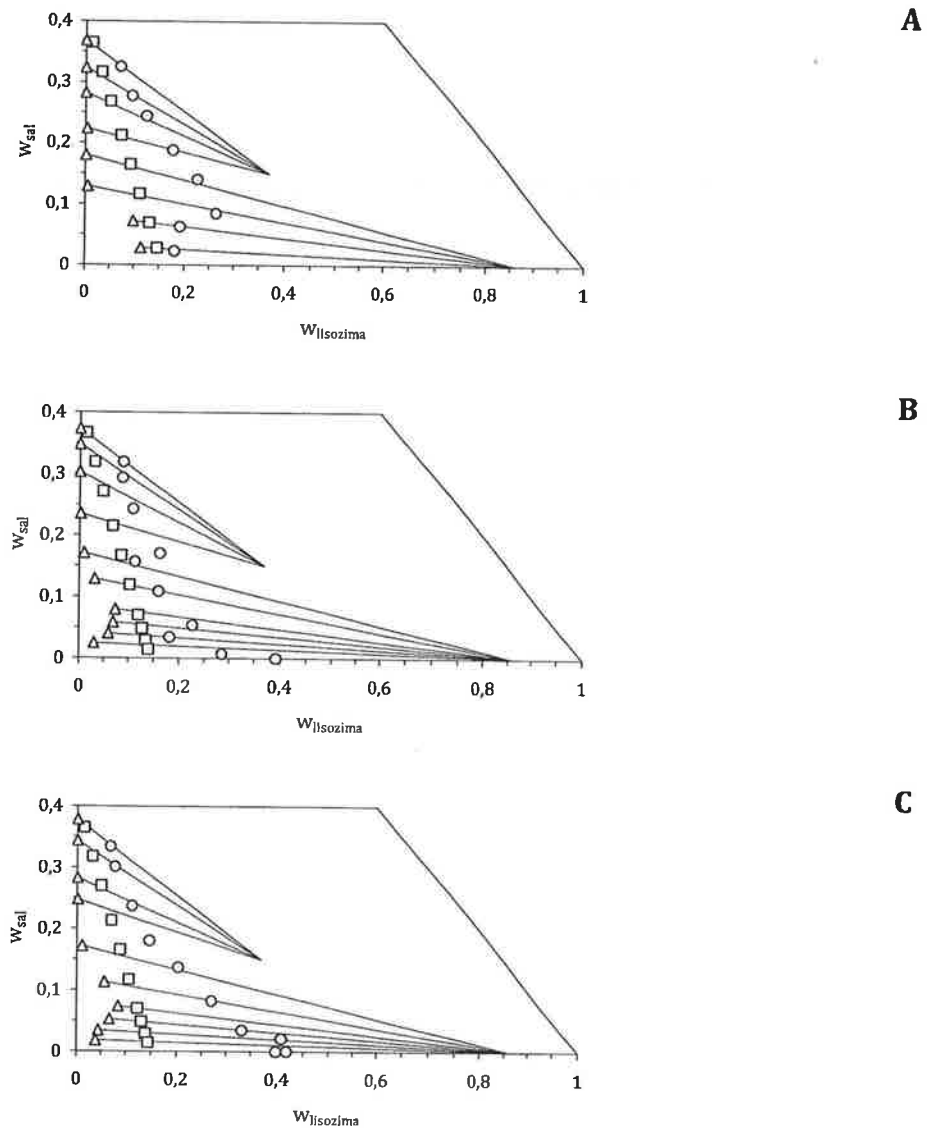
$$\text{Atividade específica (UA} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{\Delta A_{450\text{nm}} / t}{0,001 \cdot V_{\text{lisozima}} \cdot C_{\text{lisozima}}} \quad (4.1)$$

em que  $\Delta A_{450}/t$  é a inclinação obtida da curva absorbância a 450 nm em função do tempo;  $V_{\text{lisozima}}$  é o volume de lisozima adicionado na reação de hidrólise (0,1 cm<sup>3</sup>);  $C_{\text{lisozima}}$  é a concentração de lisozima da solução enzimática (mg·cm<sup>-3</sup>). Ensaios preliminares foram realizados para avaliar a faixa operacional da taxa de reação e a influência de sais eventualmente remanescentes na atividade da enzima [37].

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Sistema lisozima + sulfato de amônio + água

Os resultados experimentais para o sistema lisozima + sulfato de amônio + água são apresentados na Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Diagrama de fases do sistema lisozima + água + sulfato de amônio em pH 7,0.

A: 25,0 °C, B: 15,0 °C e C: 5,0 °C. Composição global ( $\square$ ), composição do sobrenadante ( $\triangle$ ) e composição do precipitado ( $\circ$ ) conectadas por linhas de amarração (—).

Os diagramas de fase podem ser analisados conforme uma técnica apresentada previamente pelo mesmo grupo de pesquisa [36], que consiste fundamentalmente no fato de que a composição (experimentalmente determinada) da fase precipitado

corresponde à composição de uma mistura de duas fases: a fase sobrenadante e o *precipitado verdadeiro*, isto é, a fase sólida (cuja composição não pode ser experimentalmente determinada, pela impossibilidade de separá-la completamente do sobrenadante). A extensão das várias linhas de amarração converge para um único ponto em regiões específicas do diagrama de fases, e este ponto representa a composição do precipitado verdadeiro.

O diagrama de fases deste sistema a 25,0 °C (Figura 4.1A) revela dois pontos de intersecção de linhas de amarração: em baixas concentrações salinas, o precipitado verdadeiro é um sólido livre de sal (86% de lisozima e 14% de água), e em concentrações salinas maiores, o precipitado verdadeiro é um complexo contendo aproximadamente 37% de lisozima e 14% de sal. A concentração de lisozima na fase sobrenadante decresce com o aumento da concentração salina, como esperado, e a concentração protéica da fase sobrenadante que coexiste com o precipitado verdadeiro contendo lisozima, sal e água é em muitos casos consideravelmente menor que aquela da fase sobrenadante que coexiste com o precipitado livre de sal.

Grande parte da literatura sobre o equilíbrio de fases de soluções protéicas discute apenas o conteúdo de proteína na fase sobrenadante, assumindo que o precipitado é constituído de proteína pura sólida [17, 39, 40]. Os resultados deste trabalho, bem como os resultados anteriores [36], mostram que isso não é válido para todos os sistemas e condições.

Enquanto a existência de um precipitado livre de sal poderia ser prevista, a ocorrência de um segundo precipitado verdadeiro, contendo uma grande quantidade de sal, era inesperada. Analisando apenas as composições de equilíbrio não é possível discernir se o sal é precipitado na forma de cristais salinos adsorvidos em um complexo lisozima + água ou se de algum modo é co-precipitado, resultando em um novo complexo contendo proteína, sal e água. Entretanto, há evidência em favor da segunda hipótese: o fato de que a razão entre lisozima e água é diferente em ambos os precipitados, e o fato de que há um ponto nítido de convergência, o que significa uma razão entre proteína e sal bem definida. Um mecanismo provável para o surgimento deste precipitado verdadeiro pode ser uma reação semelhante à adsorção de ânions salinos em resíduos básicos de lisozima – o mesmo mecanismo responsável pelo fato de a lisozima seguir a ordem inversa de Hofmeister em valores de pH inferiores ao pI, como é o caso.

A análise da atividade enzimática da lisozima foi feita com misturas em pH 7,0 e 25,0 °C para duas composições globais diferentes (uma na região de alta concentração salina e outra na região de baixa concentração salina), correspondentes a dois diferentes precipitados verdadeiros. Na Tabela 4.1 apresentam-se os resultados para os balanços de atividade; enquanto 85% da atividade enzimática é recuperada no sistema com baixa fração de sal, apenas 26% da atividade é recuperada no sistema com alta fração de sal. Resultados para o balanço de massa [37] confirmam que não há perda de proteína (considerando a incerteza experimental). Assim, a precipitação com altas concentrações de sulfato de amônio ocasiona a desnaturação da lisozima.

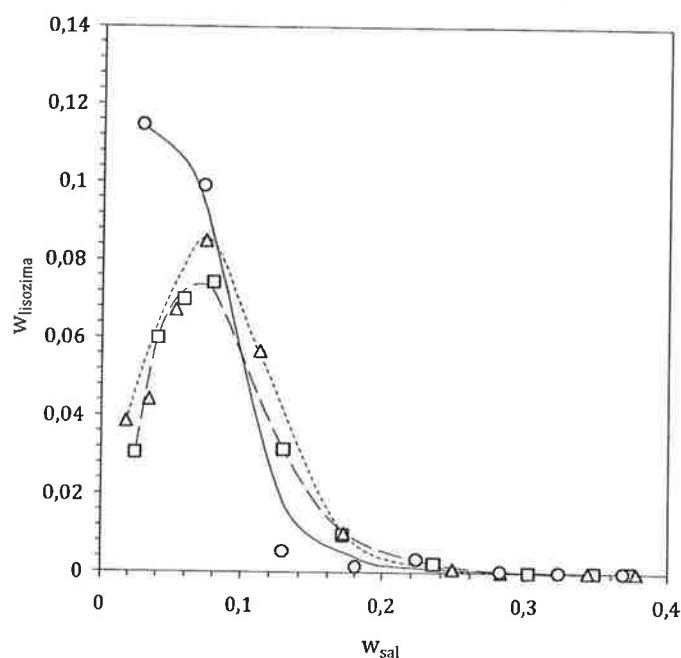
**Tabela 4.1.** Balanço de atividade de lisozima para sistemas lisozima + sal + água em diferentes temperaturas. Sistemas em pH 7,0 (sulfato de amônio, sulfato de sódio e cloreto de sódio) e 9,4 (carbamato de amônio).

Sal	T / °C	Região <sup>a</sup>	Atividade de lisozima / UA		
			Sobrenadante	Precipitado	Total
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,0	Alta	1,6 (0,06%) <sup>b</sup>	700 (25%)	700 (25%)
		Baixa	390 (5%)	6800 (85%)	7200 (90%)
	25,0	Alta	1,6 (0,06%)	460 (26%)	460 (26%)
		Baixa	390 (6%)	5600 (79%)	6000 (85%)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25,0	Alta	0,7 (0,03%)	830 (35%)	830 (35%)
		Baixa	230 (4%)	4500 (78%)	4700 (82%)
NaCl	15,0	Alta	17,0 (1%)	1200 (44%)	1200 (45%)
		Baixa	80 (1%)	6500 (91%)	6600 (92%)
	25,0	Alta	6,4 (0,24%)	1000 (39%)	1000 (39%)
NH <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> COO	5,0	Alta	14 (0,4%)	3100 (95%)	3100 (95%)
		Baixa	50 (0,6%)	7100 (95%)	7200 (96%)
	25,0	Alta	2 (0,1%)	3300 (100%)	3300 (100%)

<sup>a</sup> - Referentes à concentração de sal na alimentação.

<sup>b</sup> - Valores entre parênteses relacionam-se à atividade total alimentada (calculada a partir da massa dos sistemas e considerando uma atividade específica de 19500 UA·mg<sup>-1</sup>).

Para verificar o efeito da temperatura no equilíbrio de fases, experimentos foram realizados a 5,0 °C e 15,0 °C (Figura 4.1B-C). Não há mudança apreciável no diagrama pela redução da temperatura: também nestes casos há a precipitação de um hidrato de lisozima livre de sal em baixas concentrações salinas e de um complexo contendo proteína, sal e água em altas concentrações salinas. Assume-se que os precipitados das Figuras 4.1B-C têm a mesma estequiometria daqueles dos experimentos a 25,0 °C. O efeito da concentração de sulfato de amônio sobre a concentração de lisozima no sobrenadante é apresentado na Figura 4.2. Uma diferença significativa (mas esperada) entre as curvas é o fato de que a solubilidade do precipitado livre de sal decresce com o decréscimo da temperatura até frações mássicas de sulfato de amônio de 8%. A solubilidade do complexo contendo sal é pequena em todas as temperaturas.



**Figura 4.2.** Solubilidade de lisozima em soluções aquosas de sulfato de amônio: 25,0 °C (○), 15,0 °C (□), 5,0 °C (△). Linhas traçadas para ajudar a visualização: 25,0 °C (—○—), 15,0 °C (---□---), 5,0 °C (···△···).

Em concentrações salinas baixas (até aproximadamente 8%) a presença de sulfato de amônio aumenta a solubilidade da lisozima, isto é, ocorre o *salting-in*: a solubilidade de lisozima passa por um máximo (atingindo solubilidades próximas a 9%) para decrescer até concentrações muito baixas (inferiores a 0,05% para concentrações

de sulfato de amônio superiores a 20%). Deve-se mencionar que o *salting-in* em baixas concentrações de sulfato de amônio não ocorre nos dados de Moretti et al. [15].

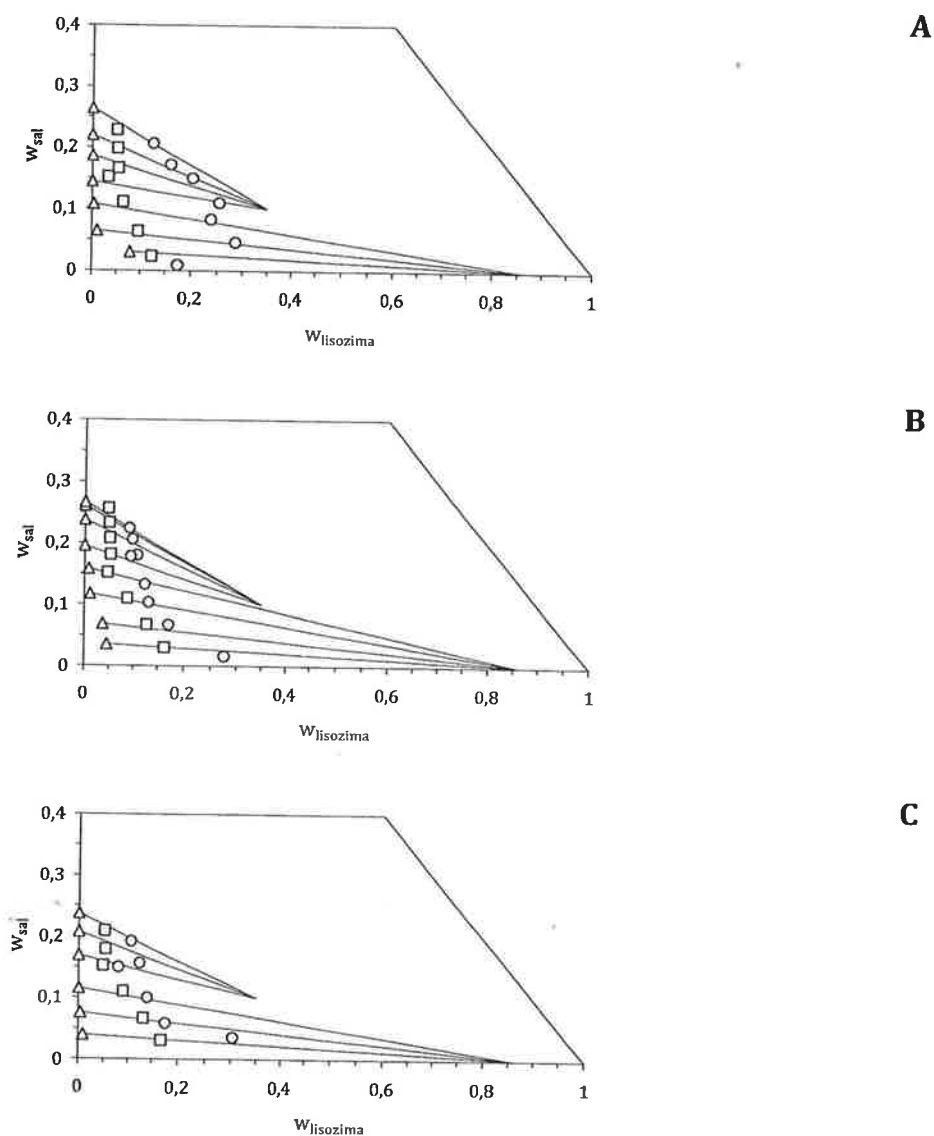
Os dois diferentes precipitados verdadeiros podem possuir diferentes estruturas cristalinas. Conforme Forsythe et al. [21], a morfologia do cristal varia com a concentração de proteína e com a temperatura: estes autores relataram a formação de cristais tetragonais em baixas concentrações protéicas e em baixas temperaturas (abaixo de 20 °C), e a formação de cristais ortorrômbicos em concentrações altas de lisozima e temperaturas acima de 25 °C. Riès-Kautt e Ducruix [41] observaram que a solubilidade dos cristais tetragonais de lisozima é inferior àquela dos cristais ortorrômbicos. Os resultados aqui apresentados poderiam confirmar estas inferências, mas não é possível discernir de maneira inequívoca, apenas a partir deles, entre as formas cristalinas – nem sequer se o precipitado é cristalino ou amorfo. A Tabela 4.1 também apresenta o balanço de atividade para dois pontos experimentais a 5,0 °C – em situações de baixa e alta concentração de sal. Estes resultados também confirmam que a precipitação com altas concentrações salinas reduz significativamente a recuperação de atividade (recuperação de 25% em alta concentração salina e 90% em baixa concentração). Balanços de massa realizados, com medida cuidadosa das quantidades protéicas, permitiram confirmar que este decréscimo não pode ser associado à perda de massa [37].

#### 4.3.2. Sistema lisozima + sulfato de sódio + água

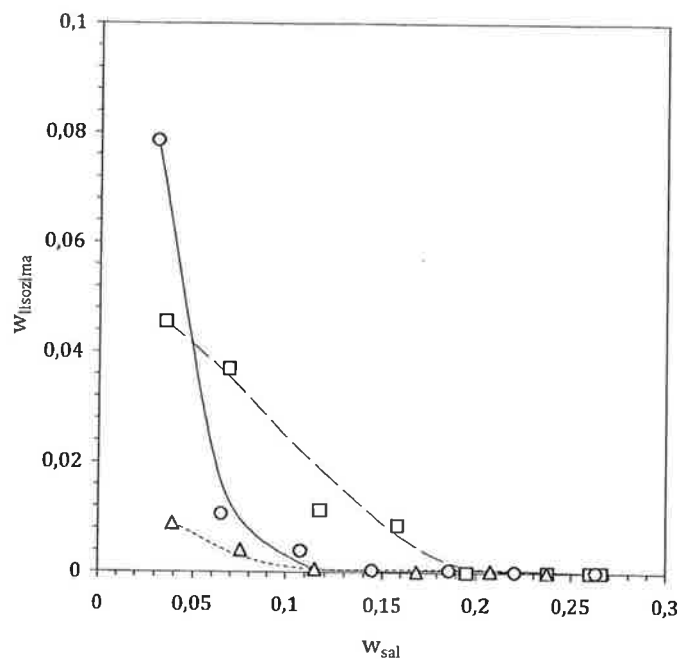
Os resultados experimentais para a precipitação de lisozima com sulfato de sódio em pH 7,0 e temperaturas de 5,0 °C, 15,0 °C e 25,0 °C são apresentados na Figura 4.3. O comportamento é semelhante aos sistemas com sulfato de amônio, com a determinação de dois precipitados verdadeiros: um hidrato de lisozima (86% de lisozima) em baixas concentrações salinas, e em complexo contendo lisozima, água e sal (aproximadamente 35% de lisozima e 10% de sulfato de sódio) em altas concentrações salinas. Considerando-se as incertezas experimentais, a estequiometria destes precipitados não depende da temperatura.

O efeito da concentração do sulfato de sódio e o efeito da temperatura na concentração de lisozima no sobrenadante (Figura 4.4) são semelhantes àqueles em sistemas contendo sulfato de amônio (Figura 4.2), exceto pelo fato de que não há, neste caso, uma região de *salting-in* na faixa de concentrações investigadas (superior a 3% de

sal). A temperatura tem influência mais significativa na solubilidade em baixas concentrações salinas, quando se comparam os dados com os de sistemas contendo sulfato de amônio, algo que foi também relatado por Howard et al. [26]. Como apresentado na Tabela 4.1, o balanço de atividade enzimática também é semelhante ao de sistemas contendo sulfato de amônio.



**Figura 4.3.** Diagrama de fases do sistema lisozima + água + sulfato de sódio em pH 7,0. A: 25,0 °C, B: 15,0 °C e C: 5,0 °C. Composição global ( $\square$ ), composição do sobrenadante ( $\triangle$ ) e composição do precipitado ( $\circ$ ) conectadas por linhas de amarração (—).



**Figura 4.4.** Solubilidade de lisozima em soluções aquosas de sulfato de sódio: 25,0 °C (○), 15,0 °C (□), 5,0 °C (△). Linhas traçadas para ajudar a visualização: 25,0 °C (—○—), 15,0 °C (---□---), 5,0 °C (···△···).

Como o sulfato é o ânion comum a ambos os sais, pode-se comparar a influência de ambos os cátions. Na série de Hofmeister, ânions têm um efeito mais pronunciado que cátions, embora a solubilidade de proteínas em soluções aquosas de eletrólitos possa variar por um fator de dez, para a mesma força iônica, para diferentes cátions [33]. Também nesta série, o íon sódio é mais eficiente que o amônio para a indução do *salting-out*. Uma comparação quantitativa pode ser feita por meio da chamada *constante de salting-out*,  $K_s$ , conforme definida por Melander e Horváth [42]. O valor desta constante de *salting-out* é obtido por meio da equação de Cohn, que relaciona o logaritmo da solubilidade da proteína ( $S$ ) à concentração do sal ( $C_{sal}$ ) em forma adimensional:

$$\log \frac{S}{(g \cdot g^{-1})} = \beta - K_s \frac{C_{sal}}{(g \cdot g^{-1})} \quad (4.2)$$

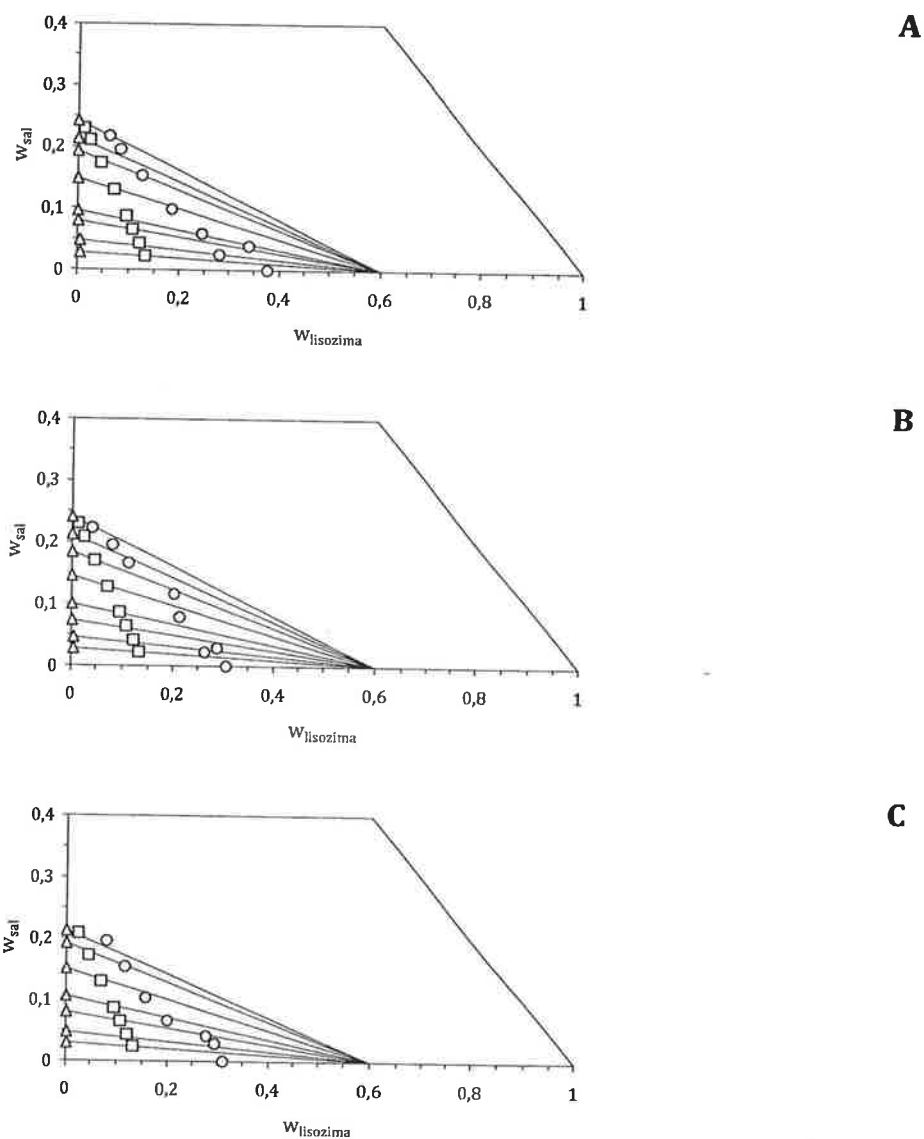
em que  $\beta$  é uma constante específica da proteína, dependente de temperatura e pH (e, na prática, embora não em teoria, também do sal), enquanto a constante de *salting-out*  $K_s$  é dependente do sal e da proteína em questão. Os dados experimentais indicam que a constante da lisozima em sulfato de sódio a 15,0 °C é 17,4, enquanto que para o sulfato



de amônio este valor é 13,9. Isso é indicativo de que o sulfato de sódio é mais efetivo que o de amônio para a precipitação de lisozima, o que pode ser a razão de não haver região de *salting-in* na Figura 4.4.

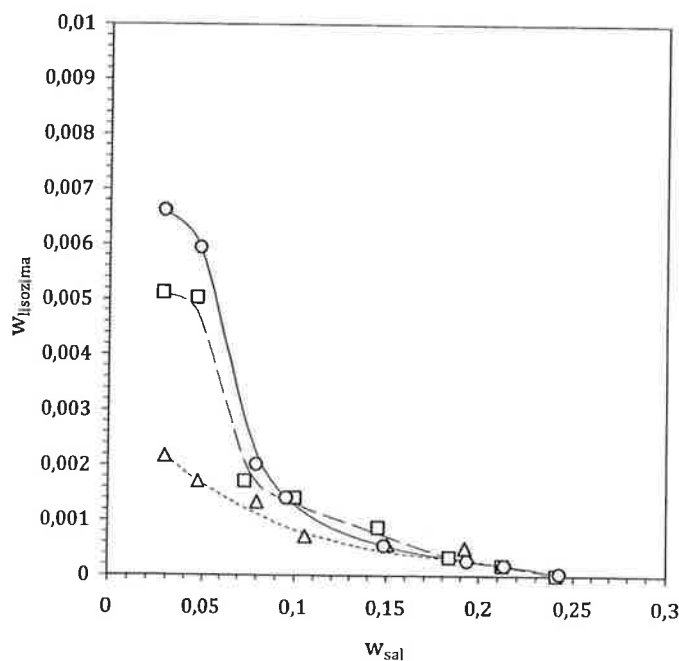
#### 4.3.3. Sistema lisozima + cloreto de sódio + água

Os resultados da precipitação de lisozima com cloreto de sódio são apresentados na Figura 4.5.



**Figura 4.5.** Diagrama de fases do sistema lisozima + água + cloreto de sódio em pH 7,0. A: 25,0 °C, B: 15,0 °C e C: 5,0 °C. Composição global ( $\square$ ), composição do sobrenadante ( $\triangle$ ) e composição do precipitado ( $\circ$ ) conectadas por linhas de amarração (—).

A principal diferença entre os resultados anteriormente apresentados e estes é o fato de que há um único precipitado verdadeiro: em todas as temperaturas, as linhas de amarração convergem para um hidrato livre de sal com aproximadamente 60% de lisozima. Como, no limite em que a concentração de sal tende a zero, os precipitados verdadeiros deveriam ser os mesmos (independentemente do sal), pode-se inferir que um dos dois hidratos é, em verdade, uma fase metaestável. Não é possível discernir qual seja, pois ambos os estados são mutuamente acessíveis, mas os resultados combinados sugerem que a composição obtida para os sistemas contendo cloreto de sódio corresponda à fase metaestável.



**Figura 4.6.** Solubilidade de lisozima em soluções aquosas de cloreto de sódio: 25,0 °C (○), 15,0 °C (□), 5,0 °C (△). Linhas traçadas para ajudar a visualização: 25,0 °C (—○—), 15,0 °C (---□---), 5,0 °C (···△···).

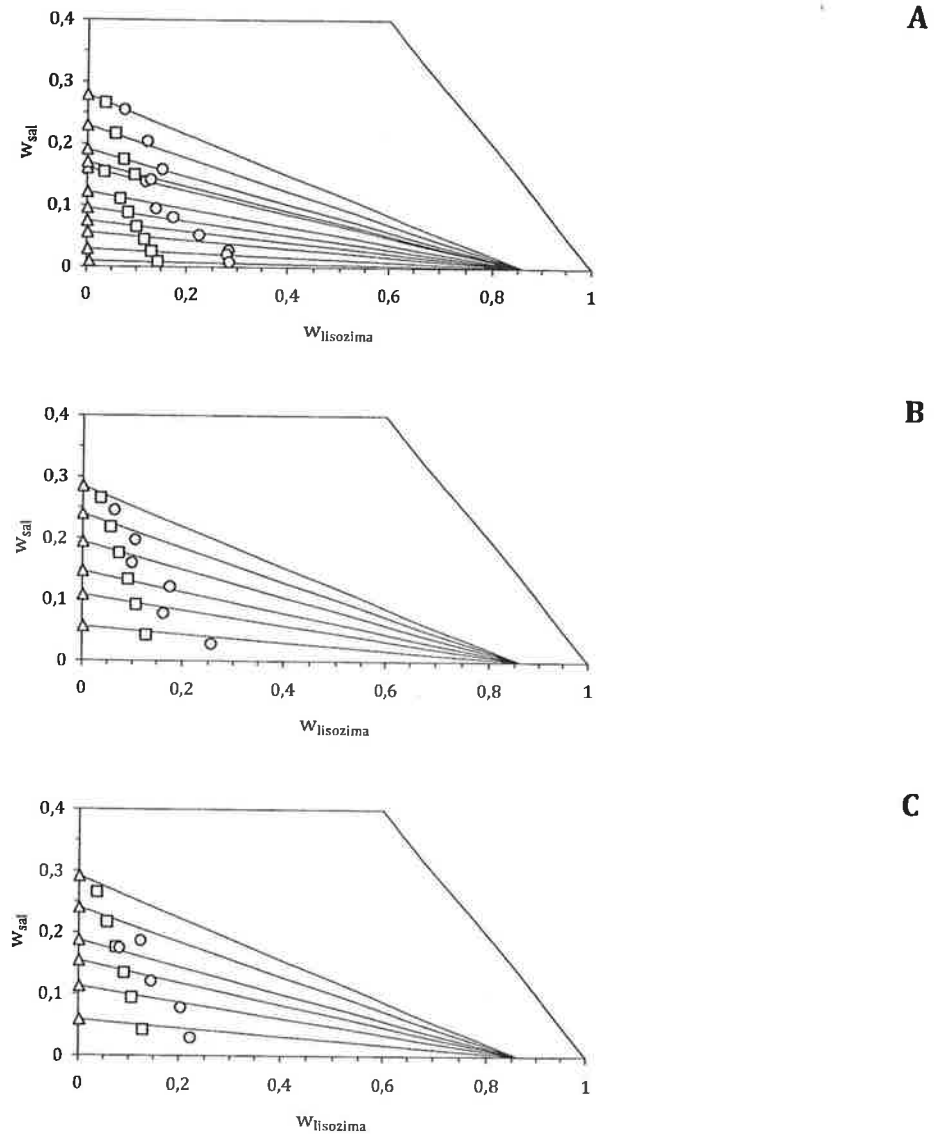
O balanço para a atividade enzimática da lisozima tem concordância qualitativa com os resultados para os sistemas contendo sulfatos (Tabela 4.1): considerando a incerteza experimental, toda lisozima alimentada é recuperada [37], mas a precipitação a partir de uma fase rica em sal reduz a atividade enzimática em aproximadamente 40% a 55%. O efeito do cloreto de sódio e da temperatura na concentração de proteína na fase sobrenadante é mostrado na Figura 4.6. O cloreto de sódio apresentou um efeito *salting-out* bastante pronunciado, o que concorda com resultados previamente

apresentados por Retailleau et al. [22] para a solubilidade de lisozima em soluções aquosas de cloreto de sódio na faixa de pH entre 3,0 e 9,0. Em comparação com o sulfato de sódio, uma mesma fração mássica de cloreto de sódio (e aproximadamente a mesma força iônica) reduz a solubilidade de lisozima por um fator de 10 a 20. Por exemplo, a 25,0 °C e fração mássica de aproximadamente 3% de sal, a concentração de lisozima na fase sobrenadante é de 8% em soluções de sulfato de sódio e 12% em sulfato de amônio, mas apenas 0,7% em soluções de cloreto de sódio. Estes resultados são consistentes com observações de Retailleau et al. [27], Riès-Kautt and Ducruix [28] e Guilloteau et al. [43], e confirmam o fato de que a solubilidade de lisozima (em pH inferior ao pI) segue o inverso da série de Hofmeister. O decréscimo de temperatura de 25,0 °C para 5,0 °C resulta, neste caso, em redução na solubilidade de lisozima por um fator de aproximadamente três, o que está em conformidade com dados de Cacciopo e Pusey [24], Guilloteau et al. [43] e Rosenberger et al. [44]. O efeito do cloreto de sódio na precipitação de lisozima na faixa de pH entre 4,0 e 7,0 foi estudado anteriormente por Berthou e Jollès [45], que relataram a formação de cristais tetragonais em temperaturas de -36 °C a 25 °C e cristais ortorrômbicos em temperaturas de 25 °C a 60 °C. Assim, poder-se-ia assumir que o precipitado verdadeiro encontrado neste trabalho consiste em cristais tetragonais; o fato de que o precipitado obtido a 25,0 °C tem a mesma estequiometria que a 5,0 °C, leva a que se infira que cristais ortorrômbicos serão estáveis somente em temperaturas superiores a 25,0 °C. Esta hipótese é apoiada por relatos de diversos outros grupos [25, 43, 46, 47], que relataram a formação de cristais ortorrômbicos apenas em temperaturas superiores a 30 °C. Deve-se mencionar também que efeitos cinéticos também podem ter papel importante no tipo de cristal formado. Berthou e Jollès [45] relataram a formação de cristais tetragonais de lisozima a 20 °C em intervalos curtos de tempo (entre 3 h e 6 h), enquanto cristais ortorrômbicos foram obtidos a 40 °C quando se permitia ao precipitado um tempo maior (entre 6 e 30 dias). A transição lenta entre cristais tetragonais e ortorrômbicos também foi descrita por Ataka e Asai [48], que relataram a formação de cristais ortorrômbicos após 15 dias.

#### 4.3.4. Sistema lisozima + carbamato de amônio + água

Os resultados experimentais para a composição das fases coexistentes em sistemas contendo lisozima, carbamato de amônio e água são apresentados na Figura 4.7. Em todas as temperaturas investigadas houve a formação de um único precipitado

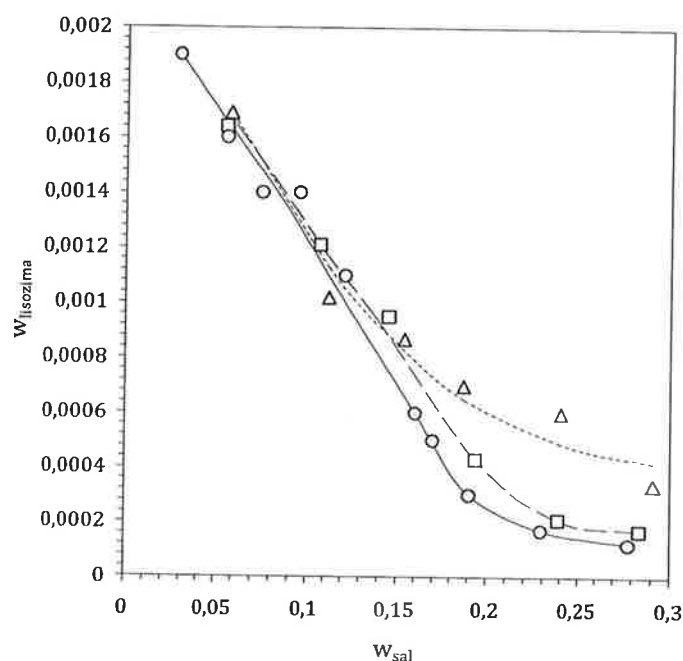
verdadeiro, um hidrato de lisozima livre de sal com estequiometria análoga àquela do hidrato obtido em sistemas contendo sulfato de amônio ou sódio. Como em sistemas contendo cloreto de sódio, também neste caso não houve a formação de um complexo contendo lisozima, sal e água. Ao menos em um caso específico a concentração da fase precipitado não pôde ser obtida com suficiente precisão, não sendo apresentada na Figura 4.7C (sistema com maior concentração de sal).



**Figura 4.7.** Diagrama de fases do sistema lisozima + água + carbamato de amônio. A: 25,0 °C, B: 15,0 °C e C: 5,0 °C. Composição global ( $\square$ ), composição do sobrenadante ( $\triangle$ ) e composição do precipitado ( $\circ$ ) conectadas por linhas de amarração (—).

A influência da concentração de carbamato de amônio e da temperatura na concentração protéica no sobrenadante é apresentada na Figura 4.8. Além da ocorrência

evidente de *salting-out*, nota-se que a solubilidade aumenta com o decréscimo da temperatura, um comportamento retrógrado. Este comportamento não é usual, mas também não é raro<sup>3</sup>. Em um estudo específico sobre a influência da temperatura na solubilidade de proteínas, Christopher et al. [49] observaram a ocorrência de comportamento retrógrado em 13 de 24 proteínas investigadas. Os dados anteriormente apresentados para a solubilidade de lisozima em soluções de sulfato de amônio, sulfato de sódio e cloreto de sódio não mostram comportamento retrógrado; em soluções de para-tolueno-sulfonato de sódio e tiocianato de sódio tampouco ocorre [49]. Assim, é provável que este comportamento retrógrado esteja relacionado ao sal: o equilíbrio químico apresentado nas equações (3.1) a (3.4), no Capítulo 3, altera-se com a mudança de temperatura, o que pode influenciar a solubilidade da proteína.



**Figura 4.8.** Solubilidade de lisozima em soluções aquosas de carbamato de amônio: 25,0 °C (○), 15,0 °C (□), 5,0 °C (△). Linhas traçadas para ajudar a visualização: 25,0 °C (—○—), 15,0 °C (---□---), 5,0 °C (···△···).

Na Tabela 4.1 apresentam-se também os resultados do balanço de atividade enzimática da lisozima a 5,0 °C e 25,0 °C. Considerando as incertezas experimentais, não houve perda de atividade enzimática, mesmo em concentrações mais altas de sal, o que

<sup>3</sup> Antecipa-se que será observado para a insulina em soluções de NaHCO<sub>3</sub> com CO<sub>2</sub> pressurizado (Capítulo 5 desta tese).

evidencia um comportamento distinto dos outros sais investigados neste trabalho. Esta manutenção de atividade também ocorreu na precipitação de tripsina com carbamato de amônio [18]. Deve-se salientar, entretanto, que estudo específico sobre a estabilidade de enzimas mostrou que a manutenção de atividade enzimática em soluções deste sal depende de qual enzima é considerada, não sendo possível estabelecer uma relação inequívoca entre seu caráter como agente precipitante e a manutenção de atividade em suas soluções [50].

#### 4.4. Conclusões

Os resultados experimentais para a precipitação de lisozima induzida pela adição de sais e a interpretação dos resultados de um ponto de vista de equilíbrio de fases mostraram que a fase precipitado cuja composição é determinada experimentalmente é na verdade uma mistura da fase sobrenadante (relativamente pobre em proteína) e um precipitado sólido (chamado precipitado verdadeiro). Em sistemas contendo sulfato de amônio ou de sódio houve a formação de dois precipitados verdadeiros: em baixas concentrações salinas o precipitado é um hidrato de lisozima livre de sal, e em altas concentrações salinas, o precipitado é um complexo contendo sal, proteína e água. Com o cloreto de sódio e o carbamato de amônio, apenas um precipitado verdadeiro foi formado em cada caso: com o carbamato de amônio, o mesmo hidrato livre de sal obtido na precipitação com sulfatos (86% de proteína), e com o cloreto de sódio, um hidrato livre de sal com fração menor de proteína (60%), o que pode mostrar, neste último caso, a formação de fase metaestável. Na faixa de temperaturas investigadas (5,0 °C, 15,0 °C e 25,0 °C), a influência da temperatura na composição do precipitado verdadeiro é negligenciável, embora não o seja sobre a solubilidade da enzima.

O balanço de atividade mostrou que, exceto para o carbamato de amônio, a perda de atividade causada pela precipitação é menor quando a concentração de sal é menor (e o precipitado é um hidrato livre de sal), sendo maior quando o precipitado é o complexo contendo sal. Para o cloreto de sódio, altas concentrações salinas resultaram em perda de atividade, mesmo que o precipitado verdadeiro fosse um hidrato livre de sal, e para o carbamato de amônio não houve perda significativa de atividade.

#### 4.5. Nota adicional

Uma discussão posterior sobre as hipóteses deste trabalho (durante o V CBTermo, realizado em Foz do Iguaçu, setembro de 2010) questionou a existência de um único precipitado verdadeiro com base na regra das fases de Gibbs. A argumentação seria de que, em uma situação em que o precipitado verdadeiro contivesse simultaneamente água, lisozima e sal, não haveria graus de liberdade restantes: o potencial químico destes compostos seria constante na fase sobrenadante, e sua composição, por consequência, deveria ser única. A argumentação contrária, de que a abordagem *não* viola a regra de fases de Gibbs, ilustra algumas questões a respeito e pode auxiliar a compreensão dos fundamentos da técnica, razão pela qual é aqui apresentada.

Inicialmente, note-se que é necessário considerar que o precipitado verdadeiro tenha uma identidade química diversa de seus constituintes, ou seja, que a fase sólida seja constituída por um componente diverso dos componentes puros. Isso é claro (e não somente nesta situação) pelo fato de a água estar presente na fase sólida, de modo que considerar o precipitado verdadeiro como um novo composto não é um constructo.

Considere-se, por hipótese, a formação de um precipitado verdadeiro contendo simultaneamente proteína (P), água (W) e sal (Z); pode-se escrever o seguinte equilíbrio químico:



em que  $n$  e  $m$  seriam as proporções de sal e água no precipitado verdadeiro. O equilíbrio químico definido na equação (4.2) não leva necessariamente à constância dos potenciais químicos em fase líquida, pelo contrário – a relação de equilíbrio resultante é<sup>4</sup>:

$$-\hat{\mu}_P - n\hat{\mu}_Z - m\hat{\mu}_W + \mu_{P(Z)_n(W)_m} = 0 \quad (4.3)$$

de modo que é a soma  $\hat{\mu}_P + n\hat{\mu}_Z + m\hat{\mu}_W$  que deve permanecer constante.

Analisando-se a regra das fases de Gibbs, teríamos um sistema quaternário em equilíbrio bifásico com uma reação química, resultando em três graus de liberdade. A temperatura e a pressão são definidas *a priori*, restando um grau de liberdade: a fração de sal na fase sobrenadante pode ser a variável a definir o estado, em concordância com a definição clássica de solubilidade (para cada concentração de sal existe uma

<sup>4</sup> Nesta equação,  $\hat{\mu}$  é o potencial químico de composto em mistura, e  $\mu$  é o potencial químico de composto puro.

concentração de proteína em equilíbrio). O raciocínio não se altera no caso de um precipitado livre de sal – apenas, neste caso, tem-se  $n = 0$ .

Finalmente, cabe mencionar que a técnica de extrapolação de linhas de amarração também foi usada em sistemas contendo um polímero neutro (PEG) e albumina de soro bovino, no trabalho de mestrado de Carlos Eduardo K. M. A. C. Jordão [51], com resultados também significativos. Nesse caso, não se esperava (como se não observou) a formação de um complexo em fase sólida; entretanto, os resultados possibilitaram conhecer o estado de hidratação do precipitado.

#### 4.6. Referências

- [1] Curtis RA, Ulrich J, Montaser A, Prausnitz JM, Blanch HW, Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solution, *Biotechnol. Bioeng.*, **79**, 367-380, 2002.
- [2] Curtis RA, Lue L, A molecular approach to bioseparations: protein-protein and protein-salt interactions, *Chem. Eng. Sci.*, **61**, 907-923, 2006.
- [3] von Solms NS, Anderson CO, Blanch HW, Prausnitz JM, Molecular thermodynamics for fluid-phase equilibria in aqueous two-protein systems, *AIChE J.*, **48**, 1292-1300, 2002.
- [4] Asherie N, Protein crystallization and phase diagrams, *Methods*, **34**, 266-272, 2004.
- [5] Dixon M, Webb EC, Enzyme fractionation by salting-out: a theoretical note, *Adv. Protein Chem.*, **16**, 197-219, 1961.
- [6] Green AA, Studies in the physical chemistry of the proteins: X. The solubility of hemoglobin in solutions of chlorides and sulfates of varying concentration, *J. Biol. Chem.*, **95**, 47-66, 1932.
- [7] Legrand L, Riès-Kautt M, Robert MC, Two polymorphs of lysozyme nitrate: temperature dependence of their solubility, *Acta Crystallogr. D*, **58**, 1564-1567, 2002.
- [8] Shiau K-S, Chen T-L, Initial protein concentration effects on precipitation by salt, *Biotechnol. Bioeng.*, **53**, 202-206, 1997.
- [9] Shih YC, Prausnitz JM, Blanch HW, Some characteristics of protein precipitation by salts, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1155-1164, 1992.
- [10] Foster PR, Dunnill P, Lilly MD, The kinetics of protein salting-out: precipitation of yeast enzymes by ammonium sulfate, *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 545-580, 1976.
- [11] Nelson CD, Glatz CE, Primary particle formation in protein precipitation, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1434-1444, 1985.



- [12] Przybycien TM, Bailey JE, Aggregation kinetics in salt-induced protein precipitation, *AIChE J.*, **35**, 1779-1790, 1989.
- [13] Dervichian DG, Phasengleichgewicht in kolloiden Lösungen, *Kolloid-Zeit.*, **115**, 76-82, 1949.
- [14] Dervichian DG, Mossé J, Equilibrés de phases dans les systèmes protéine-sel-eau. Conséquences relatives a la solubilité des protéines, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 1287-1308, 1953.
- [15] Moretti JJ, Sandler SI, Lenhoff AM, Phase equilibria in the lysozyme-ammonium sulfate-water system, *Biotechnol. Bioeng.*, **70**, 498-506, 2000.
- [16] Cheng Y-C, Lobo RF, Sandler SI, Lenhoff AM, Kinetics and equilibria of lysozyme precipitation and crystallization in concentrated ammonium sulfate solutions, *Biotechnol. Bioeng.*, **94**, 177-188, 2006.
- [17] Arakawa T, Timasheff GN, Theory of protein solubility, *Methods Enzymol.*, **114**, 49-77, 1985.
- [18] Watanabe EO, Pessôa Filho PA, Miranda EA, Mohamed RS, Evaluation of the use of volatile electrolyte system produced by ammonia and carbon dioxide in water for the salting-out of proteins: precipitation of porcine trypsin. *Biochem. Eng. J.*, **30**, 124-129, 2006.
- [19] Alderton G, Fevold HL, Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystalline salts of lysozyme, *J. Biol. Chem.*, **164**, 1-5, 1946.
- [20] Riès-Kautt M, Ducruix A, van Dorsselaer A, Crystallization of previously desalted lysozyme in the presence of sulfate ions, *Acta Crystallogr. D*, **50**, 366-369, 1994.
- [21] Forsythe E, Snell EH, Pusey ML, Crystallization of chicken egg-lysozyme from ammonium sulfate, *Acta Crystallogr. D*, **53**, 795-797, 1997.
- [22] Retailleau P, Riès-Kautt M, Ducruix A, No salting-in of lysozyme chloride observed at low ionic strength over a large range of pH, *Biophys. J.*, **73**, 2156-2163, 1997.
- [23] Ataka M, Tanaka S, The growth of large single crystals of lysozyme, *Biopolymers*, **25**, 337-350, 1986.
- [24] Cacciopo E, Pusey ML, The solubility of the tetragonal form of hen egg white lysozyme from pH 4.0 to 5.4, *J. Cryst. Growth*, **1** atrativos **14**, 286-292, 1991.
- [25] Ewing F, Forsythe E, Pusey ML, Orthohombic lysozyme solubility, *Acta Crystallogr. D*, **50**, 424-428, 1994.

- [26] Howard SB, Twigg PJ, Baird JK, Meehan EJ, The solubility of hen egg-white lysozyme, *J. Cryst. Growth*, **90**, 94-104, 1988.
- [27] Retailleau P, Ducruix A, Riès-Kautt M, Importance of the nature of anions in lysozyme crystallisation correlated with protein net charge variation, *Acta Crystallogr. D*, **58**, 1576-1581, 2002.
- [28] Riès-Kautt M, Ducruix AF, Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme, *J. Biol. Chem.*, **264**, 745-748, 1989.
- [29] Riès-Kautt M, Ducruix AF, Inferences drawn from physicochemical studies of crystallogenesis and precrystalline state, *Methods Enzymol.*, **276**, 23-59, 1997.
- [30] Boström M, Williams DRM, Ninham BW, Specific ions effects: why the properties of lysozyme in salt solutions follow a Hofmeister series, *Biophys. J.*, **85**, 686-694, 2003.
- [31] Moreira LA, Boström M, Ninham BW, Biscaia EC, Tavares FW, Hofmeister effects: why protein charge, pH titration and protein precipitation depend on the choice of background salt solution, *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, **282-283**, 457-463, 2006.
- [32] Boström M, Tavares FW, Finet S, Skouri-Panet F, Tardieu A, Ninham BW, Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI, *Biophys. Chem.*, **117**, 217-224, 2005.
- [33] Bénas P, Legrand L, Riès-Kautt M, Strong and specif effects of cations on lysozyme chloride solubility, *Acta Crystallogr. D*, **58**, 1582-1587, 2002.
- [34] Coen CJ, Blanch HW, Prausnitz JM, Salting-out of aqueous proteins - phase equilibria and intermolecular potentials, *AIChE J.*, **41**, 996-1004, 1995.
- [35] Muschol M, Rosenberger F, Liquid-liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization, *J. Chem. Phys.*, **107**, 1953-1962, 1997.
- [36] Popova E, Watanabe EO, Pessôa Filho PA, Maurer G, Phase equilibria for salt-induced lysozyme precipitation: effect of salt concentration and pH, *Chem. Eng. Process.* **47**, 1026-1033, 2008.
- [37] Watanabe EO, *Equilíbrio de fases na precipitação de lisozima e albumina de soro bovino com o uso de sais*. Tese de Doutorado: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007
- [38] Shugar D, The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 302-309, 1952.

- [39] Bell DJ, Hoare M, Dunnill P, The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, **26**, 1-72, 1983.
- [40] Hoare M, Protein precipitation and precipitate ageing – 1. Salting-out and ageing of casein precipitates, *Trans. IChemE*, **60**, 79-87, 1982.
- [41] Riès-Kautt M, Ducruix AF, in: Ducruix A, Giegé R, (Eds.) *Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach*, Oxford University Press, New York, pp 195-218, 1992
- [42] Melander WR, Horváth C, Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series, *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 200-215, 1977.
- [43] Guilloteau J-P, Riès-Kautt M, Ducruix AF, Variation of lysozyme solubility as a function of temperature in the presence of organic and inorganic salts, *J. Cryst. Growth*, **122**, 223-230, 1992.
- [44] Rosenberger F, Howard SB, Sowers JW, Nyce TA, Temperature dependence of protein solubility – determination and application to crystallization in X-ray capillaries, *J. Cryst. Growth*, **129**, 1-12, 1993.
- [45] Berthou J, Jollès P, A phase transition in a protein crystal: the example of hen lysozyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 222-227, 1974.
- [46] Cacciopo E, Munson S, Pusey ML, Protein solubilities determined by a rapid technique and modification of that technique to a micro-method, *J. Cryst. Growth*, **110**, 66-71, 1991.
- [47] Pusey M, Gernert K, A method for rapid liquid-solid phase solubility measurements using the protein lysozyme, *J. Cryst. Growth*, **88**, 419-424, 1988.
- [48] Ataka M, Asai M, Systematic studies on the crystallization of lysozyme: determination and use of phase diagrams, *J. Cryst. Growth*, **90**, 86-93, 1988.
- [49] Christopher GK, Philipps AG, Gray RJ, Temperature-dependent solubility of selected proteins, *J. Cryst. Growth*, **191**, 820-826, 1998.
- [50] Silva LL, Pessôa Filho PA, Miranda EA, Evaluation of the effect of ammonium carbamate on the stability of proteins, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **85**, 962-967, 2010.
- [51] Jordão CEKMAC, *Estudo do equilíbrio de fases em sistemas aquosos contendo albumina de soro bovino e polietileno glicol*. Dissertação de Mestrado: Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.



## **5. Precipitação de insulina com dióxido de carbono**

### **Resumo**

Estudos recentes têm preconizado o uso de eletrólitos voláteis, como o dióxido de carbono dissolvido em solução aquosa, como uma alternativa promissora aos agentes precipitantes convencionalmente usados para a recuperação de proteínas em indústrias farmacêuticas e de alimentos. Neste capítulo apresenta-se uma investigação, experimental e teórica, sobre a precipitação de insulina suína, uma biomolécula de interesse farmacêutico, usando dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como agente precipitante ácido. A solubilidade da insulina suína em soluções de  $\text{NaHCO}_3$  com  $\text{CO}_2$  pressurizado foi determinada como função de temperatura e pressão, obtendo-se um valor mínimo em pH próximo ao ponto isoelétrico da proteína. Um modelo termodinâmico foi desenvolvido e aplicado com sucesso na correlação dos dados experimentais. Este modelo considera a insulina como um polieletrólito e leva em conta suas reações de auto-associação. A atividade biológica da insulina manteve-se após a precipitação com  $\text{CO}_2$ , embora possa haver perda de atividade se houver formação de espuma na etapa de depressurização.

### **5.1. Introdução**

O uso de eletrólitos voláteis, como o dióxido de carbono, tem sido apontado como uma alternativa ao uso de ácidos convencionais para a precipitação isoelétrica de proteínas [1]. Uma das vantagens deste processo é que o agente acidificante é adicionado à solução homogeneamente, na forma gasosa, ao longo da interface líquido-vapor, em um processo limitado pela cinética de transferência de massa e pelo equilíbrio termodinâmico. Assim, em oposição à precipitação convencional pela adição de soluções concentradas de ácido, evitam-se extremos locais de pH, que poderiam ser danosos à proteína [2,3]. Além disso, a geração de efluente salino é substancialmente reduzida, pois o eletrólito volátil pode ser separado e recuperado da solução apenas por decréscimo de pressão [1,4]; se o agente volátil for reciclado, tampouco haverá geração de efluente gasoso. Outras vantagens do uso do  $\text{CO}_2$  são seu baixo custo, a possibilidade de produzir proteínas com diferentes propriedades funcionais, e um possível efeito de

inativação de bactérias [1,5].

A idéia de precipitar proteínas com eletrólitos voláteis é relativamente nova, mas muitos autores já demonstraram a potencialidade desta técnica, principalmente com misturas complexas como extratos de proteína de soja e leite. Estes trabalhos enfocam o efeito de parâmetros de processos nas propriedades do precipitado [2,3,6], o desenvolvimento de processos contínuos para a produção de proteínas [4,7], o fracionamento de misturas protéicas [8-10] e a co-precipitação de um agente proteínáceo ativo [11].

Embora promissor, o uso industrial de eletrólitos voláteis pode demandar mudanças consideráveis em processos convencionais, além de depender de um conhecimento sólido da cinética e da termodinâmica das operações para o projeto, controle e otimização adequados. Uma base termodinâmica adequada e modelos confiáveis para a descrição de sistemas de eletrólitos voláteis em equilíbrio com soluções aquosas foram estabelecidos por extensos estudos experimentais e teóricos [12-20]. Entretanto, até o momento não há uma descrição sistemática do equilíbrio de fases em sistemas deste tipo contendo proteínas. O rendimento das operações de recuperação e a estimativa de custos de produção são baseados na solubilidade da proteína no meio e em coeficientes de partição, que devem ser conhecidos de antemão para a implementação do processo. No caso do equilíbrio sólido-líquido, a determinação de curvas de solubilidade permite uma análise de condições de supersaturação, possibilitando a engenheiros químicos direcionar o processo à formação tanto de precipitados amorfos quanto de cristais [21,22].

Neste trabalho estudou-se a precipitação com  $\text{CO}_2$  como agente acidificante de um hormônio polipeptídico, a insulina, determinando sua solubilidade em um conjunto de diferentes condições e modelando-a em função de parâmetros do sistema. Para o estudo do sistema modelo e para reduzir o número de componentes em solução, apenas o bicarbonato de sódio (que forma um tampão  $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  em soluções aquosas) foi usado para a manutenção do pH do sistema. A dependência da solubilidade da proteína com temperatura, pressão e pH foi estudada. O pH de equilíbrio foi estimado usando o modelo de Edwards et al. [13], que por sua vez emprega o modelo de Pitzer [23] para o cálculo do coeficiente de atividade dos eletrólitos, e as estimativas foram usadas para definir as condições experimentais a serem investigadas. Para a inclusão no modelo de Pitzer, a carga líquida da proteína foi calculada por meio da equação de Henderson-

Hasselbalch [24], levando-se em conta a auto-associação da insulina. A atividade biológica da insulina precipitada por este processo foi avaliada e comparada à atividade de uma amostra de controle que não foi submetida à precipitação com CO<sub>2</sub> pressurizado.

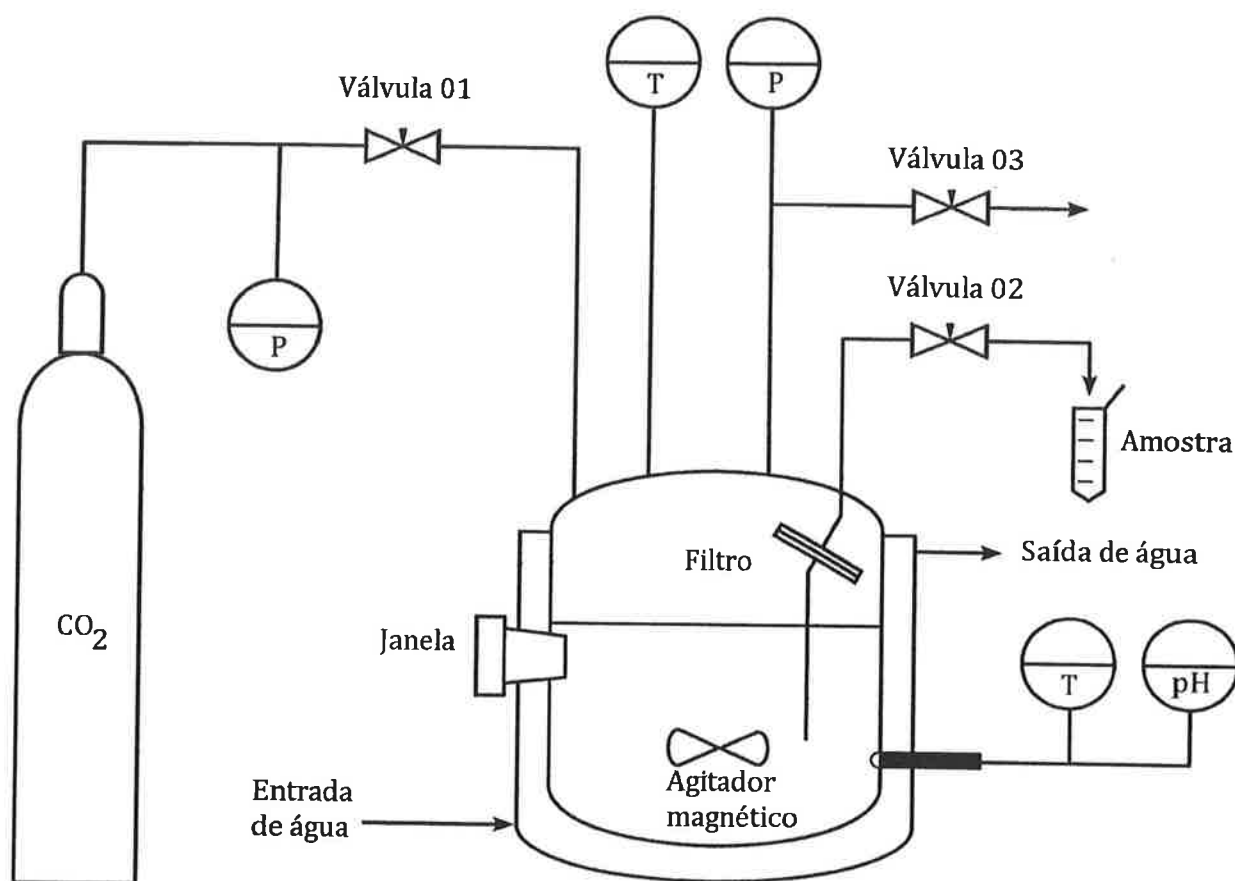
## 5.2. Materiais e métodos

### 5.2.1. Materiais

Insulina suína (96,6% de pureza, 0,44% de Zn) foi gentilmente doada pela então Biobrás (Montes Claros). Bicarbonato de sódio (100%) foi obtido da J. T. Baker (Ecatepec, México) e dióxido de carbono (pureza > 99,8%), da White Martins Gases Industriais (Campinas).

O aparato experimental para a determinação da solubilidade foi projetado pelo grupo de pesquisa e posteriormente construído pela empresa Autic Automação e Instrumentação Industrial (Campinas), e está esquematizado na Figura 5.1. Ele é constituído por um vaso de 340 mL de aço inoxidável com duas janelas de visualização (Autoclave Engineers, Eire, EUA) e uma camisa para controle de temperatura. O CO<sub>2</sub> era introduzido no vaso de precipitação pela tubulação de entrada, e a pressão era mantida por um regulador de pressão (HPS4-1500, Victor Specialty Products, St. Louis, EUA) para cada condição experimental. Amostras da fase líquida eram coletadas por diferença de pressão por meio de uma tubulação de 1/16" (Upchurch Scientific, Oak Harbor, USA), pela abertura da válvula 02. Filtros de seringa Minisart 16534 (0,2 µm) da Sartorius (Goettingen, Alemanha) eram usados para evitar a retirada concomitante de partículas sólidas. A temperatura era controlada em  $\pm 0,2$  °C com alimentação de água na camisa oriunda de um banho termostático modelo TE-2000 (Tecnal, Piracicaba). A velocidade de rotação era controlada com barra magnética e um agitador Super-Nuova SP131825 (Barnstead International, Dubuque, EUA), com acurácia de  $\pm 2,0\%$  (para rotações superiores a 200 rpm). A temperatura da fase líquida e o pH eram mensurados, com incertezas de  $\pm 1,0$  °C e  $\pm 0,03$ , respectivamente, com um eletrodo de vidro de alta pressão TBX567 (ABB, Carlson City, EUA), e indicados em um painel TB84PH (ABB, Carlson City, EUA). A pressão era mensurada com incerteza de  $\pm 0,15$  bar com um transdutor digital PSI-420 (0-60 bar, Zurich Indústria e Comércio, São Paulo), e indicado em um painel PLN-2 (Zurich Indústria e Comércio, São Paulo). Dados de temperatura, pressão e pH eram gravados por uma câmera digital (Creative Webcam Live!, Creative Labs, Milpitas, EUA), programada para capturar imagens dos painéis de instrumentação

em intervalos de tempo determinados: posteriormente, as imagens eram analisadas e os dados experimentais, tabulados.



**Figura 5.1.** Esquema do aparato experimental para a precipitação de proteínas com eletrólitos voláteis.

### 5.2.2. Métodos experimentais

*Preparo das soluções de insulina.* Insulina suína era colocada em frascos Erlenmeyer, dissolvida em 250 cm<sup>3</sup> de solução 0,010 mol·L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> e deixada sob agitação por 48 h em temperatura ambiente, de modo a que a concentração final de proteína estivesse entre 1,0 e 2,0 mg·cm<sup>-3</sup>. A solução obtida era filtrada (0,2 μm) e colocada no vaso para os experimentos de precipitação.

*Determinação da solubilidade.* Colocada a solução no vaso de precipitação e atingida a temperatura desejada, o ar no *overhead* era removido por alimentação contínua de CO<sub>2</sub> (aproximadamente 120 cm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup> por 20 min). Para os experimentos em pressão atmosférica, a válvula 03 era mantida aberta e CO<sub>2</sub> alimentado continuamente (< 10 cm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup>); para os experimentos em pressão maior que a



atmosférica, a válvula 03 era fechada, iniciavam-se o controle da pressão e a agitação (480 rpm). Após 24 h (tempo necessário para que o equilíbrio fosse alcançado, conforme determinado em experimentos preliminares), amostras da fase líquida eram retiradas. Quando a diferença de pressão era insuficiente para que houvesse a retirada de amostra, uma seringa era usada ao final da válvula 02 para amostragem; em qualquer caso, a suspensão passava pelo filtro 0,2  $\mu\text{m}$  para evitar a retirada de partículas sólidas. Inicialmente, um volume de 4,5  $\text{cm}^3$  era retirado (e descartado), após o quê amostras de 1,5  $\text{cm}^3$  eram coletadas em triplicata para a medida de concentração protéica. Para alguns experimentos em pH inferior ao ponto isoelétrico da insulina (pI), a depressurização resultava em um acréscimo de pH, levando-o para próximo do pI (como medido pelo eletrodo de pH), o que causava a precipitação de insulina fora do vaso. Nestes casos, as amostras eram diluídas em HCl 0,05  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  para dissolver os precipitados e posterior determinação de concentração protéica.

### 5.2.3. Métodos analíticos

*Concentração de insulina.* A concentração de insulina em solução era determinada por espectrofotometria UV em um espectrofotômetro DU 640 (Beckman Instruments, Fullerton, EUA), conforme metodologia descrita por Gehle e Schügerl [25]

*Atividade biológica de insulina.* A atividade biológica de insulina foi avaliada pelo teste de tolerância de insulina (ITT) em camundongos, conforme as metodologias de Lundbaek [26] e Bonora et al. [27]. Neste teste, a taxa de decréscimo de glicose no sangue é ajustada por um método de mínimos quadrados em gráfico semi-logarítmico, em um intervalo de 5 min a 20 min após a injeção de insulina. O tempo requerido para que a concentração de glicose caia à metade é determinada ( $t_{1/2}$ ), e a taxa de decréscimo de glicose ( $K_{ITT}$ ) é calculada por meio de:

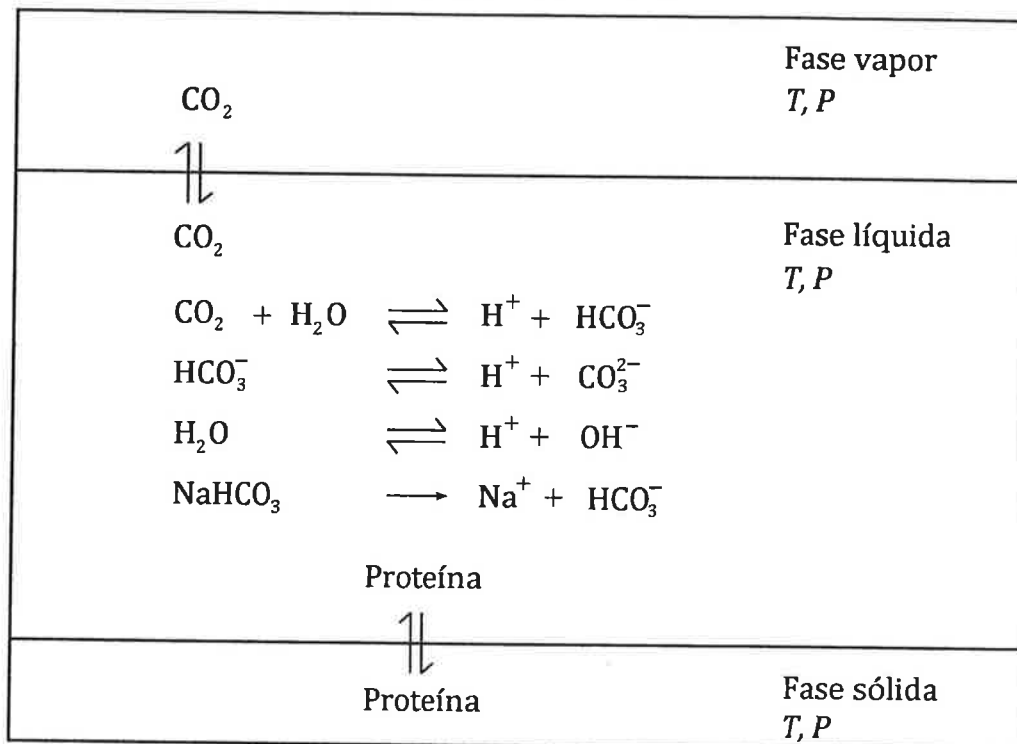
$$K_{ITT} = 100 \times \frac{0.693}{t_{1/2}} \quad (5.1)$$

Dois camundongos foram usados para cada condição experimental. Os valores de ( $K_{ITT}$ ) das amostras de insulina obtidas pela precipitação com  $\text{CO}_2$  foram comparadas com amostras de controle de insulina humana e suína usando o teste  $t$  de Student com intervalo de confiança de 95%, calculado com o software Microcal Origin 6.0 (OriginLab, Northampton, USA). Níveis de glicose no sangue foram determinados com um aparelho portátil Accu-Check Advantage (Roche Diagnostics, Indianapolis, EUA) usando fitas

Accu-Check Advantage II (Roche Diagnostics, Indianapolis, EUA), até 30 min após a injeção, em intervalos de 5 min.

### 5.3. Modelagem termodinâmica

Para a descrição do equilíbrio de fases (sólido-líquido-vapor) e químico do sistema composto por  $\text{CO}_2$ , água,  $\text{NaHCO}_3$  e insulina suína (Figura 5.2), foi implementada uma abordagem baseada no modelo de Edwards et al. [13].



**Figura 5.2.** Representação do equilíbrio sólido-líquido-vapor e do equilíbrio químico estabelecido no sistema composto por  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$  e proteína.

Para o  $\text{CO}_2$ , o equilíbrio líquido-vapor pode ser representado pela igualdade das fugacidades em ambas as fases, que resulta em:

$$y_{\text{CO}_2} \phi_{\text{CO}_2}^V P = m_{\text{CO}_2} \gamma_{\text{CO}_2} H_{\text{CO}_2}(T, P) \quad (5.2)$$

em que  $y_{\text{CO}_2}$  é a fração molar de  $\text{CO}_2$  na fase vapor,  $\phi_{\text{CO}_2}^V$  é seu coeficiente de fugacidade nesta fase,  $P$  é a pressão do sistema,  $m_{\text{CO}_2}$  é a molalidade do  $\text{CO}_2$  na fase líquida,  $\gamma_{\text{CO}_2}$  é o coeficiente de atividade deste composto, e  $H_{\text{CO}_2}(T, P)$  é a constante da lei de Henry em  $T$  e  $P$ . Assumindo que a fase vapor seja composta somente por  $\text{CO}_2$ , seu coeficiente de fugacidade pode ser calculado por meio de uma equação virial:

$$\phi_{CO_2}^V = \exp\left(\frac{B_{CO_2}P}{RT}\right) \quad (5.3)$$

em que  $R$  é a constante dos gases. Neste trabalho, o segundo coeficiente virial  $B_{CO_2}$  foi calculado a partir da expressão de Rumpf e Maurer [17]. A presença de água na fase vapor foi negligenciada nas condições consideradas. A constante de Henry foi calculada a partir da equação empírica de Edwards et al. [13]<sup>1</sup>.

Em fase líquida, as seguintes reações de equilíbrio foram consideradas:



Cada reação (chamada genericamente  $j$ ) é caracterizada por uma constante de equilíbrio  $K_j$ , sendo que a restrição de equilíbrio escreve-se:

$$K_j = \prod_i a_i^{v_{i,j}} \quad (5.7)$$

em que  $a_i$  é a atividade e  $v_{i,j}$  é o coeficiente estequiométrico do componente  $i$  na reação  $j$ . A constante de equilíbrio da auto-ionização da água foi obtida de Edwards et al. [13], e as constantes das duas dissociações do dióxido de carbono foram obtidas de Kawazuishi e Prausnitz [16]. A atividade do componente  $i$  é dada por:

$$a_i = m_i \gamma_i \quad (5.8)$$

O coeficiente de atividade  $\gamma_i$  dos eletrólitos em solução foi calculado a partir do modelo de Pitzer [23] truncado após o segundo coeficiente virial:

$$\begin{aligned} \ln \gamma_i = & -A_\phi z_i^2 \left[ \frac{\sqrt{I}}{1+b\sqrt{I}} + \frac{2}{b} \ln(1+b\sqrt{I}) \right] \\ & + 2 \sum_j m_j \left[ \beta_{i,j}^0 + \beta_{i,j}^1 \frac{2}{\alpha^2 I} \left[ 1 - (1 + \alpha\sqrt{I}) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right] \right] \\ & - \frac{z_i^2}{\alpha^2 I^2} \left[ 1 - \left( 1 + \alpha\sqrt{I} + \frac{\alpha^2 I}{2} \right) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right] \sum_j \sum_k m_j m_k \beta_{j,k}^1 \end{aligned} \quad (5.9)$$

em que:

<sup>1</sup> Funções e valores dos parâmetros oriundos da literatura e necessários ao cálculo estão compilados no material suplementar disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.22319/supinfo>

$$A_\phi = \frac{1}{3} \sqrt{2\pi N_A \rho_s} \left( \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 D k_B T} \right)^{3/2} \quad (5.10)$$

O primeiro termo do lado direito da equação (5.9) é relacionado às forças de longo alcance (ou coulômbicas), e as outras são contribuições de interações de curto alcance. Os termos  $\alpha$  e  $b$  são constantes do modelo (respectivamente  $2,0 \text{ kg}^{1/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$  e  $1,2 \text{ kg}^{1/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$ ),  $I$  é a força iônica,  $z_i$  é a carga do íon,  $A_\phi$  é o parâmetro de Debye-Hückel, função do número de Avogadro  $N_A$ , da massa específica do solvente  $\rho_s$ , da carga elementar  $e$ , da permissividade do vácuo  $\epsilon_0$ , da constante dielétrica do solvente  $D$  e da constante de Boltzmann  $k_B$ . Os parâmetros de interação binária  $\beta_{i,j}^0$  e  $\beta_{i,j}^1$  são ajustáveis aos dados experimentais, e são simétricos, ou seja,  $\beta_{i,j} = \beta_{j,i}$ . Os parâmetros de interação para o par  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  e para o sal  $\text{NaHCO}_3$  foram obtidos de Kurz et al. [28] e Xia et al. [19,20], respectivamente.

A proteína também foi considerada como um eletrólito no modelo. Entretanto, esta consideração traz consigo um problema, pois proteínas têm múltiplos estados de ionização, devido ao número de grupos ionizáveis, que podem ser positivos, negativos ou neutros dependendo do pH da solução e de seu caráter ácido ou básico. O grau de ionização destes ácidos e bases fracas é fortemente dependente da concentração de íons  $\text{H}^+$ , e a relação entre ambos é feita por meio da equação de Henderson-Hasselbalch [24]. Aplicando esta equação a todos os grupos ionizáveis e somando todas as contribuições, a carga líquida da proteína pode ser descrita como função do pH.

A condição de eletro-neutralidade, incluindo a carga líquida da proteína, impõe a seguinte restrição entre cargas positivas e negativas na fase líquida:

$$\sum z_+ m_+ = \sum z_- m_- \quad (5.11)$$

em que  $z_+$ ,  $m_+$ ,  $z_-$ , e  $m_-$  representam cargas e concentrações (em  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) de íons positivos e negativos, respectivamente.

A atividade do solvente pode ser calculada por meio da equação de Gibbs-Duhem:

$$\ln a_w = M_w \left[ 2A_\phi \frac{I\sqrt{I}}{1+b\sqrt{I}} - \sum_{i \neq w} \sum_{j \neq w} m_i m_j [\beta_{i,j}^0 + \beta_{i,j}^1 \exp(-\alpha\sqrt{I})] - \sum_{i \neq w} m_i \right] \quad (5.12)$$

A existência de um equilíbrio sólido-líquido com a proteína estabelece uma nova restrição. Em qualquer solução saturada do componente  $i$  em equilíbrio com sua fase sólida pura, em uma mesma temperatura o potencial químico de  $i$  deve permanecer

constante, e deve ser necessariamente o mesmo em ambas as fases, o que implica que a atividade deve-se também manter constante ao longo da curva de equilíbrio [29]. O equilíbrio pode ser determinado para todas as condições ao se aplicar esta restrição à proteína em fase líquida, resultando em:

$$a_p = a_p^{ref} \quad (5.13)$$

ou:

$$\ln a_p = \ln a_p^{ref} \quad (5.14)$$

em que  $a_p$  é a atividade termodinâmica<sup>2</sup> da proteína em equilíbrio sólido-líquido e  $a_p^{ref}$  é a atividade da proteína em um estado de referência – neste caso, um estado em fase líquida mas também em condição de equilíbrio sólido-líquido. O valor experimental da solubilidade no ponto isoelétrico foi usado para o cálculo da atividade de referência, uma vez que nesta situação (com carga líquida nula) a proteína estará mais próxima da condição de idealidade (o termo de longo alcance na equação (5.9), que é predominante em soluções diluídas, anula-se no pl), o coeficiente de atividade calculado será igual à unidade (se não houver componente de curto alcance na expressão), e a atividade termodinâmica será igual à concentração.

### 5.3.1. Auto-associação da insulina

É conhecido o fato de que a insulina se auto-associa, formando multímeros estáveis em solução e em fase sólida. Na presença de dois átomos de Zn por conjunto de seis moléculas de insulina, a população de hexâmeros é estável e predominante em pH neutro ou levemente alcalino [30]. Na auto-associação da insulina, monômeros (M) combinam-se na formação de dímeros (D), que se associam para a formação de tetrâmeros (T) que, com subsequente reação com dímeros, formam hexâmeros (H) [31-33]. De acordo com Milthorpe et al. [34], em soluções de insulina bovina (com dois átomos de Zn por seis moléculas de insulina) de concentração acima de  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ , mais de 75% da população de insulina está em forma de hexâmeros. Há evidência de que a carga líquida dos multímeros é maior (em valor absoluto) que as das formas monoméricas [30,35]. A partir desta consideração, faz-se a hipótese de que a carga

<sup>2</sup> É necessário, algumas vezes, especificar que se trata de *atividade termodinâmica*, relação entre fugacidades, para evitar confusão com *atividade biológica*.

líquida dos multímeros seja igual à carga do monômero (M) multiplicada por um fator  $k_i$ . Assim, tais cargas podem ser expressas por:

$$z_D = k_D z_M \quad (5.15)$$

$$z_T = k_T z_M \quad (5.16)$$

$$z_H = k_H z_M \quad (5.17)$$

em que  $z_D$ ,  $z_T$  e  $z_H$  são as cargas líquidas dos dímeros (D), tetrâmeros (T) e hexâmeros (H), respectivamente;  $z_M$  é a carga líquida do monômero, calculada pela equação de Henderson-Hasselbalch [24], e  $k_D$ ,  $k_T$  e  $k_H$  são fatores multiplicativos. A partir das equações (5.15) a (5.17), é possível calcular a carga média representativa da população de multímeros. A concentração acessível experimentalmente é a soma de todas as moléculas de insulina (unidades monoméricas) presentes no sistema, e pode ser obtida pela soma de todas as concentrações de multímeros multiplicadas pelo número de monômeros em cada configuração:

$$m_{IS} = m_M + 2m_D + 4m_T + 6m_H \quad (5.18)$$

em que  $m_{IS}$  é a concentração macroscópica de insulina e  $m_M$ ,  $m_D$ ,  $m_T$  e  $m_H$  são as concentrações efetivas de monômero, dímero, tetrâmero e hexâmero. A fração de cada multímero é dada por

$$\Phi_i = \frac{im_i}{m_{IS}} \quad (5.19)$$

em que  $i = 1$  (M), 2 (D), 4 (T) or 6 (H) e

$$\Phi_M + \Phi_D + \Phi_T + \Phi_H = 1 \quad (5.20)$$

Deste modo, a carga média da população de multímeros,  $\bar{z}_{IS}$ , é calculada por:

$$\bar{z}_{IS} = \Phi_M z_M + \Phi_D z_D + \Phi_T z_T + \Phi_H z_H \quad (5.21)$$

Substituindo as equações (5.15) a (5.17) na equação (5.21):

$$\bar{z}_{IS} = (\Phi_M + \Phi_D k_D + \Phi_T k_T + \Phi_H k_H) z_M \quad (5.22)$$

Chamando  $k$  aos termos entre parênteses da equação (5.22):

$$\bar{z}_{IS} = k z_M \quad (5.23)$$

As considerações acima levam a que a população multimérica de insulina seja considerada, no modelo termodinâmico, como um único pseudo-componente. Estas definições causam pouco impacto no cálculo da atividade termodinâmica da proteína, uma vez que o valor de referência da solubilidade no ponto isoelétrico é tomado como referência, e nesta situação os multímeros têm carga líquida nula. A condição de

atividade constante para o monômero de insulina em equilíbrio sólido-líquido é também válida para os multímeros, uma vez que seu potencial químico é função do potencial químico do monômero [36]. O fator  $k$  foi incluído no modelo como um parâmetro ajustável.

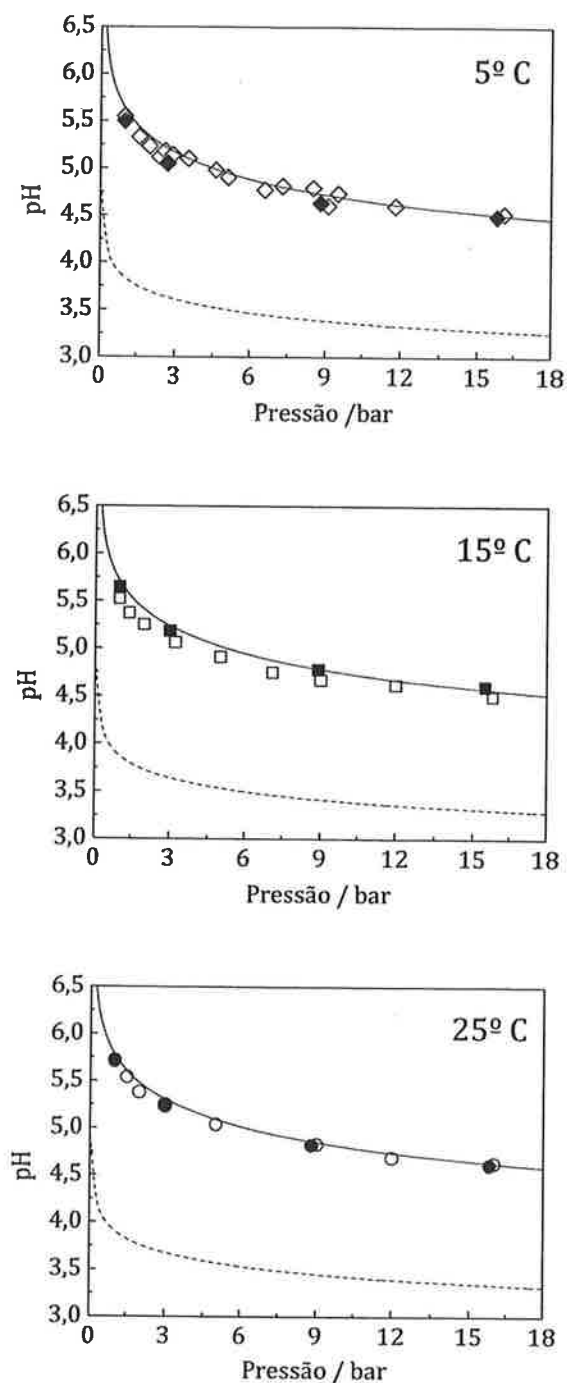
## 5.4. Resultados e discussão

### 5.4.1. pH das soluções: valores experimentais e modelagem

O valor de pH de equilíbrio para a insulina em soluções de  $0,010 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  com  $\text{CO}_2$  pressurizado foi determinado a  $5,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $15,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$  na faixa de pressões de  $1,0 \text{ bar}$  a  $16,0 \text{ bar}$ ; os resultados são apresentados na Figura 5.3<sup>3</sup>. O  $\text{NaHCO}_3$  mostrou-se um tampão apropriado para o ácido carbônico, pois em concentração de  $0,010 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  este sal conteve uma queda de aproximadamente 1,5 unidades de pH em comparação com a água pura nas mesmas condições, tornando possível manter o pH de equilíbrio próximo ao ponto isoelétrico da insulina. Há pouca diferença entre o pH de soluções de insulina em soluções  $0,010 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  em  $\text{CO}_2$  pressurizado e o pH de soluções  $0,010 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ , o que é indicativo da baixa capacidade tamponante da proteína nas concentrações estudadas neste trabalho. Para todas as isotermas, verificou-se uma queda acentuada no pH da solução com o acréscimo na pressão de  $\text{CO}_2$ , principalmente em baixas pressões, como observado previamente por Meysami et al. [37] para soluções de ácidos orgânicos e por Hofland et al. [2,3] para soluções de proteínas de leite e soja.

---

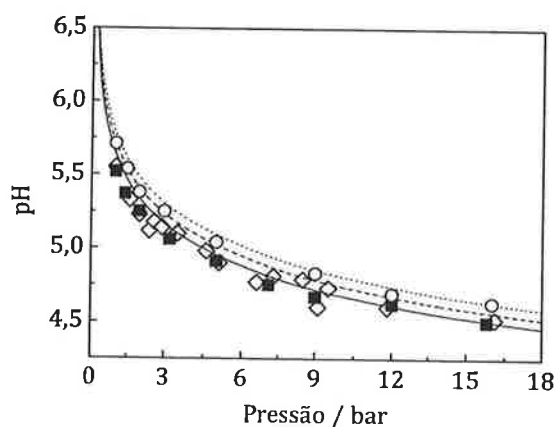
<sup>3</sup> A tabela com os dados completos não é reproduzida aqui, mas pode ser encontrada no artigo do qual este capítulo é oriundo.



**Figura 5.3.** Valores de pH de soluções aquosas com CO<sub>2</sub> pressurizado em diferentes temperaturas. Modelagem: (---) pH da água; (---) pH do sistema composto por CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub> (0,010 mol·L<sup>-1</sup>) e insulina. Valores experimentais: símbolos abertos, soluções saturadas de insulina em NaHCO<sub>3</sub> (0,010 mol·L<sup>-1</sup>); símbolos cheios, soluções de NaHCO<sub>3</sub> (0,010 mol·L<sup>-1</sup>).



A temperatura teve influência no pH do sistema, mas (como se poderia esperar) não tão acentuada quanto a pressão; os resultados são apresentados na Figura 5.4. A temperatura influencia de maneiras opostas o pH da solução: por um lado, um decréscimo na temperatura aumenta a solubilidade do  $\text{CO}_2$ , e por outro, desfavorece a reação de dissociação, descrita na equação (5.4) [3]. Um pequeno decréscimo no pH ocorreu com a redução da temperatura, indicando que o efeito da solubilidade do  $\text{CO}_2$  é mais forte. O modelo foi aplicado ao cálculo do pH de equilíbrio em fase líquida como função de temperatura e pressão de  $\text{CO}_2$ , com excelentes resultados para soluções de  $\text{NaHCO}_3$  e insulina a  $5,0\text{ }^\circ\text{C}$  e  $25,0\text{ }^\circ\text{C}$  e resultados razoáveis para soluções de insulina a  $15,0\text{ }^\circ\text{C}$ .

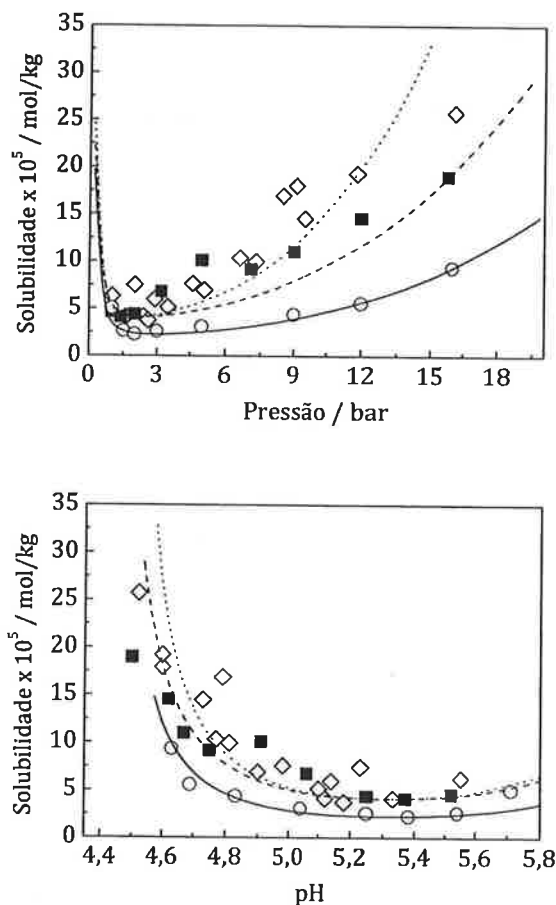


**Figura 5.4.** Valores de pH de soluções saturadas de insulina em  $\text{NaHCO}_3$  ( $0,010\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) com  $\text{CO}_2$  pressurizado em diferentes temperaturas. Modelo: (....)  $5,0\text{ }^\circ\text{C}$ , (---)  $15,0\text{ }^\circ\text{C}$  e (--)  $25,0\text{ }^\circ\text{C}$ . Valores experimentais: ( $\diamond$ )  $5,0\text{ }^\circ\text{C}$ , ( $\blacksquare$ )  $15,0\text{ }^\circ\text{C}$  e ( $\circ$ )  $25,0\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 5.4.2. Solubilidade experimental da insulina

Experimentos de precipitação conduzidos com  $\text{CO}_2$  em diferentes concentrações iniciais de insulina (dados não apresentados) resultaram em um mesmo valor de concentração de proteína na fase líquida, o que leva à conclusão de que esta proteína estabelece um verdadeiro equilíbrio sólido-líquido, em vez de um equilíbrio líquido-líquido, como relatado para a  $\alpha$ -quimotripsina e albumina de soro bovino por Shih et al. [38]. A solubilidade de insulina em soluções  $0,010\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  como função da pressão de  $\text{CO}_2$  (na faixa de  $1,0\text{ bar}$  a  $16,0\text{ bar}$ ) foi investigada a  $5,0\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $15,0\text{ }^\circ\text{C}$  e  $25,0\text{ }^\circ\text{C}$ , e os resultados são apresentados na Figura 5.5 – os desvios-padrão, não apresentados na Figura, são  $0,48\cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $25,0\text{ }^\circ\text{C}$ ),  $1,77\cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $15,0\text{ }^\circ\text{C}$ ) e  $4,08\cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $5,0$

°C). Em todos os casos, a solubilidade mínima ocorre próximo ao pI, em pH 5,3 [39,40]. Esta solubilidade mínima é mais evidente para a isoterma a 25,0 °C, na qual o aumento de solubilidade pode ser mais facilmente observado quando o pH se afasta do pI em ambos os sentidos. Para as isotermas a 5,0 °C e 15,0 °C, na pressão mais baixa (1,0 bar), o pH já era próximo ao pI da insulina, e o aumento da solubilidade só fica evidente em pressões mais altas, nas quais os valores de pH são inferiores ao pI.



**Figura 5.5.** Solubilidade de insulina em  $\text{NaHCO}_3$  ( $0,010 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) com  $\text{CO}_2$  pressurizado em diferentes temperaturas. Modelo: (...) 5,0 °C, (---) 15,0 °C e (—) 25,0 °C. Valores experimentais: ( $\diamond$ ) 5,0 °C, ( $\blacksquare$ ) 15,0 °C e ( $\circ$ ) 25,0 °C. Solubilidade em função da pressão de  $\text{CO}_2$  (superior) e pH.

A insulina apresenta comportamento retrógrado com a temperatura, ou seja, sua solubilidade decresce com o aumento da temperatura. Este comportamento retrógrado foi previamente observado por Bernardo et al. [41] (para insulina oriunda do mesmo lote utilizado neste trabalho) e também por Christopher et al. [42] para um conjunto de proteínas (como já mencionado no Capítulo 4). Feeling-Taylor et al. [43] relataram o

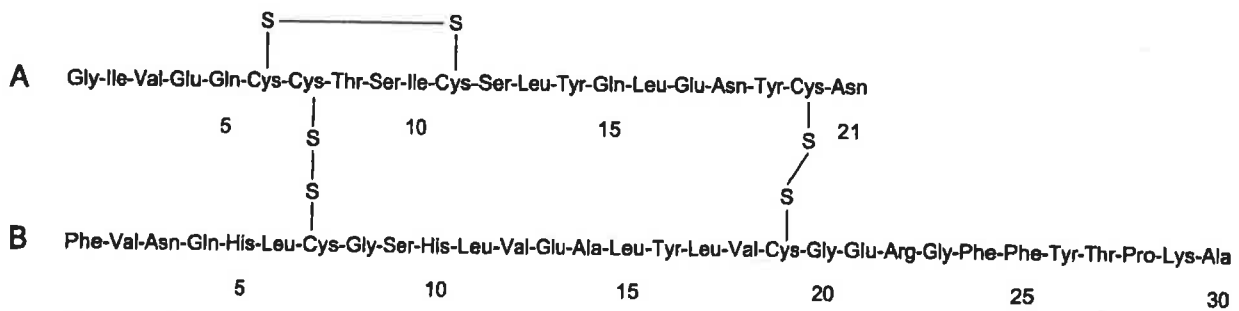
mesmo comportamento para hemoglobina C e analisaram o fenômeno por meio da equação de van't Hoff. Estes autores calcularam que a entalpia de cristalização desta proteína seria de  $155 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , ou seja, a cristalização seria um processo endotérmico (a entalpia da proteína na fase cristalina é maior que a da proteína em solução na mesma temperatura), o que resulta em uma solubilidade retrógrada. Em uma análise mais completa, Vekilov et al. [44] usaram a definição de energia de Gibbs padrão para a cristalização da hemoglobina C, separando as contribuições da proteína e do solvente no termo entrópico.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = \Delta H^0 - T(\Delta S_{\text{proteína}}^0 + \Delta S_{\text{solvente}}^0) \quad (5.24)$$

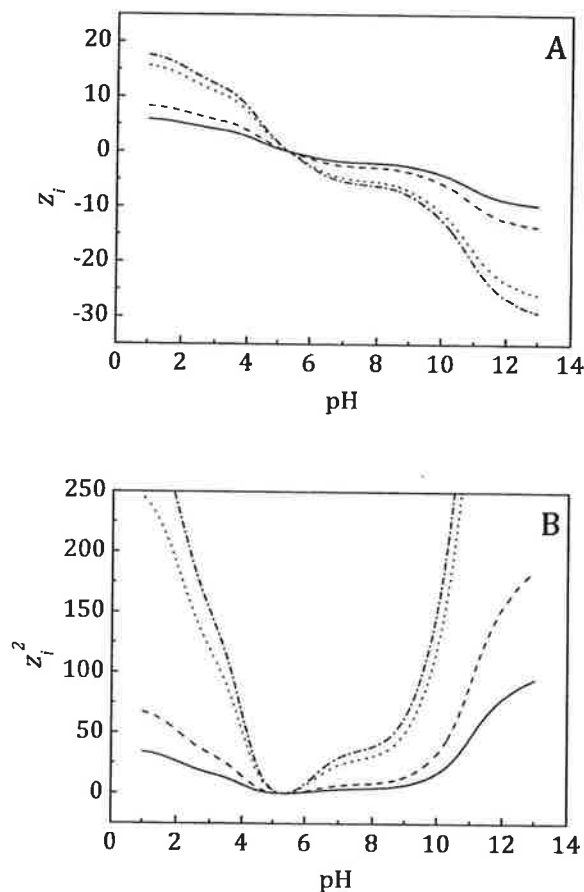
Para que a cristalização seja possível,  $\Delta G^0$  deve ser negativo. Baseando-se em dados de microscopia de força atômica, Vekilov et al. [44] sugeriram que a liberação de moléculas de água ligadas à hemoglobina C fornece o alto valor de entropia necessário à cristalização. A mesma análise pode ser aplicada aos dados experimentais de solubilidade obtidos para a insulina, assumindo-se uma variação positiva de entalpia no processo de precipitação com dióxido de carbono. Entretanto, uma variação de entropia positiva seria necessária para a factibilidade termodinâmica ( $T\Delta S^0 > \Delta H^0$ ). A agregação de monômeros no processo de auto-associação de insulina em solução ocorre com a exclusão de moléculas de água, o que contribui para o aumento de entropia [30]. Assim, a exclusão de moléculas de solvente deve ser o principal mecanismo para a variação positiva de entropia necessária à precipitação.

#### 5.4.2. Modelagem da solubilidade de insulina

Como exposto anteriormente, a insulina foi considerada um eletrólito, e a dependência de sua carga líquida com o pH da solução foi calculado usando a equação de Henderson-Hasselbalch. Os valores de  $pK_A$  dos grupos ionizáveis da proteína (cuja estrutura primária é apresentada na Figura 5.6) foram obtidos de valores típicos para os aminoácidos livres [24] e os valores experimentais obtidos por Kaarsholm et al. [39] em experimentos de titulação de soluções de insulina humana (concentração de  $1,0\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em  $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cloridrato de guanidina. Na vizinhança do  $pI$  (valores de pH de 4,0 a 6,0) as cargas líquidas calculadas usando os dois conjuntos de valores de  $pK_A$  não apresentam diferença significativa. Como as condições experimentais deste trabalho resultam em valores de pH entre 4,4 e 5,8, os valores de  $pK_A$  de aminoácidos livres foram usados nos cálculos subseqüentes.



**Figura 5.6.** Estrutura primária da insulina suína, compreendendo as duas cadeias polipeptídicas (A e B) ligadas por pontes de dissulfeto [30].



**Figura 5.7.** Carga líquida do monômero de insulina  $z_i$  (A) e seu quadrado  $z_i^2$  (B) em função do pH: (—) monômero; (---) dímero; (···) tetrâmero e (-·-) hexâmero.

Como apresentado previamente, a multimerização da insulina é acompanhada por um aumento na carga líquida, ou seja, a associação de moléculas de insulina ocorre com a soma parcial das cargas líquidas. Para ilustrar este fenômeno, as razões de carga múltiplo/monômero obtidas por medidas de espectroscopia de massa em nano-

eletro-spray [35] foram usados para simular o perfil da carga dos multímeros de insulina e seu quadrado ( $z_i$  e  $z_i^2$ ) como função do pH (Figura 5.7). O efeito das reações de auto-associação na carga líquida dos multímeros é pronunciado. Considerando-se o efeito do quadrado da carga nas forças de repulsão eletrostática, pode-se inferir que as reações de associação e a expressiva presença de multímeros em solução resultam em uma solubilidade maior do que a do monômero isoladamente considerado.

Para modelar os dados de solubilidade de insulina, o parâmetro  $k$  foi ajustado para cada isoterma. Embora o valor de  $k$  possa variar com o pH da solução e a concentração da proteína, os resultados de Milthorpe et al. [34] indicam que a proporção entre hexâmeros e monômeros não apresenta variações significativas para concentrações de insulina acima de  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$  (concentração de monômeros de  $1,75\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), sendo provável que a proporção de multímeros não varie significativamente para valores de pH próximos ao pI. Assim, pode-se assumir que o fator  $k$  seja constante nas condições deste estudo e represente um estado médio de ionização da população de insulina multimérica. O modelo resultou em uma boa correlação dos dados de solubilidade (Figura 5.5) com erro médio máximo de 21,7% para as isotermas a  $5,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $15,0 \text{ }^\circ\text{C}$  (Tabela 5.1). Para uma população de insulina composta apenas de monômeros, o valor de  $k$  deveria ser igual à unidade. Nos cálculos aqui apresentados, o valor ajustado de  $k$  variou de 2,86 a 3,15, o que é consistente com uma população expressiva de monômeros, dímeros, tetrâmeros e hexâmeros em solução. Embora ao final este valor seja um parâmetro ajustável (fundamental para o sucesso do modelo), o fato de que seja compatível com o fenômeno que ele pretende descrever indica que as hipóteses subjacentes ao modelo são razoáveis.

**Tabela 5.1.** Desvios médios entre a solubilidade calculada e a experimental da insulina em solução de  $\text{NaHCO}_3$  ( $0,010 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) com  $\text{CO}_2$  pressurizado, e valores do parâmetro  $k$ .

T / $^\circ\text{C}$	$k$	Desvio
5,0	3,15	21,7%
15,0	2,86	21,7%
25,0	3,03	10,6%

#### 5.4.4. Atividade biológica da insulina

Para avaliar a possível desnaturação causada pela precipitação em alta pressão, a atividade biológica da insulina precipitada com CO<sub>2</sub> foi determinada e comparada à atividade da insulina precipitada usando o ácido "convencional" H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em condições similares (Tabela 5.2). Os experimentos foram conduzidos de modo que o valor de pH das soluções fosse o mais próximo possível do valor do pI da insulina; para alcançar altas pressões com o mesmo pH da solução, a concentração de NaHCO<sub>3</sub> foi aumentada. Como esperado, houve um aumento expressivo na capacidade tamponante com o aumento na concentração de NaHCO<sub>3</sub>: enquanto para soluções 0,010 mol·L<sup>-1</sup> deste sal o pH igual ao pI da insulina era alcançado com pressões de dióxido de carbono de 3,0 bar, para soluções 0,040 mol·L<sup>-1</sup> o mesmo valor de pH somente era obtido a 16,0 bar.

**Tabela 5.2.** Condições experimentais de precipitação e resultados para os ensaios de atividade biológica

Agente precipitante	Condição <sup>1</sup>	Sal <sup>2</sup> / mol·L <sup>-1</sup>	pH	<i>K<sub>ITT</sub></i>	Valor <i>p</i>
(controle) <sup>3</sup>	-	-	-	9,3 ± 0,5	-
CO <sub>2</sub>	3,0 bar	0,010	5,26	9,3 ± 1,0	0,962
	6,0 bar	0,020	5,22	8,7 ± 3,3	0,833
	16,0 bar	0,050	5,31	5,4 ± 0,7	0,021
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6,2 cm <sup>3</sup>	0,010	5,30	6,5 ± 0,1	0,016
	2,5 cm <sup>3</sup>	0,020	5,28	8,3 ± 0,6	0,204
	1,3 cm <sup>3</sup>	0,050	5,26	8,0 ± 0,3	0,084

<sup>1)</sup> pressão (precipitação com CO<sub>2</sub>) ou volume de solução 2,0 mol·L<sup>-1</sup> (precipitação com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

<sup>2)</sup> NaHCO<sub>3</sub> (precipitação com CO<sub>2</sub>) ou Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (precipitação com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

<sup>3)</sup> experimento controle: insulina não submetida à precipitação

Uma comparação dos valores de *K<sub>ITT</sub>* das diversas amostras de insulina (Tabela 5.2) usando o teste *t* indica que não houve perda significativa de atividade biológica nas amostras precipitadas com CO<sub>2</sub> a 3,0 bar e a 6,0 bar, mas a amostra precipitada a 16,0 bar teve atividade biológica significativamente menor que a amostra de controle. Isso pode ser o resultado do processo de despressurização, que a 16,0 bar produziu muito

mais espuma que nos sistemas em pressão mais baixa. Grande parte da insulina nas amostras obtidas a 16,0 bar foi recuperada da espuma, e pode ter sido, por esta razão, desnaturada [45]. Tal desnaturação seria causada pela exposição de moléculas protéicas e sua adsorção na interface gás-líquido: a molécula protéica se desnovele e expõe seus grupos hidrofóbicos nesta interface, levando a mudanças conformacionais e, possivelmente, desnaturação [45,46]. Estes resultados sugerem que, para minimizar a perda de atividade, as seguintes ações podem ser tomadas: a) a precipitação de proteína com  $\text{CO}_2$  deve ser conduzida em baixas pressões, para reduzir a formação de espuma, ou b) o sistema deve ser lentamente despressurizado, ou c) o precipitado deve ser recuperado antes da despressurização. Com respeito às amostras precipitadas com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , somente os precipitados obtidos em solução  $0,010 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  apresentaram atividade biológica significativamente menor que a amostra de controle. Esta perda de atividade é causada provavelmente pelo fato de a capacidade tamponante do  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em solução  $0,010 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ser inferior à das soluções mais concentradas: a solução pode não ter sido capaz de evitar extremos de pH durante a adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  concentrado, levando à desnaturação. Estes resultados sugerem que a precipitação com dióxido de carbono é comparável à precipitação com ácidos convencionais no que diz respeito à preservação da atividade biológica, desde que a formação de espuma seja evitada na etapa de despressurização.

### 5.5. Conclusões

Neste trabalho demonstrou-se que a insulina suína pode ser precipitada com dióxido de carbono sem perda significativa de atividade biológica, desde que a formação de espuma seja evitada. Os dados experimentais de equilíbrio mostraram que o comportamento da solubilidade desta proteína é retrógrado com respeito à temperatura. O modelo termodinâmico proposto para correlacionar a solubilidade de insulina com variáveis do sistema forneceu resultados razoáveis, e a consideração da auto-associação da insulina foi fundamental para uma boa descrição do equilíbrio sólido-líquido.

### 5.6. Nota adicional

A modelagem da solubilidade da insulina é talvez o ponto mais delicado deste trabalho – a saber, qual a pertinência de se aplicarem as equações (5.13) ou (5.14) a uma espécie carregada em fase líquida e com elas calcular o equilíbrio sólido-líquido?

Deve-se ressaltar que a abordagem apresentada tem sua base em outros trabalhos da literatura [47]. Entretanto, é possível entender também uma proteína em solução como um conjunto de moléculas dotadas de cargas discretas distintas. Esta abordagem será apresentada no Capítulo 7 desta tese – trabalho cuja motivação surgiu da reavaliação dos dados apresentados neste capítulo.

### 5.7. Referências

- [1] Jordan PJ, Lay K, Ngan N, Rodley GF, Casein production using high pressure carbon dioxide, *New Zeal. J. Dairy Sci.*, **22**, 247-256, 1987.
- [2] Hofland GW, van Es M, van der Wielen LAM, Witkamp GJ, Isoelectric precipitation of casein using high pressure CO<sub>2</sub>, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **38**, 4919-4927, 1999.
- [3] Hofland GW, de Rijke A, Thiering R, Witkamp GJ, van der Wielen LAM, Isoelectric precipitation of soybean protein using carbon dioxide as a volatile acid, *J. Chrom. B*, **743**, 357-368, 2000.
- [4] Tomasula PM, Craig JC, Mcaloon AJ, Economic analysis of a continuous casein process using carbon dioxide as precipitant, *J. Dairy Sci.*, **81**, 3331-3342, 1998.
- [5] Spilimbergo S, Bertucco A, Basso G, Bertoloni G, Determination of extracellular and intracellular pH of *Bacillus subtilis* suspension under CO<sub>2</sub> treatment, *Biotechnol. Bioeng.*, **92**, 447-451, 2005.
- [6] Tomasula PM, Craig JC, Boswell RT, Cook RD, Kuranz MJ, Maxwell M, Preparation of casein using carbon dioxide, *J. Dairy Sci.*, **78**, 506-514, 1995.
- [7] Tomasula PM, Craig JC, Boswell RT, A continuous process for casein production using high-pressure carbon dioxide, *J. Food Eng.*, **33**, 405-419, 1997.
- [8] Golubovic M, van Hateren SH, Ottens M, Witkamp GJ, van der Wielen LAM, Novel method for the production of pure glycinin from soybeans, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5265-5269, 2005.
- [9] Thiering R, Hofland G, Foster N, Witkamp GJ, van de Wielen L, Carbon dioxide induced soybean protein precipitation: Protein fractionation, particle aggregation, and continuous operation, *Biotechnol. Prog.*, **17**, 513-521, 2001.



- [10] Thiering R, Hofland G, Foster N, Witkamp GJ, van de Wielen L, Fractionation of soybean proteins with pressurized carbon dioxide as a volatile electrolyte, *Biotechnol. Bioeng.*, **73**, 1-11, 2001.
- [11] Golubovic M, van Hateren SH, Ottens M, Witkamp GJ, van der Wielen LAM, A method for lipase co-precipitation in a biodegradable protein matrix, *Biotechnol. Bioeng.*, **98**, 1209-1218, 2007.
- [12] Beutier D, Renon H, Representation of  $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{S-H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$  and  $\text{NH}_3\text{-SO}_2\text{-H}_2\text{O}$  vapor-liquid equilibria, *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev.*, **17**, 220-230, 1978.
- [13] Edwards TJ, Maurer G, Newman J, Prausnitz JM, Vapor-liquid equilibria in multicomponent aqueous solutions of volatile weak electrolytes, *AIChE J.*, **24**, 966-976, 1978.
- [14] Edwards TJ, Newman J, Prausnitz JM, Thermodynamics of aqueous solutions containing volatile weak electrolytes, *AIChE J.*, **21**, 248-258, 1975.
- [15] Göppert U, Maurer G, Vapor-liquid equilibria in aqueous solutions of ammonia and carbon dioxide at temperatures between 333 and 393K and pressures up to 7 MPa, *Fluid Phase Equilibria*, **41**, 153-185, 1988.
- [16] Kawazuishi K, Prausnitz JM, Correlation of vapor-liquid equilibria for the system ammonia-carbon dioxide-water, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **26**, 1482-1485, 1987.
- [17] Rumpf B, Maurer G, An experimental and theoretical investigation on the solubility of carbon dioxide in aqueous solutions of strong electrolytes, *Berich. Bunsen Gesell.*, **97**, 85-97, 1993.
- [18] Rumpf B, Maurer G, Solubility of carbon dioxide in aqueous solutions of ammonium chloride at temperatures from 313 K to 433 K and pressures up to 10 MPa, *Berich. Bunsen Gesell.*, **98**, 1077-1081, 1994.
- [19] Xia J, Rumpf B, Maurer G, Solubility of carbon dioxide in aqueous solutions containing sodium acetate or ammonium acetate at temperatures from 313 to 433 K and pressures up to 10 MPa, *Fluid Phase Equilibria*, **155**, 107-125, 1999.
- [20] Xia J, Rumpf B, Maurer G, Corrigendum to "Solubility of carbon dioxide in aqueous solutions containing sodium acetate or ammonium acetate at temperatures from 313 to 433 K and pressures up to 10 Mpa", *Fluid Phase Equilibria*, **168**, 283-284, 2000.
- [21] Feher G, Kam Z, Nucleation and growth of protein crystals: general principles and assays, *Method. Enzymol.*, **114**, 77-112, 1985.
- [22] Asherie N, Protein crystallization and phase diagrams, *Methods*, **34**, 266-272, 2004.

- [23] Pitzer KS, Thermodynamics of electrolytes. I. Theoretical basis and general equations, *J. Phys. Chem.*, **77**, 268-277, 1973.
- [24] Stryer L, Biochemistry, 4<sup>th</sup> ed, New York: W. H. Freeman and Company, 1064p, 1995.
- [25] Gehle D, Schügerl E, Protein recovery by continuous flotation, *Appl. Microbiol. Biot.*, **20**, 133-138, 1984.
- [26] Lundbaek K, Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus, *Brit. Med. J.*, **1(5291)**, 1507-1513, 1962.
- [27] Bonora E, Manicardi V, Zavaroni I, Coscelli C, Butturini U, Relationships between insulin-secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose-intolerance, *Diabetes Metab.*, **13**, 116-121, 1987.
- [28] Kurz F, Rumpf B, Maurer G, Vapor-liquid-solid equilibria in the system  $\text{NH}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$  from around 310 to 470 K: new experimental data and modeling, *Fluid Phase Equilibria*, **104**, 261-275, 1995.
- [29] Edsall JT, Gutfreund H, Biothermodynamics, the study of biochemical processes at equilibrium, Chichester: John Wiley & Sons, 248p, 1983.
- [30] Blundell T, Dodson G, Hodgkin D, Mercola D, Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology, In: Anfinsen Jr CB, Edsall JT, Richards FM (eds.), 1972, *Advances in Protein Chemistry*, New York: Academic Press, p. 279-403, 1972.
- [31] Goldman J, Carpenter FH, Zinc binding, circular dichroism, and equilibrium sedimentation studies on insulin (bovine) and several of its derivatives, *Biochemistry-US*, **13**, 4566-4574, 1974.
- [32] Jeffrey PD, Coates JH, An equilibrium ultracentrifuge study of the self-association of bovine insulin, *Biochemistry-US*, **5**, 489-498, 1966.
- [33] Helmerhorst E, Stokes GB, Self-association of insulin: determinations based on a differential gel adsorption procedure, *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**, 238-247, 1986.
- [34] Milthorpe BK, Nichol LW, Jeffrey PD, The polymerization pattern of zinc(II)-insulin at pH 7,0, *Biochim. Biophys. Acta*, **495**, 195-202, 1977.
- [35] Nettleton EJ, Tito P, Sunde M, Bouchard M, Dobson CM, Robinson CV, Characterization of the oligomeric states of insulin in self-assembly and amyloid fibril formation by mass spectrometry, *Biophys. J.*, **79**, 1053-1065, 2000.
- [36] Pessôa Filho PA, Mohamed RS, A chemical theory based equation of state for self-associating compounds, *Thermochim. Acta*, **328**, 65-71, 1999.

- [37] Meyssami B, Balaban MO, Teixeira AA, Prediction of pH in model systems pressurized with carbon dioxide, *Biotechnol. Progr.*, **8**, 149-154, 1992.
- [38] Shih YC, Prausnitz JM, Blanch HW, Some characteristics of protein precipitation by salts, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1155-1164, 1992.
- [39] Kaarsholm NC, Havelung S, Hougaard P, Ionization behavior of native and mutant insulins: pK perturbation of B13-Glu in aggregated species, *Arch. Biochem. Biophys.*, **283**, 496-502, 1990.
- [40] Wintersteiner O, Abramson HA, The isoelectric point of insulin - electrical properties of adsorbed and crystalline insulin, *J. Biol. Chem.*, **99**, 741-753, 1933.
- [41] Bernardo A, Calmanovici CE, Miranda EA, Induction time as an instrument to enhance comprehension of protein crystallization, *Cryst. Growth Des.*, **4**, 799-805, 2004.
- [42] Christopher GK, Phipps AG, Gray RJ, Temperature-dependent solubility of selected proteins, *J. Cryst. Growth*, **191**, 820-826, 1998.
- [43] Feeling-Taylor AR, Banish RM, Hirsch RE, Vekilov PG, Miniaturized scintillation technique for protein solubility determinations, *Rev. Sci. Instrum.*, **70**, 2845-2849, 1999.
- [44] Vekilov PG, Feeling-Taylor AR, Yau ST, Petsev D, Solvent entropy contribution to the free energy of protein crystallization, *Acta Crystallogr. D*, **58**, 1611-1616, 2002.
- [45] Maa YF, Hsu CC, Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface, *Biotechnol. Bioeng.*, **54**, 503-512, 1996.
- [46] Clarkson JR, Cui ZF, Darton RC, Protein denaturation in foam. I. Mechanism study, *J. Colloid Interf. Sci.*, **215**, 323-332, 1999.
- [47] Agena SM, Pusey ML, Bogle DL, Protein solubility modeling, *Biotechnol. Bioeng.*, **64**, 144-150, 1999.



## **6. Modelagem termodinâmica de soluções de polieletrólitos**

### **Resumo**

Neste capítulo apresenta-se uma extensão da equação de Pitzer para a modelagem de soluções aquosas de polieletrólitos. O modelo desenvolvido mantém a forma original do modelo de Pitzer, mas introduz duas modificações principais: assume-se que uma fração constante de unidades monoméricas do polieletrólito é dissociada (fração que independe da concentração do polieletrólito), e introduz-se uma expressão modificada para a força iônica (em que cada unidade monomérica é individualmente considerada). A equação resultante foi utilizada para a correlação de dados de coeficiente osmótico de soluções aquosas de polieletrólitos e de soluções de polieletrólitos e sais. O modelo também foi aplicado à correlação de dados de equilíbrio líquido-líquido de alguns sistemas aquosos bifásicos que se formam pela adição simultânea de polieletrólitos e polímeros hidrofílicos neutros (neste caso, polietileno glicol) à água. Uma concordância muito boa entre os dados experimentais e o modelo proposto foi observada para todos os sistemas investigados.

### **6.1. Introdução**

Polieletrólitos são polímeros cuja unidade monomérica é ionizável em solução aquosa. Estes compostos têm recebido atenção nas últimas décadas, principalmente por serem comuns em sistemas biológicos, pois proteínas, DNA e RNA são polieletrólitos; além disso, o número de suas aplicações é crescente, não somente entre as ciências da vida, mas também em outras áreas, como nas indústrias de cosméticos, de alimentos e química. O projeto de produtos contendo polieletrólitos e de processos para sua produção requer o conhecimento consolidado de suas propriedades termodinâmicas e modelos para correlacionar (e eventualmente predizer) as propriedades de suas soluções. Embora algumas teorias para o estudo de propriedades termodinâmicas de soluções aquosas de polieletrólitos estejam disponíveis na literatura [1-7], o conjunto de modelos termodinâmicos para essas soluções ainda é pequeno, particularmente quando comparado ao conjunto de modelos para soluções aquosas de eletrólitos de baixa massa molar; em particular, resente-se da ausência de métodos que possam ser diretamente

aplicados em cálculos de engenharia. A razão para essa observação é certamente o alto número de fenômenos que podem ter influência nas propriedades termodinâmicas dessas soluções, e que se reflete na impossibilidade de se utilizarem métodos muito simplificados. Entre esses fenômenos estão, por exemplo, o papel das forças de longo-alcance e curto alcance, os fenômenos oriundos da natureza polimérica dos polieletrólitos (tais como a exclusão de volume, a polidispersão, a estrutura da cadeia polimérica), a possível condensação de contra-íons em cadeias poliméricas carregadas, entre outros.

Os fundamentos da modelagem termodinâmica de soluções aquosas de polieletrólitos foram estabelecidos por Lifson e Katchalsky [1,2]. De acordo com estes autores, a presença de cargas elétricas no macro-íon tensiona a molécula polimérica, de modo que cadeias não-ramificadas assumem forma aproximadamente cilíndrica. Lifson e Katchalsky consideraram que as cargas elétricas distribuem-se uniformemente na superfície deste cilindro e que os contra-íons formam uma nuvem iônica ao redor da cadeia polimérica. Essa nuvem é limitada ao espaço entre o cilindro interno (a cadeia carregada) e um cilindro externo, e os contra-íons distribuem-se uniformemente nessa região. O raio do cilindro externo depende da concentração do polieletrólito, e as interações eletrostáticas nessa nuvem são descritas pela equação de Poisson-Boltzmann.

Este modelo serviu de base ao trabalho de diversos autores. Como exemplo, Dólar e Peterlin [3] entenderam-no à modelagem de polieletrólitos com dois diferentes contra-íons. Uma das extensões mais importantes foi apresentada por Manning [4,5]. A idéia fundamental introduzida por Manning é o conceito de condensação de contra-íons; em vez de assumir uma distribuição boltzmanniana, Manning considerou que as forças coulômbicas que agem em uma cadeia polimérica densamente carregada atraem os íons de carga oposta, resultando na formação de pares iônicos. Esse fenômeno é conhecido por *condensação* e resulta em uma redução da carga líquida do polímero, e a equação de Poisson-Boltzmann é resolvida levando-o em conta. A energia de Gibbs da solução é dividida em cinco termos: um relacionado às interações eletrostáticas entre a cadeia polimérica e a nuvem iônica da vizinhança, outro relacionado à condensação do contra-íon, e três termos resultantes das interações com os contra-íons livres, com os outros íons presentes em solução e com o solvente. Em diluição infinita no solvente, duas situações são possíveis: ou todos os contra-íons estão livres ou alguns deles estão ligados como pares iônicos, condensados na cadeia polimérica. Abaixo de uma certa

densidade de carga na cadeia polimérica, todos os contra-íons são móveis (dissociados), enquanto além desse limite observa-se a condensação, que resulta em uma densidade de carga mais baixa na cadeia polimérica. A teoria foi estendida pelo próprio Manning [6] e tem sido adotada em trabalhos mais recentes de outros autores, embora nem sempre seja utilizada de maneira direta. O conceito proposto por Manning é compatível com simulações de dinâmica molecular de soluções de polieletrólitos, que mostram modificações de configuração na cadeia polimérica e a condensação de contra-íons, por exemplo, no trabalho de Stevens e Kremer [7].

Há outros exemplos da solução da equação de Poisson-Boltzmann, que fazem hipóteses diversas sobre as condições de contorno com as quais a equação é resolvida, e são de algum modo relacionados aos trabalhos previamente mencionados. O modelo de Feng, Liu e Hu [8], que consideraram a presença de sais em solução aquosa, é um exemplo interessante, bem como os trabalhos de Ospeck e Fraden [9], que apresentaram a solução da equação de Poisson-Boltzmann para dois cilindros confinados entre duas superfícies planas, de Dahnert e Huster [10,11], que resolveram a mesma equação para polieletrólitos de forma achatada imersos em solução salina, e de Rodenbeck et al. [12], que a resolveram usando a aproximação de células elementares em redor de um corpo central simetricamente carregado. A aplicação de funções de correlação do tipo cavidade foi investigada por Jiang et al. [13,14]. Entretanto, o uso da equação de Poisson-Boltzmann no estudo desses sistemas também tem atraído críticas. Por exemplo, Blaul et al. [15], ao compararem os resultados derivados da equação de Poisson-Boltzmann com dados experimentais de pressão osmótica, concluíram que a diferença entre os comportamentos predito e experimental pode ser devida a algumas insuficiências do modelo, por exemplo, no tratamento de correlações íon-íon. Deserno et al. [16] observaram que o modelo de células superestima de maneira sistemática o coeficiente osmótico. Colby et al. [17] mostraram que em faixa intermediária de concentrações (semi-diluídas), as hipóteses usadas para resolver a equação de Poisson-Boltzmann não são mais válidas. Diehl et al. [18] observaram que as interações de curto-alcance entre cadeias poliméricas podem não ser negligenciáveis. Outras investigações, por exemplo, por simulações Monte Carlo [19], por simulações de dinâmica molecular [20] e por teorias de campo [21] também já foram utilizadas para obter um melhor entendimento do comportamento de soluções de polieletrólitos. Embora tais investigações sejam muito importantes do ponto de vista teórico, deve-se reconhecer que é muito difícil

aplicá-las ou usar seus resultados de maneira direta em cálculos de engenharia. Essa afirmação é particularmente verdadeira para o estudo de soluções aquosas contendo um polieletrólito e outros compostos, como sais e polímeros neutros. Há dificuldades relacionadas a fatores computacionais (que ainda hoje podem constituir um impedimento) bem como à ausência de informação suficiente para a aplicação das equações resultantes. Assim, apesar de todo o trabalho teórico anteriormente relatado, subsiste a necessidade de modelos simplificados que possam ser aplicados na descrição do equilíbrio de fases em soluções de polieletrólitos em concentrações intermediárias e altas. Tanto quanto se pôde verificar, Nagvekar e Danner [22] foram os primeiros a buscar uma descrição termodinâmica para esses sistemas. Eles consideraram a energia de Gibbs excedente de uma solução aquosa de polieletrólitos como a soma de duas contribuições: uma de interações de longo alcance e outra de interações de curto alcance. A contribuição de longo alcance foi aproximada pelos resultados de Manning para soluções aquosas no limite da diluição infinita [4], enquanto para a contribuição de curto alcance utilizou-se a equação NRTL modificada de Chen e Evans [23]. Nagvekar e Danner [22] aplicaram seu modelo na correlação de resultados experimentais do coeficiente virial osmótico de soluções aquosas de polieletrólitos.

Khokhlov e Nyrkova [24] modificaram a equação de Flory [25] para soluções de polímeros neutros, levando em conta a condensação de contra-íons mas negligenciando a influência da concentração do polímero nesta condensação. Os contra-íons não são tratados como espécies adicionais, mas sua influência é considerada na estatística do reticulado; a mudança resultante no número de estados é causada pelo aumento no número de graus de liberdade translacionais. Khokhlov e Nyrkova [24] não introduziram uma contribuição adicional para levar em conta as interações de longo alcance entre moléculas de polieletrólitos. Gottschalk et al. [26] apresentaram uma extensão desse modelo, considerando os contra-íons como espécies distintas. Esta extensão compreende um modelo com dois parâmetros ajustáveis: o grau de dissociação<sup>1</sup> e um parâmetro de interação binária. Seguindo o trabalho de seus

---

<sup>1</sup> O termo grau de dissociação está relacionado ao grau de condensação, e ambos fundamentalmente exprimem o mesmo fato de pontos de vista diferentes. Se considerarmos a integridade de uma molécula de polieletrólito (cadeia polimérica + contra-íons), em solução aquosa ocorrerá a dissociação iônica dessa estrutura, e o grau de dissociação será a fração de contra-íons que se tornaram livres. Por outro lado, se considerarmos que na ausência de quaisquer interações todos os contra-íons estariam livres, em uma



predecessores, Gottschalk et al. [26] também negligenciaram interações de longo alcance. Esses autores variaram sistematicamente os parâmetros ajustáveis de modo a calcular e predizer diagramas de fases; uma de suas observações fundamentais é que o aumento na densidade de cargas resulta em um aumento na solubilidade do polímero, o que está de acordo com o comportamento experimental.

Neste capítulo, uma extensão do modelo de Pitzer desenvolvida para a energia de Gibbs excedente soluções aquosas de polieletrólitos é apresentada. A extensão consiste de dois passos principais: a introdução de um grau constante de dissociação (para levar em conta os efeitos da condensação de contra-íons) e a redefinição de força iônica (para levar em conta o fato de que a cadeia polimérica carregada não é uma carga pontual). O modelo é apresentado em detalhe na próxima seção, e foi aplicado na correlação de coeficientes osmóticos de soluções de polieletrólitos – com ou sem a adição de sais – bem como ao equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos contendo um polieletrólito e um polímero neutro.

## 6.2. Fundamentação teórica

A energia de Gibbs ( $G$ ) relaciona-se ao potencial químico  $\mu_i$  de um componente  $i$  em solução por meio da equação:

$$\mu_i = \left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T, p, n_{j \neq i}} \quad (6.1)$$

Na termodinâmica de soluções, é prática comum expressar o potencial químico a partir de um estado de referência (em mesma temperatura, mas com composição  $c^{ref}$  e pressão  $p^{ref}$ ) e adicionar um termo de correção para o desvio com respeito a esse estado de referência:

$$\mu_i(T, p, c) = \mu_i^{ref}(T, p^{ref}, c^{ref}) + RT \ln a_i(T, p, c) \quad (6.2)$$

Para soluções de eletrólitos, como regra utilizam-se estados de referência distintos para solutos e solventes. Para o soluto, o estado de referência corresponde a um estado nas mesmas temperatura e pressão da solução, mas cuja composição depende da escala de concentração por meio da qual se descreve o sistema. Quando, como no presente caso, se utiliza a molalidade (ou seja, a quantidade de matéria do soluto por

---

solução real alguns contra-íons estarão ligados à cadeia – condensados, conforme a terminologia de Manning.

quilograma de solvente) para expressar a concentração do soluto, este estado de referência corresponde a uma solução de  $1,0 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$  do componente  $i$  no solvente, mas na qual o soluto apresenta as mesmas interações que apresentaria no estado de diluição infinita. No caso específico de polieletrólitos, assume-se que neste estado de referência a molécula esteja completamente dissociada.

$$\mu_i^{ref} = \mu_i(T, p, \text{interações} : m_i \rightarrow 0 \text{ no solvente; composição} : m_i \rightarrow 1 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}) \quad (6.3)$$

A atividade  $a_i$  do soluto é introduzida para descrever a diferença de potencial químico entre a solução real e o estado de referência. Ela é expressa como o produto da concentração (nesse caso, a molalidade  $m_i$ ) e o coeficiente de atividade ( $\gamma_i$ ):

$$a_i = m_i \cdot \gamma_i \quad (6.4)$$

A concentração corrige o efeito de diluição (embora as interações ainda sejam as mesmas do estado de referência), enquanto o coeficiente de atividade resulta da diferença nas interações que o soluto apresenta na solução real em comparação ao estado de referência. Desse modo, em uma mistura ideal a atividade do soluto será simplesmente sua molalidade:

$$a_i^{MI} = m_i \quad (6.5)$$

O potencial químico do solvente (identificado pelo subscrito  $s$ ) também pode ser separado em duas contribuições, como apresentado na equação (6.2), com a diferença de que o estado de referência para o solvente é o componente puro às mesmas pressão e temperatura da solução:

$$\mu_s(T, p, c) = \mu_s(T, p) + RT \ln a_s(T, p, c) \quad (6.6)$$

Em modelos de soluções de eletrólitos, a atividade  $a_s$  do solvente é usualmente calculada a partir da atividade dos solutos por meio da equação de Gibbs-Duhem. Em uma mistura ideal a atividade do solvente torna-se:

$$a_s^{MI} = \exp\left(-M_s^* \sum_i m_i\right) \quad (6.7)$$

na qual o somatório é feito com respeito a todos os solutos  $i$ , e  $M_s^*$  é a massa molar do solvente expressa em  $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

A não-idealidade de uma solução aquosa de um polieletrólito pode ser quantificada pelas atividades do solvente na solução real e em uma solução ideal por meio do coeficiente osmótico  $\phi$ :

$$\phi = \frac{\ln a_w(T, P, m_p)}{\ln a_w^{MI}(T, P, m_p)} \quad (6.8)$$

Para uma solução ideal, o coeficiente osmótico é igual a 1,0. Em uma solução ideal, o polieletrólito está completamente dissociado, os íons não interagem entre si ou com a cadeia carregada, e o solvente não tem interações específicas com o polieletrólito. Considerando que a molécula consista de  $r_p$  grupos monoméricos, e que somente um único contra-íon dissocie-se de cada unidade monomérica, a atividade da água em uma solução aquosa ideal de um polieletrólito torna-se:

$$\ln a_w^{MI} = -M_w^* m_p (1 + r_p) \quad (6.9)$$

Na ocorrência da condensação de contra-íons, somente um certo número de íons  $v_p$  (em vez de  $r_p$ ) são dissociados da cadeia polimérica. Em soluções suficientemente diluídas, pode-se considerar que os solutos tenham as mesmas interações que em diluição infinita, de modo que a atividade de água se torna:

$$\ln a_w = -M_w^* m_p (1 + v_p) \quad (6.10)$$

e o valor limite do coeficiente osmótico (ou seja, o valor do coeficiente osmótico em diluição infinita do polieletrólito em água pura) torna-se:

$$\phi^\infty = \lim_{m_p \rightarrow 0} \phi = \frac{1 + v_p}{1 + r_p} \quad (6.11)$$

Conforme a equação (6.11), o valor limite do coeficiente osmótico de soluções aquosas de polieletrólitos é inferior ou igual a 1,0, e a extensão da condensação de contra-íons (ou, inversamente, o grau de dissociação) pode ser determinada a partir deste valor. Em soluções mais concentradas, as interações entre solutos têm de ser consideradas por meio da energia de Gibbs excedente  $G^E$ :

$$G^E = G - \sum_{\text{solutos } i} (n_i \mu_i^{MI}) - n_w (\mu_w^{ref} + RT \ln a_w^{MI}) \quad (6.12)$$

em que  $G$  é a energia de Gibbs da solução:

$$G = \sum_{\text{componentes } i} (n_i \mu_i) \quad (6.13)$$

e

$$\mu_i^{MI} = \mu_i^{ref} + RT \ln m_i \quad (6.14)$$

Para soluções aquosas de eletrólitos, a energia de Gibbs excedente é comumente escrita como a soma de duas contribuições, uma relacionada a interações de curto alcance e outra, às interações de longo alcance:

$$G^E = G^{E,LR} + G^{E,SR} \quad (6.15)$$

As equações (6.1.) e (6.15) em conjunto levam a que o coeficiente de atividade dos solutos também seja separado em dois termos relacionados. Em uma solução aquosa de um polieletrólito, o número de contra-íons livres é maior (algumas vezes, muito maior) que o número de cadeias poliméricas. A concentração limitante, além da qual a energia de Gibbs excedente não pode ser negligenciada, pode ser expressa pela molalidade dos contra-íons livres, sendo da ordem de aproximadamente  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

A equação de Pitzer [27,28] para a energia de Gibbs excedente de soluções aquosas de eletrólitos fortes de baixa massa molar é aqui utilizada como ponto de partida para a formulação de uma equação para soluções aquosas de polieletrólitos. Em muitas publicações prévias se há mostrado que o modelo de Pitzer pode ser estendido para a descrever a energia de Gibbs de uma solução aquosa que contenha simultaneamente um eletrólito forte e um polímero neutro [29,30]. Neste trabalho, estende-se o modelo de Pitzer para soluções de polieletrólitos.

O modelo de Pitzer inclui uma modificação da equação de Debye-Hückel para as interações de longo alcance relacionadas às forças coulômbicas:

$$\frac{G^{E,LR}}{n_w M_w^* RT} = -A_\phi \frac{4I}{b} \ln(1 + b\sqrt{I}) \quad (6.16)$$

Esta expressão é adequada para a descrição do coeficiente de atividade de íons em altas diluições, mas não pode ser diretamente aplicada a soluções de polieletrólitos. A principal razão de tal restrição é o fato de que o termo de Debye-Hückel é desenvolvido para cargas elétricas pontuais (tais como os contra-íons livres), mas não é válido para cadeias poliméricas altamente carregadas, nas quais se distribuem uniformemente muitas cargas pontuais. A equação (6.16) deve ser então modificada para redefinir a força iônica, e isso é feito seguindo a proposta da expressão de Manning:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i m_i \sigma_i z_i^2 \quad (6.17)$$

em que  $\sigma_i$  é o número de cargas pontuais da espécie  $i$  e  $z_i$  é o valor de cada carga pontual. Para os contra-íons livres (tanto dissociados da cadeia de polieletrólito como oriundos de sais adicionados),  $\sigma_i=1$ , e para a cadeia do polieletrólito,  $\sigma_i$  é o número de grupos monoméricos efetivamente ionizados.

Das equações (6.16) e (6.17) pode-se obter para um soluto (cadeia polimérica, contra-íons ou íons de outros sais eventualmente adicionados):

$$\ln \gamma_i^{LR} = -A_\phi \sigma_i z_i^2 \left( \frac{2}{b} \ln(1 + b\sqrt{I}) + \frac{\sqrt{I}}{1 + b\sqrt{I}} \right) \quad (6.18)$$

e para o solvente:

$$\ln \gamma_w^{LR} = 2A_\phi M_w^* \frac{I^{1.5}}{1 + b\sqrt{I}} \quad (6.19)$$

Conforme Pitzer [27,28]  $b = 1,2 \text{ kg}^{1/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$ . Na temperatura de 298,2 K o parâmetro do termo de Debye-Hückel é  $A_\phi = 0,3914 \text{ kg}^{1/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$ .

O termo de curto alcance é uma equação virial também oriunda de Pitzer [28]:

$$\frac{G^{E,SR}}{n_w M_w^* RT} = \sum_{i \neq w} \sum_{j \neq w} \lambda_{ij}(I) m_i m_j + \sum_{i \neq w} \sum_{j \neq w} \sum_{k \neq w} \Lambda_{ijk} m_i m_j m_k \quad (6.20)$$

com:

$$\lambda_{ij}(I) = \lambda_{ij}^{(0)} + \lambda_{ij}^{(1)} \frac{2}{\alpha^2 I} \left( 1 - (1 + \alpha\sqrt{I}) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right) \quad (6.21)$$

Destas equações, resulta para o coeficiente de atividade de um soluto:

$$\ln \gamma_i^{SR} = 2 \sum_{j \neq w} \lambda_{ij}(I) m_j + 3 \sum_{j \neq w} \sum_{k \neq w} \Lambda_{ijk} m_j m_k \quad (6.22)$$

$$- \sigma_i z_i^2 M_w \sum_{j \neq w} \sum_{k \neq w} \lambda_{ij}^{(1)} \frac{1}{\alpha^2 I^2} \left( 1 - \left( 1 + \alpha\sqrt{I} + \frac{\alpha^2 I}{2} \right) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right) m_j m_k$$

e do solvente:

$$\ln \gamma_w^{SR} = -M_w^* \left( \sum_{i \neq w} \sum_{j \neq w} \left( \lambda_{ij}^{(0)} + \lambda_{ij}^{(1)} \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right) m_i m_j + \sum_{i \neq w} \sum_{j \neq w} \sum_{k \neq w} \Lambda_{ijk} m_i m_j m_k \right) \quad (6.23)$$

A equação final para a atividade de um soluto  $i$  e do solvente (água) é obtida pelo acoplamento das expressões anteriores por meio de:

$$a_i = m_i \cdot \gamma_i^{LR} \cdot \gamma_i^{SR} \quad (6.24)$$

$$a_w = \exp \left( -M_w^* \sum_i m_i \right) \cdot \gamma_w^{LR} \cdot \gamma_w^{SR} \quad (6.25)$$

As matrizes  $\lambda$  e  $\Lambda$  são simétricas; assim, por exemplo,  $\lambda_{ij}^{(0)} = \lambda_{ji}^{(0)}$ . Uma solução aquosa de um polieletrólito consiste de dois solutos: a cadeia polimérica (parcial ou totalmente dissociada) e os contra-íons. Assume-se que o grau de dissociação depende apenas da temperatura, mas não da concentração do polímero na solução aquosa, por razões posteriormente apresentadas. Além disso, interações entre espécies com cargas elétricas de mesmo sinal são negligenciadas. Considerou-se, na aplicação do modelo,

todas as interações ternárias negligenciáveis (ou seja,  $\Lambda_{ijk} = 0$ , para quaisquer  $i, j$  ou  $k$ ), de modo que restam para soluções aquosas de um único polieletrólito apenas dois parâmetros de interação binária ( $\lambda_{p,C}^{(0)}$  e  $\lambda_{p,C}^{(1)}$ , em que  $p$  e  $C$  representam a cadeia e os contra-íons livres, respectivamente). Se a solução aquosa também contiver um sal, as interações com os íons oriundos desse sal devem ser levadas em conta. Por exemplo, quando esse sal não contém o contra-íon, há dois parâmetros binários adicionais ( $\lambda_{Z,A}^{(0)}$  e  $\lambda_{Z,A}^{(1)}$ , em que  $Z$  e  $A$  representam o cátion e o ânion desse sal, respectivamente) e dois parâmetros para a interação entre os íons do sal e a cadeia polimérica ou os contra-íons livres. Quando houver também um componente neutro  $i$  na solução aquosa, o modelo contém um parâmetro adicional  $\lambda_{ij}^{(0)}$ , sendo em que  $j$  representa o soluto neutro, e  $i$ , as outras espécies em solução. Para simplificar a aplicação do modelo e reduzir o número de parâmetros ajustáveis, assumiu-se que os parâmetros de interação binária relacionados a cadeias poliméricas (neutras ou carregadas) são proporcionais ao número de unidades monoméricas que a constituem:

$$\lambda_{ij}^{(k)} = \bar{\lambda}_{ij}^{(k)} \cdot r_i \cdot r_j \quad \text{para } k = 0 \text{ e } 1 \quad (6.26)$$

em que  $\bar{\lambda}_{ij}^{(k)}$  é o parâmetro binário para interações entre os grupos das espécies  $i$  e  $j$ ,  $r_i$  e  $r_j$  são os números de grupos nos componentes  $i$  e  $j$ : para componentes de baixa massa molar,  $r_i = 1$ , e para polímeros,  $r_i$  corresponde ao número de unidades monoméricas.

### 6.2.1. Influência da dissociação / condensação de contra-íons

As propriedades termodinâmicas de soluções aquosas de polieletrólitos são fortemente influenciadas pelo grau de dissociação do polieletrólito, que altera não somente a força iônica, mas também os termos de curto e longo alcance da equação de energia de Gibbs. Isso pode ser demonstrado pela análise do comportamento calculado para o coeficiente osmótico de uma solução de um polieletrólito com contra-íons univalentes. Em uma solução com  $n_p$  mols desse polieletrólito dissolvidos em um quilograma de água, considerando que a cadeia polimérica tenha  $\sigma_p$  cargas elétricas monovalentes, a força iônica torna-se:

$$I = \sigma_p m_p \quad (6.27)$$

Considerando-se somente as interações de longo alcance (coulômbicas) por meio da equação (6.19), obtém-se para a atividade da água:

$$\ln a_w = \ln (a_w^{MI} \gamma_w^{LR}) = -M_w^* m_p (1 + \sigma_p) + 2A_\phi M_w^* \frac{I^{1.5}}{1 + 1.2\sqrt{I}} \quad (6.28)$$

e, para o coeficiente osmótico, considerando as equações (6.9) e (6.27):

$$\phi^{LR} = \frac{m_p(1 + \sigma_p) - 2A_\phi \frac{(\sigma_p m_p)^{1.5}}{1 + 1.2\sqrt{\sigma_p m_p}}}{m_p(1 + r_p)} \quad (6.29)$$

A Figura 6.1 apresenta o valor de  $\phi^{LR}$  para um polieletrólito hipotético com 100 unidades monoméricas em função da mono-molalidade do polieletrólito para diversos valores de grupos efetivamente dissociados da cadeia polimérica, de  $\sigma_p = 20$  a  $\sigma_p = 80$  a 298,2 K. Para um dado valor constante de unidades carregadas na cadeia polimérica, o coeficiente osmótico  $\phi^{LR}$  decresce constantemente com o aumento da molalidade do polieletrólito. Esse fato é corroborado por resultados de simulações Monte Carlo realizadas desconsiderando-se forças de curto alcance [19]. Entretanto, resultados experimentais para o coeficiente osmótico revelam um comportamento distinto: este valor aumenta com o aumento da concentração polimérica, podendo atingir valores superiores a 1,0. Uma das explicações aventadas na literatura para esse fato é uma possível diminuição na condensação de contra-íons (ou um aumento no grau de dissociação) com o aumento da concentração do polieletrólito. Essa hipótese é claramente insuficiente para explicar a situação em que o coeficiente osmótico é superior à unidade; desse modo, qualquer modelo que se pretenda válido para soluções mais concentradas precisa considerar também interações de curto alcance.

Esse exemplo hipotético mostra que resultados experimentais para o coeficiente osmótico não podem ser usados de maneira direta para determinar o grau de dissociação de um polieletrólito, exceto no limite de diluição infinita. Assim, da mesma forma que outros modelos da literatura [22,24,26], assume-se neste trabalho que o grau de dissociação não depende da concentração do polieletrólito em solução aquosa.





**Tabela 6.1.** Conjuntos de dados de coeficientes osmóticos para soluções de polieletrólitos a 298,2 K [31]

Polieletrólito	$M_u / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$M^{(1)} / \text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$	$M_n^{(2)} / \text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$	$r_p$	Número de dados	Abreviação
Poliacrilato de sódio	94,0	5,0	2,6	28	16	NaPA 5
		15,0	6,9	73	16	NaPA 15
Polimetacrilato de sódio	108,1	6,0	6,1	56	12	NaPMA 6
		15,0	14,2	132	6	NaPMA 15
Poliacrilato de amônio	89,1	5,0	2,3	26	12	NH <sub>4</sub> PA 5
		10,0	7,7	87	16	NH <sub>4</sub> PA 10
		20,0	7,3	82	4	NH <sub>4</sub> PA 20
Poliestireno sulfonato de sódio	207,3	70,0	127	612	10	NaPSS 70
Poliétileno sulfonato de sódio	130,1	2,0	1,6	12	3	NaPES 2
		10,0	6,9	53	10	NaPES 10

<sup>1)</sup> valores fornecidos pelo fabricante, <sup>2)</sup> valores obtidos por GPC [31].

### 6.3.1. Soluções aquosas de polieletrólitos

Resultados experimentais para o coeficiente osmótico a 298,2 K de soluções aquosas de 10 polieletrólitos foram usados na obtenção de parâmetros do modelo: sais de sódio – poliacrilato (NaPA), polimetacrilato (NaPMA), poliestireno sulfonato (NaPSS) e polietileno sulfonato (NaPES) – e de amônio – poliacrilato (NH<sub>4</sub>PA), conforme apresentado na Tabela 6.1. Foram ajustados os parâmetros binários ( $\bar{\lambda}_{p,C}^{(0)}$  e  $\bar{\lambda}_{p,C}^{(1)}$ ) de interação entre um grupo da cadeia polimérica  $p$  e o contra-íon  $C$  (tanto Na<sup>+</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e o grau de dissociação  $\varepsilon_p$ . O grau de dissociação é definido simplesmente como a razão entre o número de unidades monoméricas ionizadas ( $\sigma_p$ ) e o número total de unidades monoméricas ( $r_p$ ), e sua introdução tem tão somente a função de verificar se este parâmetro seria dependente do tamanho da cadeia do polieletrólito. O número de unidades monoméricas na cadeia do polieletrólito foi calculado a partir da massa molar ponderada pelo número  $M_n$  e da massa molar de uma unidade monomérica  $M_U$  (conforme Tabela 6.1):

$$r_p = M_n / M_U \quad (6.30)$$

O grau de dissociação foi inferido do valor limite do coeficiente osmótico, conforme a equação (6.11), e os parâmetros de interação binária foram obtidos por meio da minimização da seguinte função objetivo:

$$OF_1 = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^n (\phi_j^{calc} - \phi_j^{exp})^2} \quad (6.31)$$

em que  $N$  é o número total de valores experimentais  $j$ . Os sobrescritos *exp* e *calc* designam os resultados experimentais e calculados, respectivamente.

O conjunto de parâmetros do modelo e de valores limitantes adotados para o coeficiente osmótico é apresentado na Tabela 6.2. Há um certo grau de arbitrariedade no valor de  $\varepsilon_p$ , pois ele resulta da extrapolação de dados experimentais com concentrações relativamente altas de polieletrólito – a atividade de água difere muito pouco da unidade na região de baixas concentrações poliméricas, tornando a incerteza relativa considerável nesta região. Um estudo sobre a sensibilidade dos parâmetros revelou que pequenas mudanças no grau de dissociação influenciam os parâmetros binários ajustados sem afetar significativamente o desempenho do modelo, de modo que os resultados experimentais podem ser descritos por diferentes conjuntos de parâmetros (grau de dissociação e parâmetros binários). Os conjuntos apresentados na Tabela 6.2 são baseados nos melhores esforços para determinar o coeficiente osmótico em

concentração nula de polímero. Os resultados experimentais mostram que para o polietileno sulfonato de sódio (NaPES) e para o poliacrilato de amônio (NH<sub>4</sub>PA) o grau de dissociação depende do tamanho da cadeia polimérica. Os parâmetros de interação binária entre grupos ( $\bar{\lambda}_{ij}^{(k)}$ ) não deveriam depender do tamanho da cadeia polimérica, pois a estrutura do polímero não se altera. Entretanto, no caso de NaPES e NH<sub>4</sub>PA, não foi possível obter valores de  $\bar{\lambda}_{p,c}^{(k)}$  que não dependessem da massa molar do polímero. Assume-se que para esses polímeros algum parâmetro não considerado (por exemplo, a ocorrência de ligações cruzadas) dependa do tamanho da cadeia polimérica<sup>2</sup>.

**Tabela 6.2.** Resultados para a correlação de dados de coeficiente osmótico para soluções de polieletrólitos.

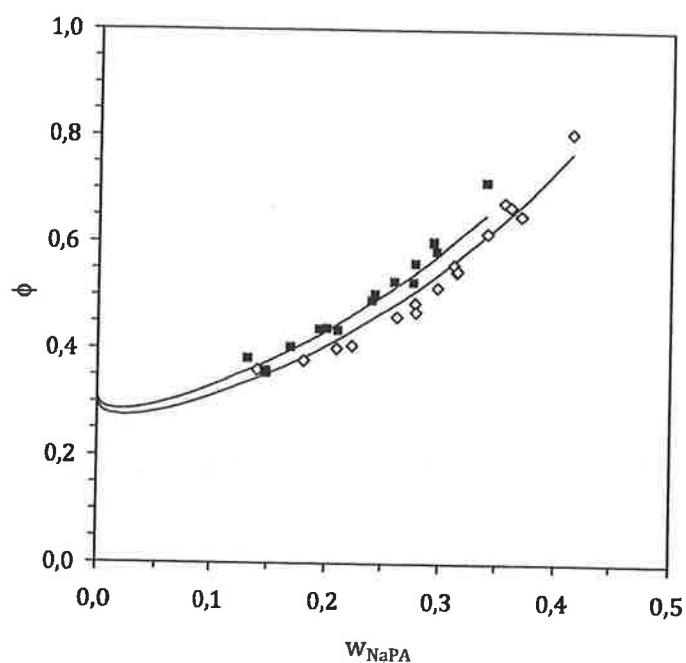
Polieletrólito	$OF_1$	$\bar{\lambda}_{p,c}^{(0)} / \text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\bar{\lambda}_{p,c}^{(1)} / \text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\varepsilon_p$	$\phi^\infty$
NaPA	0,032	0,1386	-0,0135	0,300	0,31
NaPMA	0,021	0,2700	-0,2664	0,300	0,31
NH <sub>4</sub> PA 5	0,013	0,0753	0,1783	0,330	0,35
NH <sub>4</sub> PA 10	0,016	0,0923	0,0759	0,300	0,31
NH <sub>4</sub> PA 20	0,019	0,0232	0,3208	0,330	0,34
NaPSS 70	0,012	0,0126	0,5809	0,575	0,65
NaPES 2	0,012	0,0398	0,3192	0,350	0,40
NaPES 10	0,024	0,0896	0,0684	0,200	0,21

<sup>1)</sup> Os parâmetros  $\bar{\lambda}_{p,c}$  referem-se a  $\bar{\lambda}_{p,\text{Na}^+}$  para sais de sódio e  $\bar{\lambda}_{p,\text{NH}_4^+}$  para sais de amônio

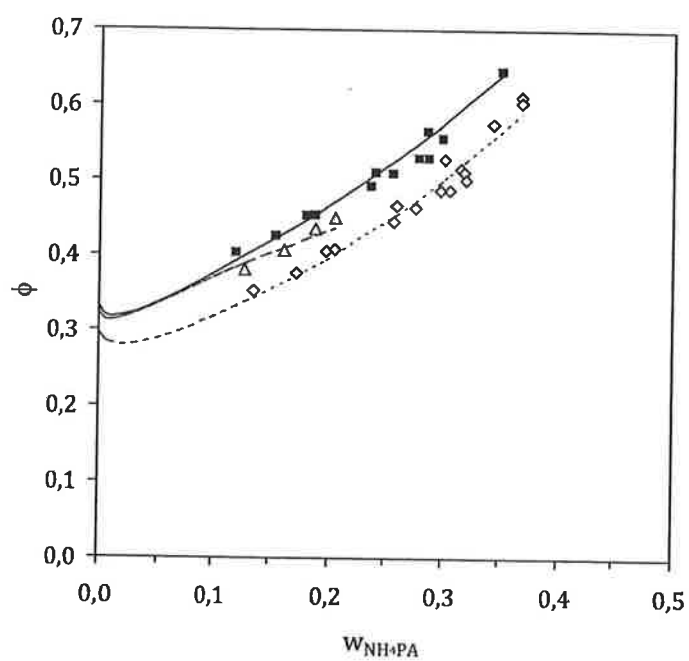
As Figuras 6.2 e 6.3 apresentam os resultados da aplicação do modelo proposto na correlação de coeficientes osmóticos de soluções de NaPA e NH<sub>4</sub>PA, respectivamente. O desvio entre os dados experimentais e os resultados da correlação é aproximadamente da mesma ordem de grandeza da incerteza experimental. Deve-se ter em mente que o coeficiente osmótico é mais sensível a esta incerteza do que a atividade

<sup>2)</sup> Os experimentos de GPC não revelaram, em princípio, a presença de contaminantes de baixa massa molar nas amostras usadas na obtenção de dados de atividade de água. Especificamente no que diz respeito às amostras de NH<sub>4</sub>PA 10 e 20, os dados de GPC mostram os mesmos valores de massas médias ponderadas [31]; as diferentes curvas de atividade de água podem, dessa maneira, estar ligadas a diferenças de estrutura.

de água, grandeza da qual deriva. Embora uma correlação adequada tenha sido obtida, os resultados para o NaPA apresentados na Figura 6.2 mostram que a hipótese de que o parâmetro de interação de grupo não depende do tamanho da cadeia do polieletrólito pode ser excessivamente restritiva. Dados da literatura usualmente revelam uma pequena dependência no coeficiente osmótico com respeito ao tamanho da cadeia polimérica; entretanto, essa influência pode ser, na maioria das vezes, creditada à incerteza experimental, o que justifica o uso da equação (6.26). Se efeitos de grupos terminais ou outros fenômenos resultarem em uma dependência mais acentuada, a adoção desta equação deve ser reconsiderada - o que, de resto, pode ser feito sem que se modifique a forma do modelo proposto. Uma observação mais atenta aos dados de soluções aquosas de  $\text{NH}_4\text{PA}$  mostra que o  $\text{NH}_4\text{PA}$  5 e o  $\text{NH}_4\text{PA}$  20 possuem aproximadamente o mesmo grau de dissociação, enquanto o grau de dissociação do  $\text{NH}_4\text{PA}$  10 apresenta-se ligeiramente inferior. Além disso, os resultados experimentais para  $\text{NH}_4\text{PA}$  5 e  $\text{NH}_4\text{PA}$  20 mostram um comportamento diferente daqueles relativos ao  $\text{NH}_4\text{PA}$  10, de modo que se pode atribuir a inaptidão do modelo em descrever todos os dados de soluções de  $\text{NH}_4\text{PA}$  com um único conjunto de parâmetros não tanto a uma deficiência do modelo em si, mas a particularidades das amostras poliméricas investigadas (conforme já comentado). Apesar disso, como cada conjunto de parâmetros foi ajustado aos dados de cada polieletrólito, esses resultados mostram que a capacidade estritamente correlativa do modelo é alta.

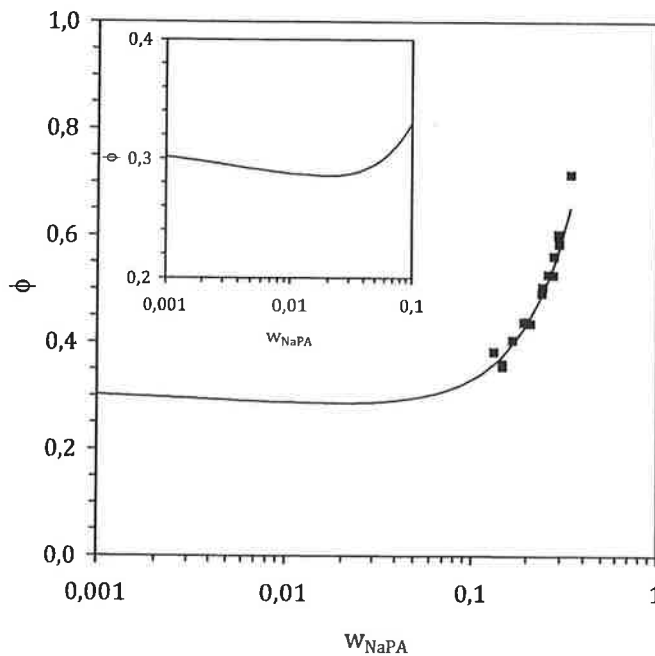


**Figura 6.2.** Coeficientes osmóticos de soluções de NaPA a 298,2 K. Dados experimentais [31]: ■, NaPA 5; ◇, NaPA 15. Modelagem: (\_\_\_\_).



**Figura 6.3.** Coeficientes osmóticos de soluções de NH<sub>4</sub>PA a 298,2 K. Dados experimentais [31]: ■, NH<sub>4</sub>PA 5; ◇, NH<sub>4</sub>PA 10; △, NH<sub>4</sub>PA 20. Modelagem: (\_\_\_\_), NH<sub>4</sub>PA 5; (.....), NH<sub>4</sub>PA 10; (- - - - -), NH<sub>4</sub>PA 20.

Estas figuras também revelam o problema que a extrapolação dos resultados para concentrações poliméricas baixas pode causar. Isso pode ser visto de maneira mais adequada quando uma escala logarítmica é usada, como apresentado na Figura 6.4 para o NaPA 5. Mesmo considerando que o padrão típico de uma solução aquosa de um polieletrólito é reproduzido pelo modelo, um exame mais detalhado dos resultados da correlação para soluções diluídas mostra que um ponto de mínimo na curva do coeficiente osmótico é previsto em concentrações baixas. Este ponto de mínimo é resultante das contribuições opostas das interações de curto e longo alcances – a contribuição de longo alcance leva a um decréscimo no coeficiente osmótico, como mostrado anteriormente. Não há uma confirmação experimental desse comportamento; em termos práticos, ele é perfeitamente negligenciável, pois a incerteza experimental nessa faixa de concentrações poliméricas é maior que o efeito em si. Entretanto, algumas simulações Monte Carlo mostram um padrão semelhante [19], o que está relacionado às contribuições eletrostática e de esferas rígidas ao coeficiente osmótico, e seu efeito oposto sobre esta propriedade.



**Figura 6.4.** Coeficientes osmóticos de soluções de NaPA 5 a 298,2 K. Dados experimentais [31], ■, e modelagem, (\_\_\_\_).

### 6.3.2. Soluções aquosas de um polieletrólito e um sal

O modelo foi também utilizado para a descrição de coeficientes osmóticos de soluções aquosas de polieletrólitos e cloreto de sódio; os resultados são apresentados na Tabela 6.3. Para evitar a introdução de parâmetros ternários, os parâmetros binários  $\bar{\lambda}_{\text{Na}^+, \text{Cl}^-}^{(0)}$  e  $\bar{\lambda}_{\text{Na}^+, \text{Cl}^-}^{(1)}$  foram ajustados a dados na mesma faixa de concentrações investigada; seus valores são  $\bar{\lambda}_{\text{Na}^+, \text{Cl}^-}^{(0)} = 0,0680 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  e  $\bar{\lambda}_{\text{Na}^+, \text{Cl}^-}^{(1)} = 0,1448 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Há dois parâmetros adicionais para as interações entre os grupos monoméricos da cadeia do polieletrólito  $p$  e do ânion cloreto,  $\bar{\lambda}_{p, \text{Cl}^-}^{(0)}$  e  $\bar{\lambda}_{p, \text{Cl}^-}^{(1)}$ . Os parâmetros de interação resultantes do ajuste e os valores da função objetivo  $OF_1$ , equação (6.17), são apresentados na Tabela 6.4.

**Tabela 6.3.** Conjuntos de dados de coeficiente osmótico para soluções de polieletrólito e NaCl a 298,2K [32]

Polieletrólito	Número de dados <sup>1</sup>
NaPA 5	12
NaPA 15	28
NaPMA 6	33
NaPMA 15	14
NH <sub>4</sub> PA 5	12
NH <sub>4</sub> PA 10	12
NH <sub>4</sub> PA 20	9
NaPSS 70	42
NaPES 2	9
NaPES 10	35

<sup>1)</sup> Esses valores correspondem somente aos dados para os quais as concentrações de polieletrólito e de sal não são nulas.

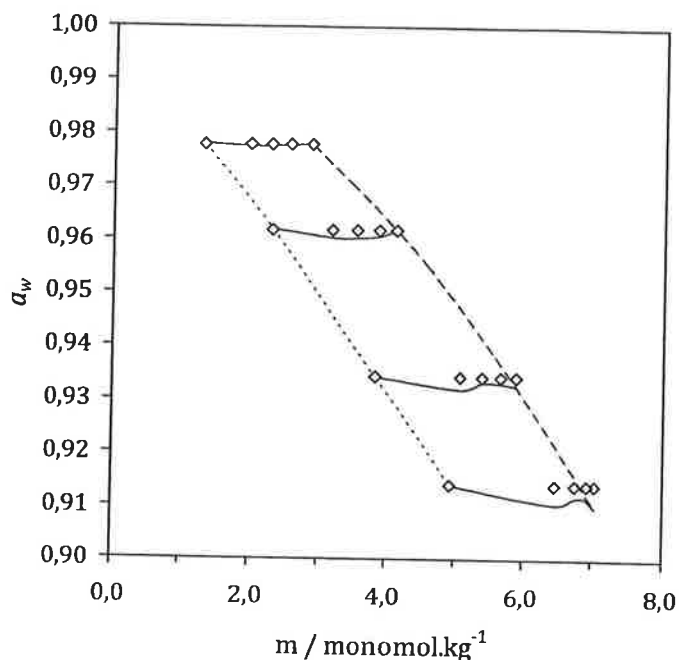
**Tabela 6.4.** Resultados para a correlação do coeficiente osmótico para soluções de polieletrólito e NaCl

Polieletrólito	$OF_1$	$\bar{\lambda}_{p,Cl^-}^{(0)} / \text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\bar{\lambda}_{p,Cl^-}^{(1)} / \text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$
NaPA	0,028	-0,0053	0,2175
NaPMA	0,017	0,0639	0,0088
NH <sub>4</sub> PA 5	0,008	0,0379	0,0862
NH <sub>4</sub> PA 10	0,012	0,0412	0,0507
NH <sub>4</sub> PA 20	0,013	0,0356	0,0228
NaPSS	0,007	0,0251	0,3551
NaPES 2	0,015	0,0546	-0,1166
NaPES 10	0,014	-0,1269	0,4626

Como se poderia esperar da seção anterior, para sistemas com NH<sub>4</sub>PA e NaPES o parâmetro de interação binária depende do tamanho da cadeia polimérica. Alguns resultados da correlação são apresentados na Figura 6.5. Para permitir a representação simultânea das concentrações de sal e polieletrólito, utilizou-se na abscissa desta figura a molalidade *total*, ou seja, a soma da molalidade de grupos monoméricos no polímero (ou mono-molalidade) e da molalidade do sal. Pela metodologia usada nas medidas experimentais (medidas isopiésticas) [32], um conjunto de dados com atividade de água constante compreende uma série de composições variando entre uma solução livre de sal e uma solução livre de polieletrólito. As diferenças entre os dados experimentais e a correlação são mais significativas em atividades de água menores (ou seja, em concentrações maiores de soluto). Não há uma maneira direta de determinar se este comportamento é resultado de uma deficiência do termo de longo ou de curto alcance do modelo. Em altas concentrações de polieletrólito, a presença de um sal de sódio (ou seja, um sal com o mesmo cátion como contra-íon) pode favorecer a condensação de contra-íons e, conseqüentemente, resultar em um grau de dissociação menor. Esse comportamento foi observado, por exemplo, em simulações moleculares da protonação de poliácidos em água salina [34]. Entretanto, o modelo não leva esse efeito em conta; fazê-lo requereria ao menos um parâmetro adicional, mas o grau de dissociação em soluções concentradas não pode ser diretamente determinado de dados de coeficiente osmótico (como mostrado anteriormente). A precisão relativamente limitada dos dados



experimentais para a atividade de água não permitiria o ajuste confiável de um parâmetro adicional.



**Figura 6.5.** Dados de atividade de água para soluções de NaPA 5 e NaCl a 298,2K.  $\diamond$ , dados experimentais [33]; (-----), modelagem de sistemas isentos de sal ( $W_{\text{NaCl}} = 0$ ); (.....), modelagem de sistemas isentos de polieletrólito ( $W_{\text{NaPA}} = 0$ ); (\_\_\_\_), modelagem das linhas de igual atividade de água.

### 6.3.3. Equilíbrio líquido-líquido

Os dados de equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos contendo um polieletrólito e polietileno glicol (PEG)<sup>3</sup> aos quais se aplicou o modelo proposto estão apresentados na Tabela 6.5. Todos os dados experimentais foram obtidos de uma publicação prévia [33], na qual são apresentados dados de equilíbrio para 19 diferentes sistemas com 4 PEG's de tamanhos diferentes. Como apresentado na Tabela 6.5, a massa molar (ponderada pela quantidade de matéria) desses PEG's varia entre 6,7 kg·mol<sup>-1</sup> e 103 kg·mol<sup>-1</sup>, e as amostras são praticamente monodispersas.

<sup>3</sup> A distinção introduzida entre PEG e PEO em Tabelas e Figuras é feita em respeito à fonte original dos dados [33]: oriundos de monômeros independentes, os dois polímeros são idênticos, reservando-se usualmente a denominação PEO para cadeias maiores (embora na literatura se encontrem distinções mais apropriadas). Para evitar uma repetição desnecessária, o texto faz menção somente ao PEG.

**Tabela 6.5.** Conjuntos de dados de equilíbrio líquido-líquido de polieletrólitos + PEG / PEO a 298.2 K [33].

Polieletrólito	PEG / PEO	Número de dados
NaPA 5	6	3
	34	3
	53	4
	103	3
NaPA 15	6	4
	34	4
	53	4
	103	2
NaPMA 6	6	4
	34	4
NaPMA 15	6	4
	34	4
NaPES 2	34	4
	53	2
	103	2
NaPES 10	6	3
	34	5
	53	4
	103	3

**Tabela 6.6.** Caracterização das amostras de PEG / PEO: massa molar ponderada pela quantidade de matéria ( $M_n$ ) e pela massa ( $M_w$ ) [33].

Polímero	$M_n / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$M_w / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$r_p$
PEG 6	6700	6950	152
PEG 34	34400	35700	781
PEO 53	52900	-	1201
PEO 103	103000	-	2338

Dentro do escopo do modelo desenvolvido, um polímero neutro é caracterizado pela natureza da unidade monomérica e pelo número de unidades na cadeia polimérica. O número de unidades é calculado também pela equação (6.30), considerando que a massa molar de uma unidade é  $M_U = 44,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Como o PEG é um polímero neutro, o parâmetro binário  $\bar{\lambda}_{PEG,PEG}^{(1)}$  foi considerado nulo. O parâmetro de interação binária  $\bar{\lambda}_{PEG,PEG}^{(0)}$  foi determinado a partir do ajuste de dados experimentais em soluções aquosas de vários PEG's [35], e é igual a  $8,909\cdot 10^{-3} \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; nesse ajuste, assumiu-se que este parâmetro binário não depende da massa molar do polímero. O termo relacionado à força iônica na equação osmótica virial foi também negligenciado para as interações entre o polieletrólito  $p$  e uma unidade monomérica do PEG ( $\bar{\lambda}_{p,PEG}^{(1)} = 0$ ). O parâmetro binário restante  $\bar{\lambda}_{p,PEG}^{(0)}$  foi ajustado aos dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido pela minimização da seguinte função-objetivo:

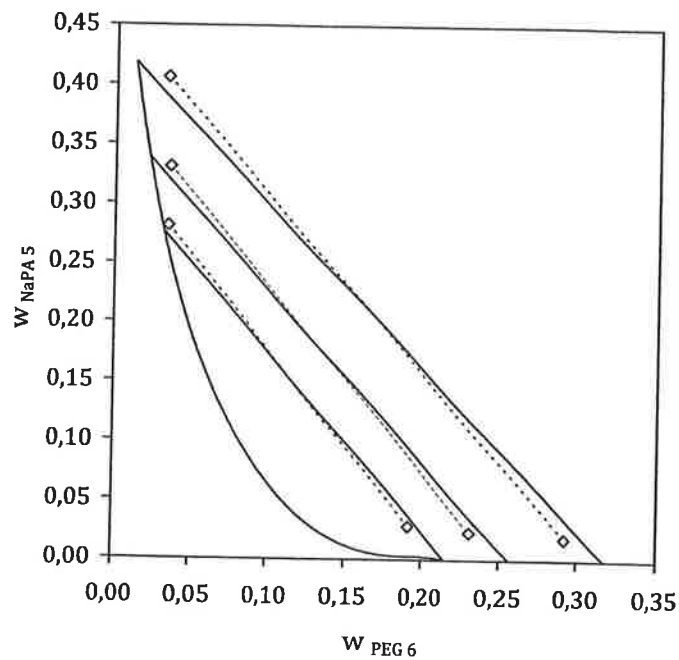
$$OF_2 = \sqrt{\frac{1}{4N} \sum_{j=1}^n \sum_{f=1}^2 \sum_{i=1}^2 (w_{i,f,j}^{calc} - w_{i,f,j}^{exp})^2} \quad (6.32)$$

em que  $w_{i,f,j}$  é a fração mássica do polímero  $i$  na fase  $f$  determinada no experimento número  $j$ , e a soma é conduzida considerando todos os polímeros e fases por todos os  $N$  pontos experimentais; como anteriormente, os sobrescritos *exp* e *calc* designam os resultados experimentais e calculados pelo modelo, respectivamente. As composições calculadas foram obtidas considerando a separação de fases líquidas de um sistema hipotético cuja composição global corresponderia àquela obtida pela adição de massas iguais das duas fases líquidas determinadas experimentalmente (ou seja, o ponto médio da linha de amarração experimental). Como anteriormente, assumiu-se que o parâmetro binário  $\bar{\lambda}_{p,PEG}^{(0)}$  não depende da massa molar dos polímeros. Os parâmetros de interação e os valores de  $OF_2$  obtidos são apresentados na Tabela 6.7. Observa-se que o modelo permite uma correlação adequada das composições em equilíbrio, o que pode ser visto nas Figuras 6.6 a 6.9, nas quais se apresentam os resultados para os sistemas NaPA 5 e PEG's. A correlação é muito boa para sistemas com PEG's de alta massa molar; nesses casos, a concentração do polieletrólito na fase rica em PEG é muito pequena, enquanto que a fase rica em polieletrólito contém uma concentração razoável (fração mássica de alguns centésimos) de PEG. Em sistemas com a menor cadeia de PEG (especificamente o PEG 6, conforme Figura 6.6) a fase rica em PEG contém ainda uma concentração

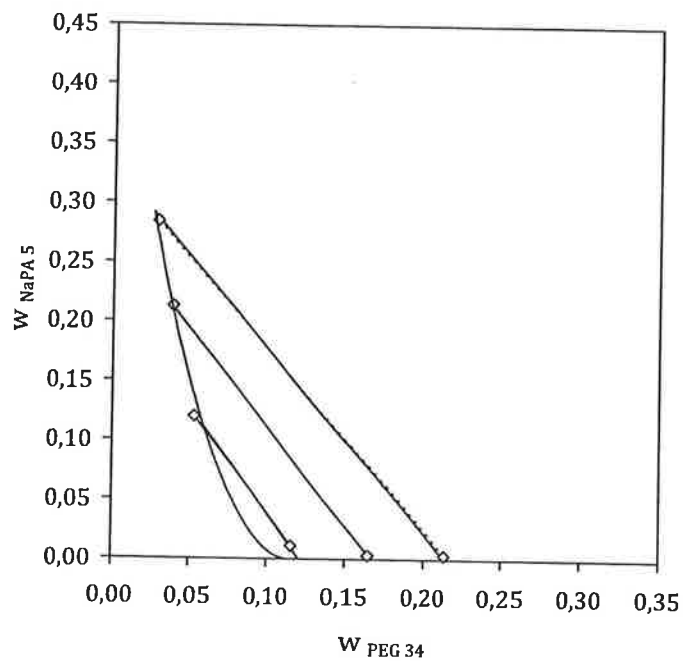
razoável (também alguns centésimos em fração mássica) do polieletrólito. A consideração de que o parâmetro binário  $\bar{\lambda}_{p,PEG}^{(0)}$  seja independente da massa molar não permite descrever todos os dados experimentais de maneira adequada: esta hipótese é tanto mais restritiva quanto menor for a massa molar do PEG. Entretanto, uma boa correlação dos dados experimentais para sistemas com PEG 6 pode ser obtida pelo ajuste simultâneo dos parâmetros  $\bar{\lambda}_{p,PEG}^{(0)}$  e  $\bar{\lambda}_{p,PEG}^{(1)}$  aos dados desses sistemas, como apresentado na Figura 6.10 - ainda que neste caso o modelo perca sua capacidade de prever a influência da massa molar dos polímeros no diagrama de fases.

**Tabela 6.7.** Resultados para a correlação do equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos contendo um polieletrólito e polietileno glicol.

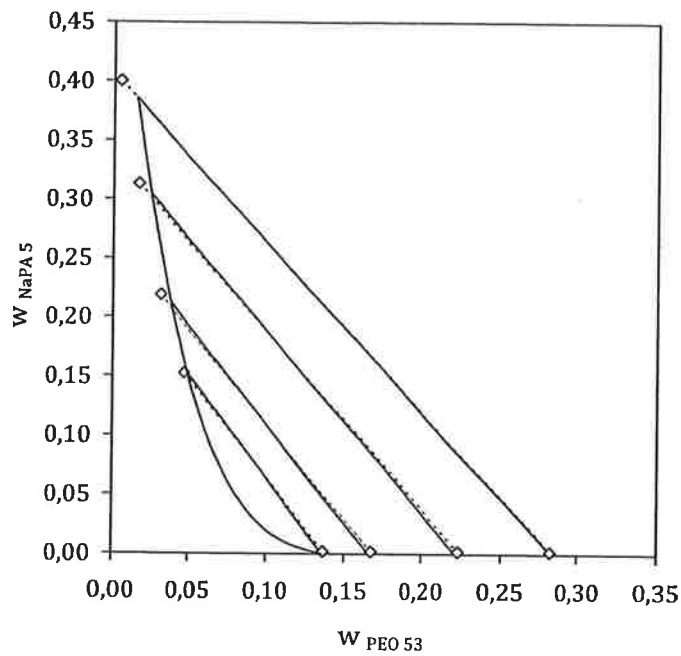
Polieletrólito	$OF_2$	$\bar{\lambda}_{PEG,p}^{(0)} / \text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$
NaPA	0,012	0,0490
NaPMA	0,013	0,0427
NaPES 2	0,016	0,0510
NaPES 10	0,008	0,0360



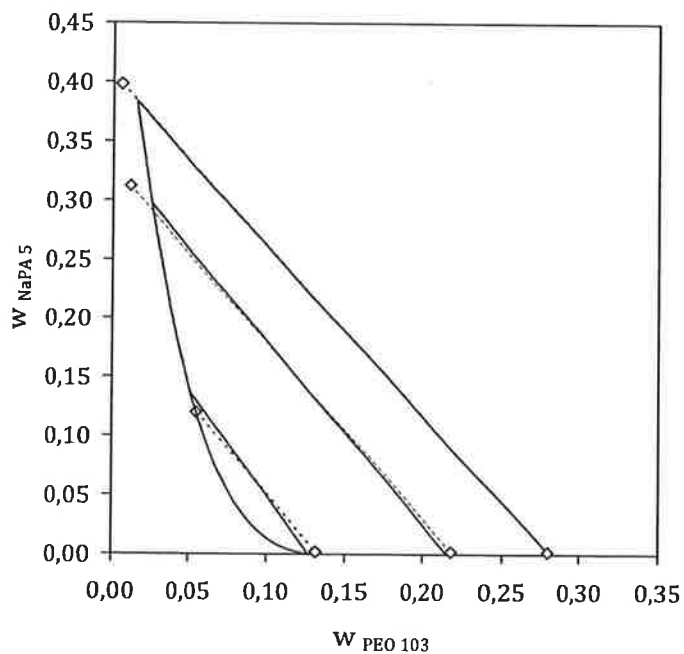
**Figura 6.6.** Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos contendo NaPA 5 e PEG 6 a 298,2 K.  $\diamond$ , composições experimentais de equilíbrio [33]; (-----), linhas de amarração experimentais; (\_\_\_\_), modelagem.



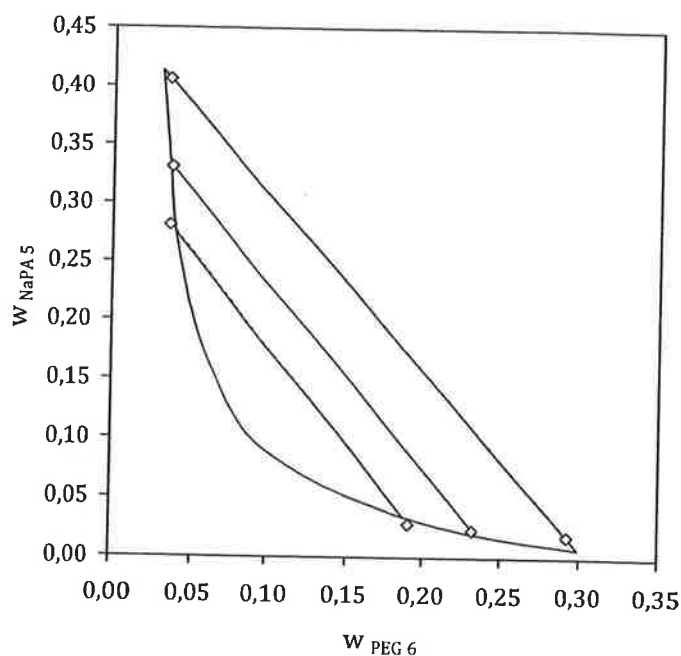
**Figura 6.7.** Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos contendo NaPA 5 e PEG 34 a 298,2 K.  $\diamond$ , composições experimentais de equilíbrio [33]; (-----), linhas de amarração experimentais; (\_\_\_\_), modelagem.



**Figura 6.8.** Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos contendo NaPA 5 e PEO 53 a 298,2 K. ◇, composições experimentais de equilíbrio [33]; (-----), linhas de amarração experimentais; (\_\_\_\_), modelagem.



**Figura 6.9.** Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos contendo NaPA 5 e PEO 103 a 298,2 K. ◇, composições experimentais de equilíbrio [33]; (-----), linhas de amarração experimentais; (\_\_\_\_), modelagem.



**Figura 6.10.** Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos contendo NaPA 5 e PEG 6 a 298,2 K. ◊, composições experimentais de equilíbrio [33]; (-----), linhas de amarração experimentais; (\_\_\_\_), modelagem (correlação com parâmetros livres).

Embora seja senso comum que um mesmo conjunto de parâmetros de um modelo de energia de Gibbs excedente raramente possa ser usado para descrição simultânea de equilíbrios líquido-vapor e líquido-líquido, pode-se observar que uma boa correlação foi conseguida para ambos os tipos de equilíbrio. Este fato está relacionado a dois efeitos: o modelo descreve muito bem a atividade de água de soluções de polímeros hidrofílicos, e a separação de fases líquidas é resultante das interações menos atrativas entre os dois polímeros (relacionadas ao parâmetro  $\bar{\lambda}_{p,PEG}^{(0)}$ ). Assim, o equilíbrio líquido-vapor em um sistema água + polímero é dominado por interações entre as moléculas poliméricas na fase aquosa, enquanto a separação de fases líquidas resulta predominantemente da interação entre os polímeros diferentes. Como os diferentes tipos de parâmetros foram ajustados a resultados experimentais dos distintos tipos de equilíbrio, a correlação final consegue descrevê-los adequadamente.

#### 6.4. Conclusões

O modelo de Pitzer foi estendido para a modelagem de soluções aquosas de polieletrólitos. Com a hipótese de que o grau de dissociação de um polieletrólito não depende de sua concentração na solução aquosa, e introduzindo uma modificação na expressão de força iônica, foi possível correlacionar adequadamente resultados experimentais para a atividade de água em soluções aquosas de polieletrólitos (na ausência ou na presença de um sal) e o equilíbrio líquido-líquido observado em sistemas contendo água, um polieletrólito e um polímero neutro. Embora o modelo negligencie alguns fenômenos que podem ocorrer em soluções de polieletrólitos (por exemplo, a eventual mudança no grau de dissociação causada pela adição de sais ou pela variação na concentração do polieletrólito, e o alongamento da cadeia polimérica causada pela presença de cargas de igual sinal), ele permite uma boa correlação do comportamento de fases dos sistemas investigados.

#### 6.5. Nomenclatura

##### Letras latinas

$a_w$	atividade de água
$A_\varphi$	parâmetro da equação de Debye-Hückel [0,3914 kg <sup>1/2</sup> ·mol <sup>-1/2</sup> a 298,2 K]
$b$	parâmetro da equação de Pitzer [1,2 kg <sup>1/2</sup> ·mol <sup>-1/2</sup> ]
$c$	composição
$G$	energia de Gibbs
$G^E$	energia de Gibbs excedente
$G^{E,LR}$	contribuição de longo alcance à energia de Gibbs excedente
$G^{E,SR}$	contribuição de curto alcance à energia de Gibbs excedente
$I$	força iônica [mol·kg <sup>-1</sup> ]
$m_i$	molalidade da espécie $i$ [mol·kg <sup>-1</sup> ]
$m_p$	molalidade do polieletrólito [mol·kg <sup>-1</sup> ]
$M_n$	massa molar ponderada pelo número de mols [kg·mol <sup>-1</sup> ]
$M_s^*$	massa molar do solvente [kg·mol <sup>-1</sup> ]
$M_u$	massa molar da unidade monomérica
$M_w$	massa molar ponderada pela massa
$M_w^*$	massa molar da água [0,018 kg·mol <sup>-1</sup> ]



$n_i$	quantidade da substância $i$ [mol]
$N$	número de dados experimentais
$p$	pressão
$R$	constante universal dos gases [8,314 J·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> ]
$r_p$	número de unidades monoméricas do polímero
$T$	temperatura [K]
$w_i$	fração mássica da espécie $i$
$Z_i$	carga pontual da espécie $i$

### Letras gregas

$\alpha$	parâmetro do modelo de Pitzer [2,0 kg <sup>1/2</sup> ·mol <sup>-1/2</sup> ]
$\varepsilon_p$	fração de unidades monoméricas dissociadas de um polieletrólito $p$
$\phi$	coeficiente osmótico
$\phi^{LR}$	contribuição de longo alcance ao coeficiente osmótico
$\phi^\infty$	valor limite do coeficiente osmótico em diluição infinita
$\gamma_i$	coeficiente de atividade da espécie $i$
$\gamma_i^{LR}$	contribuição de longo alcance ao coeficiente de atividade da espécie $i$
$\gamma_w^{LR}$	contribuição de longo alcance ao coeficiente de atividade da água
$\gamma_i^{SR}$	contribuição de curto alcance ao coeficiente de atividade da espécie $i$
$\gamma_w^{SR}$	contribuição de curto alcance ao coeficiente de atividade da água
$\lambda_{ij}(I)$	segundo coeficiente virial do modelo de Pitzer relacionado à interação entre espécies $i$ e $j$ [kg·mol <sup>-1</sup> ]
$\lambda_{ij}^{(0)}$	parâmetro de interação do modelo de Pitzer, equação (6.21) [kg·mol <sup>-1</sup> ]
$\lambda_{ij}^{(1)}$	parâmetro de interação do modelo de Pitzer, equação (6.21) [kg·mol <sup>-1</sup> ]
$\bar{\lambda}_{ij}^{(k)}$	parâmetro de interação entre grupos, equação (6.26) [kg·mol <sup>-1</sup> ]
$\lambda$	matriz de parâmetros de interação binária
$\Lambda_{ijk}$	terceiro coeficiente virial do modelo de Pitzer relacionado à interação entre espécies $i, j$ e $k$ [kg <sup>2</sup> ·mol <sup>-2</sup> ]
$\Lambda$	matriz de parâmetros de interação ternária
$\mu_i$	potencial químico do composto $i$

$v_p$	valor limite do número de unidades monoméricas dissociadas
$\sigma_i$	número de cargas pontuais da espécie $i$

**Subscritos**

$A$	ânions
$p$	polieletrólito
$s$	solvente
$C$	contra-íon
$w$	água
$Z$	cátion

**Sobrescritos**

$calc$	calculado
$exp$	experimental
$MI$	mistura ideal
$ref$	estado de referência

**Abreviações**

$OF_1$	função-objetivo definida pela equação (6.31)
$OF_2$	função-objetivo definida pela equação (6.32)
PEG	polietileno glicol

**6.6. Nota adicional**

Embora não seja evidente deste texto, a interpretação de dados de coeficiente osmótico de soluções de polieletrólitos (sem a adição de outros sais) é um tema não isento de controvérsia. A principal questão está na relação entre o coeficiente osmótico e o número de espécies em solução (do qual deriva a informação sobre o grau de condensação ou dissociação). Não é incomum que se considere válida a lei de Raoult para o solvente – o que equivale a considerar válida a equação (6.11) fora do limite  $m_p \rightarrow 0$ , estabelecendo-se a igualdade:

$$\phi = \frac{1 + v_p}{1 + r_p} \quad (6.33)$$

Quando se analisa a forma geral da curva de  $\phi$  (por exemplo, as Figuras 6.2 a 6.4),

observa-se que o valor de  $\phi$  aumenta com o aumento da concentração de polieletrólito; esse comportamento é comum a soluções de polieletrólitos sintéticos e naturais. Se este comportamento for considerado em conjunto com a equação (6.33), a conclusão direta seria de que o grau de dissociação *aumenta* com o aumento da concentração de polieletrólito. Antes de investigar a validade do modelo proposto, foi necessário demonstrar que essa análise não seria válida fora do limite  $m_p \rightarrow 0$ , o que foi feito introduzindo o termo de longo alcance na expressão do coeficiente osmótico, conforme a equação (6.29). Independentemente de qualquer consideração adicional, o uso do termo de Debye-Hückel, nesse caso, justificar-se-ia por serem os contra-íons livres tão somente íons em solução. A consideração de que a lei de Raoult não é válida em concentrações intermediárias de polieletrólitos é uma hipótese mais justificável do que a consideração de sua validade, por ser menos restritiva – até mesmo porque, caso o termo de longo alcance fosse negligenciável, os resultados assim o demonstrariam.

### 6.7. Referências

- [1] Katchalsky A, Lifson S, Mazur J, The electrostatic free energy of polyelectrolyte solutions. I. Randomly kinked macromolecules, *J. Polym. Sci.*, **11**, 409-423, 1953.
- [2] Lifson S, Katchalsky A, The electrostatic free energy of polyelectrolyte solutions. II. Fully stretched macromolecules, *J. Polym. Sci.*, **13**, 43-55, 1954.
- [3] Dolar D, Peterlin A, Rodlike model for a polyelectrolyte solution with mono- and divalent counterions, *J. Chem. Phys.*, **50**, 3011-3015, 1969.
- [4] Manning GS, The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides, *Quart. Rev. Biophysics*, **11**, 179-246, 1978.
- [5] Manning GS, Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. I. Colligative properties, *J. Chem. Phys.*, **51**, 924-933, 1969.
- [6] Manning GS, Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. VII. Mixtures of counterions, species selectivity and valence selectivity, *J. Phys. Chem.*, **88**, 6654-6661, 1984.
- [7] Stevens MJ, Kremer K, The nature of flexible linear polyelectrolytes in salt free solution: a molecular dynamics study, *J. Chem. Phys.*, **103**, 1669-1690, 1996.
- [8] Feng Z, Liu HL, Hu Y, Study on thermodynamic properties of polyelectrolyte solutions, *Acta Chim. Sinica*, **54**, 1076-1083, 1996.
- [9] Ospeck M, Fraden S, Solving the Poisson-Boltzmann equation to obtain interaction

- energies between confined, like-charged cylinders, *J. Chem. Phys.*, **109**, 9166-9171, 1998.
- [10] Dahnert K, Huster D, Comparison of the Poisson-Boltzmann model and the Donnan equilibrium of a polyelectrolyte in salt solution, *J. Colloid Interface Sci.*, **215**, 131-139, 1999.
- [11] Dahnert K, Huster D, Thermodynamics of the Laminar Donnan System, *J. Colloid Interface Sci.*, **228**, 226-237, 2000.
- [12] Rodenbeck M, Muller M, Huster D, Arnold K, Counterion condensation as saturation effect under the influence of ion hydration, *Biophys. Chem.*, **90**, 255-268, 2001.
- [13] Jiang JW, Liu HL, Hu Y, Prausnitz JM, A molecular-thermodynamic model for polyelectrolyte solutions, *J. Chem. Phys.*, **108**, 780-784, 1998.
- [14] Jiang JW, Liu HL, Hu Y, Polyelectrolyte solutions with stickiness between polyions and counterions, *J. Chem. Phys.*, **110**, 4952-4962, 1999.
- [15] Blaul J, Wittemann M, Ballauff M, Rehahn M, Osmotic coefficient of a synthetic rodlike polyelectrolyte in salt-free solution as a test of the Poisson-Boltzmann cell model, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 7077-7081, 2000.
- [16] Deserno M, Holm C, Blaul J, Ballauff M, Rehahn M, The osmotic coefficient of rod-like polyelectrolytes: Computer simulation, analytical theory, and experiment, *Eur. Phys. J. E*, **5**, 97-103, 2001.
- [17] Colby RH, Boris DC, Krause WE, Tan JS, Polyelectrolyte conductivity, *J. Polym. Sci. B*, **35**, 2951-2960, 1997.
- [18] Diehl A, Carmona HA, Levin Y, Counterion correlations and attraction between like-charged macromolecules, *Phys. Rev. E*, **64**, 011804, 2001.
- [19] Chang R, Yethiraj A, Osmotic pressure of salt-free polyelectrolyte solutions: a Monte Carlo simulation study, *Macromolecules*, **38**, 607-616, 2005.
- [20] Antypov D, Holm C, Osmotic coefficient calculations for dilute solutions of short stiff-chain polyelectrolytes, *Macromolecules*, **40**, 731-738, 2007.
- [21] Baeurle SA, Charlot M, Nogovitsin EA, Grand canonical investigations of prototypical polyelectrolyte models beyond the mean field level of approximation, *Phys. Rev. E*, **75**, 011804, 2007.
- [22] Nagvekar M, Danner RP, An excess free energy model for polyelectrolyte solutions, *Fluid Phase Equilibria*, **53**, 219-227, 1989.
- [23] Chen C-C, Evans LB, A local composition model for the excess Gibbs energy of aqueous electrolyte systems, *AIChE J.*, **32**, 444-454, 1986.

- [24] Khokhlov AR, Nyrkova IA, Compatibility enhancement and microdomain structuring in weakly charged polyelectrolyte mixtures, *Macromolecules*, **25**, 1493-1502, 1992.
- [25] Flory PJ, *Principles of Polymer Chemistry*, Ithaca: Cornell University Press, 1953.
- [26] Gottschalk M, Linse P, Piculell L, Phase stability of polyelectrolyte solutions as predicted from lattice mean-field theory, *Macromolecules*, **31**, 8407-8416, 1998.
- [27] Pitzer KS, Thermodynamics of electrolytes. I. Theoretical basis and general equations, *J. Phys. Chem.*, **77**, 268-277, 1973.
- [28] Pitzer KS, Mayorga G, Thermodynamics of electrolytes. II. Activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent, *J. Phys. Chem.*, **77**, 2300-2308, 1973.
- [29] Großmann C., Tintinger R, Zhu J, Maurer G, Aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and di-potassium hydrogen phosphate with and without partitioning biomolecules - Experimental results and modeling of thermodynamic properties, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **99**, 700-712, 1995.
- [30] Haraguchi LH, Mohamed RS, Loh W, Pessôa Filho, PA, Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymers and potassium phosphate, *Fluid Phase Equilibria*, **215**, 1-15, 2004.
- [31] Lammertz S, Pessôa Filho PA, Maurer G, Thermodynamics of aqueous solutions of polyelectrolytes: experimental results for the activity of water in aqueous solutions of some single synthetic polyelectrolytes, *J. Chem. Eng. Data*, **53**, 1564-1570, 2008.
- [32] Lammertz S, Pessôa Filho PA, Maurer G, Thermodynamics of aqueous solutions of polyelectrolytes: Experimental results for the activity of water in aqueous solutions of (a single synthetic polyelectrolyte and sodium chloride), *J. Chem. Eng. Data*, **53**, 1796-1802, 2008.
- [33] Grünfelder T, Pessôa Filho PA, Maurer G, Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems containing some synthetic polyelectrolytes and polyethylene glycol, *J. Chem. Eng. Data*, **54**, 198-207, 2009.
- [34] Crea F, Giacalone A, Gianguzza A, Piazzese D, Sammartano S, Modelling of natural and synthetic polyelectrolyte interactions in natural waters by using SIT, Pitzer and ion pairing approaches, *Mar. Chem.*, **99**, 93-105, 2006.
- [35] Hasse H, Kany H-P, Tintinger R, Maurer G, Osmotic virial coefficients of aqueous poly(ethylene glycol) from laser-light scattering and isopiestic measurements,

*Macromolecules*, **28**, 3540-3552, 1995.

## **7. Modelagem termodinâmica da solubilidade de proteínas em função do pH**

### **Resumo**

Neste capítulo apresenta-se o desenvolvimento de relações termodinâmicas entre a solubilidade de uma proteína e o pH da solução em que se encontra. As hipóteses subjacentes ao desenvolvimento são a validade da lei de Henry para a proteína em solução e o fato de que o equilíbrio sólido-líquido se estabelece somente com moléculas neutras. O desenvolvimento matemático resulta em uma expressão para a curva de solubilidade como função das constantes de equilíbrio de ionização, do pH e da solubilidade no ponto isoelétrico da proteína. Demonstra-se que os mesmos resultados podem ser obtidos tanto pelo cálculo direto da fração de moléculas neutras quanto pela integração da curva de solubilidade em função da carga média da proteína. A metodologia foi aplicada com sucesso na descrição das curvas de solubilidade de insulina (em três diferentes temperaturas) e  $\beta$ -lactoglobulina (em soluções de quatro diferentes forças iônicas).

### **7.1. Introdução**

A maioria dos protocolos de purificação de proteínas inclui ao menos uma etapa de precipitação ou cristalização. Estas operações unitárias envolvem a formação de uma fase sólida rica em proteína a partir de uma solução aquosa contendo essa proteína. Tal separação de fases é obtida por meio de mudanças nas propriedades desta solução aquosa – por exemplo, pH, força iônica, temperatura e concentração de co-solventes. Embora a cinética tenha um papel relevante na distinção entre precipitação e cristalização, em ambos os casos estabelece-se um equilíbrio de fases entre a fase sólida rica em proteína e a solução a partir da qual é formada.

A dificuldade no desenvolvimento de modelos para este equilíbrio sólido-líquido advém fundamentalmente da complexidade inerente à modelagem de soluções protéicas – embora a natureza do precipitado formado também seja objeto de investigações [1,2]. Tal complexidade, por sua vez, é devida ao número de fatores que podem afetar o comportamento de proteínas em solução, o que se reflete na multiplicidade de abordagens propostas para sua descrição.

Alguns dos modelos propostos para o estudo de soluções protéicas são baseados no formalismo de McMillan & Mayer, e compreendem uma equação de estado para a pressão osmótica, que pode ser tanto uma expansão virial [3] quanto uma equação baseada na teoria da perturbação [4]. Estas equações ajudam a elucidar o papel dos diversos fatores que afetam o comportamento de fases de proteínas e têm base físico-química consistente, mas não podem ser diretamente utilizadas (ao menos não em sua estrutura atual) para a predição da curva de solubilidade em condições práticas de engenharia. Deve-se lembrar que os próprios fundamentos deste tipo de abordagem ainda são objeto de pesquisa intensa [5,6].

Por outro lado, modelos baseados no formalismo de Lewis & Randall podem ter uma base teórica mais tênue, mas oferecem a vantagem de serem mais facilmente utilizáveis. Nesse caso, modificações de modelos de energia de Gibbs excedente, como a equação UNIQUAC, são utilizadas na correlação de curvas de solubilidade [7] ou de dados de coeficiente de atividade [8]. Parâmetros destes modelos podem ser mais diretamente relacionados a condições experimentais – por exemplo, aos resultados de experimentos de precipitação [7].

Uma questão específica que precisa ser levada em consideração na modelagem do equilíbrio sólido-líquido de proteínas é o fato de a carga das moléculas protéicas ser dependente do pH da solução. A solubilidade de uma proteína teoricamente é mínima em seu ponto isoelétrico (pI), ou seja, no pH em que a carga média das moléculas protéicas é nula. Este fato é o fundamento da chamada precipitação isoelétrica, na qual a formação da fase sólida é induzida alterando-se o pH da solução para valores próximos ao pI da proteína que se quer precipitar.

A relação entre a solubilidade de proteínas e o pH das soluções que as contêm tem sido objeto de pesquisas desde a primeira metade do século passado. Já em 1931, Green [9] desenvolveu um modelo baseado na hipótese de que a hemoglobina em solução se comportasse como um eletrólito divalente (uma base ou um ácido). Quase uma década depois, Grönwall [10] retomou um trabalho anterior de Linderstrøm-Lang [11] e desenvolveu uma formulação simples – mas notável – para o problema, relacionando a curva de solubilidade de uma proteína a seu perfil de cargas.

Mais recentemente, Pinho et al. [12], Khoshkbarchi e Vera [13] e Tseng et al. [14] investigaram a modelagem da solubilidade de aminoácidos. Em termos gerais, estes autores levaram em conta o estado de ionização (devido aos grupos terminais



ionizáveis) e a não-idealidade da fase líquida por meio de modelos de energia de Gibbs excedente. Pinho et al. [12] aplicaram o modelo UNIFAC em conjunto com um termo de Debye-Hückel na predição da curva de solubilidade (em função do pH) dos aminoácidos glicina, D-alanina, L-serina e DL-valina. Khoshkbarchi e Vera [13] desenvolveram um modelo simplificado de perturbação (com referência de esferas rígidas) para o cálculo do coeficiente de atividade de aminoácidos e peptídeos, estudando o efeito do pH na solubilidade da glicina. Baseando-se em Pradhan e Vera [15], Tseng et al. [14] aplicaram o modelo NRTL para a modelagem de soluções de aminoácidos, obtendo boa concordância com os dados experimentais. Seyfi et al. [16] aplicaram o modelo SAFT para a predição da curva de solubilidade de DL-metionina em função do pH em três temperaturas diferentes. Finalmente, Tjong e Zhou [17] realizaram simulações de dinâmica molecular para gerar a curva de solubilidade de insulina suína e ribonuclease, por meio do cálculo de energia de transferência.

Neste trabalho apresenta-se uma metodologia para o cálculo da curva de solubilidade de proteínas em função do pH nas proximidades do ponto isoelétrico. A metodologia desenvolvida é baseada no cálculo da fração de moléculas protéicas neutras, que é realizado por meio da aplicação da equação de Henderson-Hasselbalch a todos os grupos ionizáveis da proteína. Uma expressão analítica obtida estendendo-se a abordagem de Linderstrøm-Lang [11] e Grönwall [10] também foi desenvolvida, e uma demonstração matemática da equivalência entre os resultados de ambas é apresentada. Tanto quanto se pôde verificar, esta é a primeira descrição analítica da solubilidade de uma proteína em função do pH e de sua estrutura primária.

## 7.2. Fundamentação teórica

Considerando que a fase sólida é única e formada apenas por moléculas protéicas, e negligenciando a influência da pressão sobre o potencial químico, a condição de equilíbrio sólido-líquido pode ser escrita como:

$$\mu_p^L(T, \mathbf{x}) = \mu_p^S(T) \quad (7.1)$$

em que  $\mathbf{x}$  denota a composição da fase líquida. Conforme esta equação, mantida constante a temperatura, o potencial químico da proteína em solução deve permanecer constante, uma vez que o potencial químico da fase sólida não é afetado por mudanças de condições na fase líquida.

Nas concentrações comumente encontradas em processos de purificação de bioprodutos, proteínas estão suficientemente diluídas para que se possa considerar que a lei de Henry é válida. Neste caso:

$$\mu_p^L(T, \mathbf{x}) = \mu_p^{ref}(T, \mathbf{x}^{ref}) + RT \ln x_p \quad (7.2)$$

em que o estado de referência é o componente em uma solução ideal de concentração unitária – também conhecido como estado de referência de diluição infinita.

O efeito do pH nas propriedades de proteínas em solução (e conseqüentemente em sua solubilidade) advém do fato de que a carga das moléculas protéicas depende do pH da solução em que se encontram. Este fato poderia ser levado em conta, na equação anterior, de duas maneiras. Em uma primeira abordagem, pode-se considerar que todas as moléculas de proteína tenham a mesma carga elétrica – um valor médio. Neste caso, o estado de referência (que se refere a um estado específico da molécula em uma determinada solução) e a concentração de equilíbrio alterar-se-iam, de maneira a satisfazer a igualdade das equações (7.1) e (7.2). Embora curvas de titulação experimentais apresentem a carga média da proteína em função do pH, tal abordagem, se aplicada ao cálculo do equilíbrio sólido-líquido, traria um problema: uma molécula protéica não pode ter uma carga líquida fracionária.

Uma segunda abordagem consideraria que uma proteína em solução na realidade é uma mistura de moléculas protéicas com distintas cargas (discretas), e que para cada estado de ionização uma equação similar à equação (7.2) seria válida. Alterando-se o pH da solução, a fração de moléculas protéicas em cada um dos estados de ionização mudaria, e esta mudança resultaria em uma variação na solubilidade. Assim, para estabelecer a relação entre pH e solubilidade, seria necessário conhecer não a carga média das moléculas protéicas, mas qual fração de moléculas protéicas possui cada valor de carga líquida.

### 7.2.1. Distribuição de cargas

Um princípio fundamental (embora muitas vezes negligenciado) aplicável ao cálculo do equilíbrio sólido-líquido é a condição de eletro-neutralidade: qualquer fase em equilíbrio deve ser eletricamente neutra. Esta condição traz pouca informação sobre a fase líquida em si (pois pode haver muitas espécies com diferentes cargas em solução), mas estabelece uma condição essencial para a fase sólida: se ela é formada por um único tipo de molécula, esta molécula deve ser eletricamente neutra.

Feita esta restrição, observa-se que a equação (7.1) não deve ser satisfeita por todas as moléculas protéicas em fase líquida, mas apenas por aquelas com carga líquida nula. Como consequência da equação (7.2), a concentração de moléculas neutras deve permanecer constante em virtude da condição de equilíbrio, mesmo que o pH varie (considerando-se que a mudança de pH, mesmo sendo efetivamente uma alteração na concentração de íons  $H^+$  e  $OH^-$ , não altere o potencial químico de referência em virtude da correspondente alteração na composição do solvente). Entretanto, ao variar o pH, a fração de moléculas protéicas com carga líquida nula varia, o que faz com que a concentração total de proteína em equilíbrio mude, de modo que a concentração de moléculas neutras permaneça constante.

A concentração de moléculas neutras pode ser obtida pelo produto da solubilidade (concentração total de proteína em solução, independentemente da carga de suas moléculas) pela fração de moléculas neutras. Assim, a condição de equilíbrio sólido-líquido torna-se:

$$x_0 = \phi_0(pH) \cdot S(pH) = \text{constante} \quad (7.3)$$

em que  $x_0$  é a concentração (fração numérica) de moléculas protéicas neutras em fase líquida,  $\phi_0$  é a fração de moléculas protéicas neutras, e  $S$  é a solubilidade. A curva de solubilidade pode ser descrita pela seguinte equação:

$$S(pH) = \frac{\phi_0(pI) \cdot S(pI)}{\phi_0(pH)} \quad (7.4)$$

em que o ponto isoelétrico é tomado como referência para o uso da equação (7.3).

Para calcular a fração de moléculas neutras, é necessário considerar que todos os resíduos *efetivamente* ionizáveis e todos os grupos amina ou ácido carboxílico terminais estabelecem um equilíbrio químico com o íon  $H^+$ : para certo valor de pH, cada um desses grupos pode ou não estar eletricamente carregado. Se a proteína tem  $n$  grupos ionizáveis – em que  $n$  inclui os resíduos ionizáveis e os grupos terminais – o número de estados de ionização possíveis é:

$$\psi = 2^n \quad (7.5)$$

Apenas algumas dessas configurações corresponderão a moléculas neutras. Seja  $k$  uma determinada configuração entre os  $\psi$  estados possíveis – em que o termo *configuração* é usado para identificar certo estado de ionização da proteína, ou seja, um

estado específico de cada grupo ionizável. Seja  $\varepsilon[j,k]$  a carga do grupo  $j$  na configuração  $k$ . Este valor pode ser +1 ou 0 para grupos alcalinos, que se ionizam conforme a reação:



e -1 ou 0 para grupos ácidos, que se ionizam conforme a reação:



A carga líquida  $c$  de uma molécula protéica na configuração  $k$  é dada por:

$$c[k] = \sum_{j=1}^n \varepsilon[j,k] \quad (7.8)$$

Uma aproximação usual no cálculo de cargas protéicas é a consideração de que o estado de ionização de um grupo não altera o equilíbrio dos outros grupos ionizáveis na mesma molécula. Considerando-se que a equação de Henderson-Hasselbalch seja válida para cada grupo, a fração ( $\alpha_j$ ) de moléculas protéicas que tem o grupo  $j$  ionizado pode ser calculada por meio de:

$$\text{pH} = \text{p}K_{Aj} - v_j \log\left(\frac{\alpha_j}{1 - \alpha_j}\right) \quad (7.9)$$

em que  $\text{p}K_{Aj}$  é o co-logaritmo decimal da constante de ionização do grupo  $j$  – conforme as equações (7.6) e (7.7) – e  $v_j$  é o estado carregado do grupo  $j$  ( $v_j$  é igual a -1 para grupos ácidos e +1 para grupos alcalinos).

A fração de moléculas em certa configuração  $k$  é igual a:

$$\phi[k] = \prod_{j=1}^n \alpha'_j \quad (7.10)$$

em que:

$$\alpha'_j = \begin{cases} \alpha_j & \text{se } \varepsilon[j,k] \neq 0 \\ 1 - \alpha_j & \text{se } \varepsilon[j,k] = 0 \end{cases} \quad (7.11)$$

da qual resulta:

$$\phi[k] = \prod_{j=1}^n \left( (1 - \alpha_j)(1 - v_j \varepsilon[j,k]) + \alpha_j v_j \varepsilon[j,k] \right) \quad (7.12)$$

A fração de moléculas em uma dada configuração com carga total nula pode ser deduzida desta última equação, sendo dada por:

$$\phi[k] = \prod_{j=1}^n \left( \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{Aj}}} \left( \left( \frac{1 + v_j}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right) 10^{\text{pH} - \text{p}K_{Aj}} - \left( \frac{v_j - 1}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right) \right) \right) \quad (7.13)$$

em conjunto com a restrição:

$$\sum_{j=1}^n \varepsilon[j,k] = 0 \quad (7.14)$$

A fração de moléculas em certa configuração neutra  $k$  é proporcional à fração de moléculas em outra configuração neutra  $m$ ,  $m \neq k$ , e esta proporção não depende do pH. Assim, é irrelevante qual configuração específica seja escolhida para o cálculo da curva de solubilidade por meio da equação (7.4), desde que a equação (7.14) seja satisfeita. Acoplando-se as equações (7.4) e (7.13), a solubilidade em certo valor de pH pode ser relacionada à solubilidade no ponto isoelétrico por meio de:

$$\frac{S(pH)}{S(pI)} = \prod_{j=1}^n \left( \frac{1 + 10^{pH-pK_{Aj}} \left( \left( \frac{1+v_j}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right) 10^{pI-pK_{Aj}} - \left( \frac{v_j-1}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right) \right)}{1 + 10^{pI-pK_{Aj}} \left( \left( \frac{1+v_j}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right) 10^{pH-pK_{Aj}} - \left( \frac{v_j-1}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right) \right)} \right) \quad (7.15)$$

para qualquer configuração  $k$  que respeite a equação (7.14).

### 7.2.2. Extensão da abordagem de Liderstrøm-Lang e Grönwall

Uma segunda abordagem para o cálculo da curva de solubilidade foi introduzida por Grönwall [10], cujo trabalho foi baseado em uma metodologia devida a Liderstrøm-Lang [11]. Grönwall [10] foi o primeiro a afirmar que o equilíbrio sólido-líquido estabelece-se com as moléculas protéicas neutras em solução e que, ao mudar-se o pH, a atividade das moléculas neutras não se altera (diversamente da atividade das moléculas eletricamente carregadas). Embora seu raciocínio seja fundamentado em base termodinâmica consistente, o fato de a estrutura protéica não ser conhecida em detalhe na época impediu desenvolvimentos ulteriores da abordagem. Uma extensão da metodologia, que inclui a contribuição de cada grupo ionizável no perfil de carga, será aqui apresentada.

Seguindo o raciocínio de Liderstrøm-Lang e Grönwall, pode-se relacionar a atividade de uma dada molécula protéica com configuração  $k$  e carga  $c$  à atividade da configuração neutra correspondente àquela encontrada em fase sólida (identificada pelo subscrito  $0$ ) considerando-se a reação:



cuja relação de equilíbrio pode ser escrita:

$$K_k = \frac{a_{P_k}}{a_{P_0} a_{H^+}^c} \quad (7.17)$$

A atividade da molécula protéica com configuração  $k$  é dada pelo produto entre seu coeficiente de atividade e sua concentração na fase líquida. Assim, a concentração (em fração numérica) desta configuração é dada por:

$$x_k = K_k \frac{a_{P_0} a_{H^+}^c}{\gamma_k} \quad (7.18)$$

A solubilidade da proteína é dada pela soma das concentrações de todas as configurações:

$$S = \sum_{k=1}^{\Psi} x_k = a_{P_0} \sum_{k=1}^{\Psi} K_k \frac{a_{H^+}^c}{\gamma_k} \quad (7.19)$$

Derivando-se esta expressão com respeito à atividade do íon  $H^+$ , e considerando que a atividade da proteína na configuração neutra é constante:

$$\frac{dS}{da_{H^+}} = a_{P_0} \sum_{k=1}^{\Psi} c a_{H^+}^{c-1} \frac{K_k}{\gamma_k} - a_{P_0} \sum_{k=1}^{\Psi} a_{H^+}^c \frac{K_k}{\gamma_k^2} \frac{d\gamma_k}{da_{H^+}} \quad (7.20)$$

O segundo termo do lado direito da equação pode ser simplificado por meio de:

$$a_{P_0} \sum_{k=1}^{\Psi} a_{H^+}^c \frac{K_k}{\gamma_k^2} \frac{d\gamma_k}{da_{H^+}} = a_{P_0} \sum_{k=1}^{\Psi} a_{H^+}^c \frac{K_k}{\gamma_k} \frac{d \ln \gamma_k}{da_{H^+}} = \sum_{k=1}^{\Psi} x_k \frac{d \ln \gamma_k}{da_{H^+}} \quad (7.21)$$

sendo, deste modo, nulo, em virtude da equação de Gibbs-Duhem (considerando que os coeficientes de atividade da água e do íon  $H^+$  não se alteram). Assim:

$$\frac{d \ln S}{d \ln a_{H^+}} = \left( \frac{a_{H^+}}{S} \right) \frac{dS}{da_{H^+}} = \frac{\sum_{k=1}^{\Psi} c a_{H^+}^c a_{P_0} \frac{K_k}{\gamma_k}}{\sum_{k=1}^{\Psi} a_{H^+}^c a_{P_0} \frac{K_k}{\gamma_k}} = \frac{\sum_{k=1}^{\Psi} c x_k}{\sum_{k=1}^{\Psi} x_k} = \bar{c} \quad (7.22)$$

em que  $\bar{c}$  é a carga média no pH da solução – também chamada de *valência média* por Linderstrøm-Lang [11]. Escrevendo em termos do pH da solução, obtém-se:

$$\frac{d \log S}{dpH} = -\bar{c} \quad (7.23)$$

Esta equação foi primeiramente obtida por Grönwall [10] e relaciona a curva de solubilidade ao perfil de cargas como função do pH. Embora ela pareça ser independente da lei de Henry, a hipótese de que seja constante o coeficiente de atividade tanto da água quanto do íon  $H^+$  de algum modo restringe sua validade à mesma faixa de concentrações em que seria válida a lei de Henry – na verdade, seria mais simples considerar, já na equação (7.17), a validade da lei de Henry. Estender-se-á esta equação para levar em conta a contribuição de cada grupo ionizável na molécula protéica.

A carga média em um determinado pH é dada por:

$$\bar{c} = \sum_{j=1}^n v_j \alpha_j \quad (7.24)$$

Considerando-se válida a equação de Henderson-Hasselbalch, obtém-se:

$$\bar{c} = \sum_{j=1}^n \left( \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_{A_j}}} \right) (1 + v_j - (1 - v_j) \cdot 10^{pH - pK_{A_j}}) \quad (7.25)$$

Assim, das equações (7.23) e (7.25), segue-se:

$$\frac{d \log S}{dpH} = - \sum_{j=1}^n \left( \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_{A_j}}} \right) (1 + v_j - (1 - v_j) \cdot 10^{pH - pK_{A_j}}) \quad (7.26)$$

Esta equação pode ser integrada de um pH de referência ao pH da solução; considerando-se o pI da proteína como pH de referência:

$$\int_{\log S(pI)}^{\log S(pH)} d \log S = - \int_{pI}^{pH} \sum_{j=1}^n \left( \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_{A_j}}} \right) (1 + v_j - (1 - v_j) \cdot 10^{pH - pK_{A_j}}) \cdot dpH \quad (7.27)$$

que resulta em:

$$\log \frac{S(pH)}{S(pI)} = \sum_{j=1}^n \left( \log \left( \frac{1 + 10^{pH - pK_{A_j}}}{1 + 10^{pI - pK_{A_j}}} \right) - \frac{(1 + v_j)}{2} (pH - pI) \right) \quad (7.28)$$

ou, simplesmente:

$$\log \frac{S(pH)}{S(pI)} = n_+ (pI - pH) + \sum_{j=1}^n \left( \log \left( \frac{1 + 10^{pH - pK_{A_j}}}{1 + 10^{pI - pK_{A_j}}} \right) \right) \quad (7.29)$$

em que  $n_+$  é o número de grupos ionizáveis positivamente.

### 7.2.3. Equivalência entre as abordagens

A forma final da abordagem desenvolvida a partir da condição de eletro-neutralidade é dada pela equação (7.15), e a forma final da extensão da abordagem de Linderstrøm-Lang e Grönwall é dada pela equação (7.29). Uma vez que ambas derivam de hipóteses análogas, elas devem fornecer os mesmos resultados. Assim, demonstrar-se-á que a equação (7.15), quando aplicada a uma configuração que respeite a equação (7.14), fornece os mesmos resultados que a equação (7.29).

Extraindo o logaritmo de ambos os lados da equação (7.15), obtém-se:

$$\log \frac{S(pH)}{S(pI)} = \sum_{j=1}^n \log \left( \frac{1 + 10^{pH-pK_{Aj}}}{1 + 10^{pI-pK_{Aj}}} \right) + \sum_{j=1}^n \log \left( \frac{\left( \frac{1+v_j}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right) 10^{pI-pK_{Aj}} - \left( \frac{v_j-1}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right)}{\left( \frac{1+v_j}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right) 10^{pH-pK_{Aj}} - \left( \frac{v_j-1}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right)} \right) \quad (7.30)$$

Para simplificar a análise, definem-se as seguintes funções:

$$\eta[j] = \log \left( \frac{1 + 10^{pH-pK_{Aj}}}{1 + 10^{pI-pK_{Aj}}} \right) \quad (7.31)$$

$$\theta[j,k] = \log \left( \frac{\left( \frac{1+v_j}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right) 10^{pI-pK_{Aj}} - \left( \frac{v_j-1}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right)}{\left( \frac{1+v_j}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right) 10^{pH-pK_{Aj}} - \left( \frac{v_j-1}{2} - v_j |\varepsilon[j,k]| \right)} \right) \quad (7.32)$$

Obviamente, tanto  $\eta$  quanto  $\theta$  são funções do pH. Entretanto, enquanto  $\eta$  não depende de qual configuração  $k$  está sendo considerada, nem de qual o estado de ionização,  $\theta$  é função de ambos. Assim, seu valor deve ser examinado para cada situação específica: os resultados dessa análise são apresentados na Tabela 7.1, a partir da qual se pode escrever:

$$\log \frac{S(pH)}{S(pI)} = (n_A + n_D)(pI - pH) + \sum_{j=1}^n \eta[j] \quad (7.33)$$

**Tabela 7.1.** Análise da função  $\theta[j,k]$

$v_j$	$\varepsilon[j,k]$	$\theta[j,k]$	Número de grupos
-1	-1	$pI-pH$	$n_A$
-1	0	0	$n_B$
+1	+1	0	$n_C$
+1	0	$pI-pH$	$n_D$

Esta equação é válida desde que a configuração escolhida seja neutra, de modo que a seguinte restrição deve ser verificada:

$$\sum_{j=1}^n \varepsilon[j,k] = 0 \Rightarrow n_A = n_C \quad (7.34)$$



que resulta em:

$$\log \frac{S(pH)}{S(pI)} = (n_c + n_b)(pI - pH) + \sum_{j=1}^n \eta[j] \quad (7.35)$$

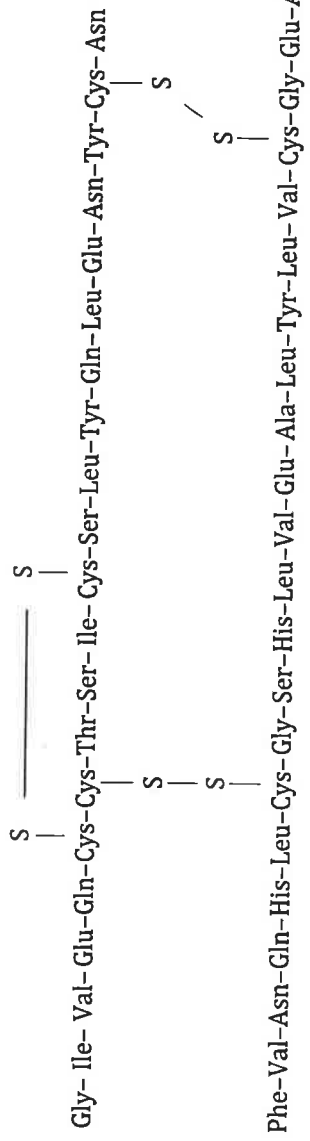
A soma  $n_c + n_b$  é simplesmente o número total de grupos ionizáveis positivamente ( $n_+$ ), o que torna essa equação idêntica à equação (7.29). Assim, embora partindo de formulações ligeiramente diferentes, o resultado para ambas as metodologias é exatamente o mesmo.

### 7.3. Resultados e discussão

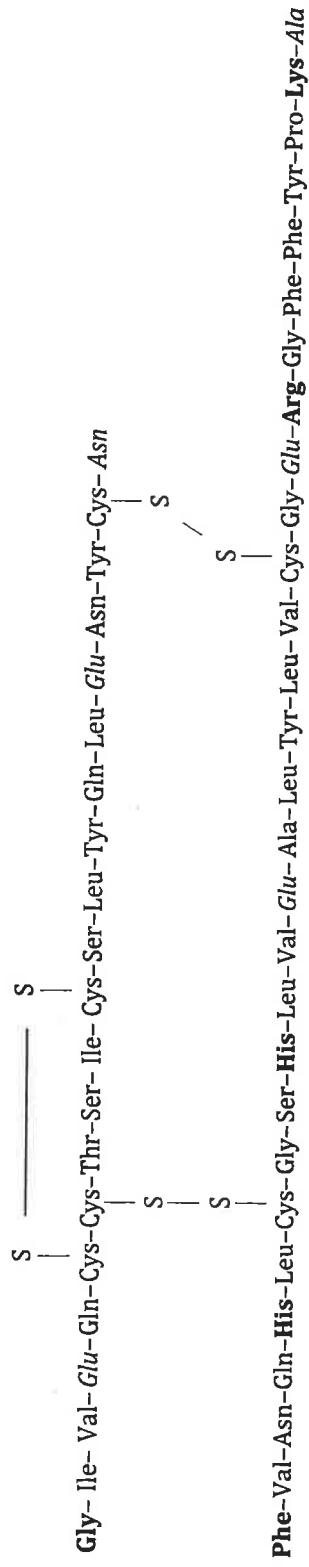
Conjuntos de dados de solubilidade de proteínas puras como função do pH são relativamente pouco freqüentes na literatura aberta, e a determinação conjunta de curvas de titulação e de solubilidade da mesma proteína nas mesmas condições é virtualmente inexistente. A metodologia proposta foi aplicada a dois conjuntos de dados experimentais de solubilidade: os dados de insulina suína em solução de  $\text{NaHCO}_3$  obtidos com  $\text{CO}_2$  pressurizado de Tashima et al. [18] (correspondente ao Capítulo 5 desta tese) e os dados de solubilidade de  $\beta$ -lactoglobulina em soluções de  $\text{NaCl}$  de Grönwall [10]. Para a insulina suína, está disponível a curva de titulação em cloreto de guanidínio [19], com os valores correspondentes de  $\text{pK}_A$  dos grupos ionizáveis na cadeia protéica [20]; para a  $\beta$ -lactoglobulina, a curva de titulação aproximada é conhecida [10].

Considerar-se-á a insulina suína em detalhe para melhor entendimento da aplicação da metodologia. Sua estrutura primária é apresentada na Figura 7.1A [21]. Esta molécula tem 12 resíduos ionizáveis e 4 grupos terminais ionizáveis; na Tabela 7.2 se apresentam os valores de  $\text{pK}_A$  dos aminoácidos isolados e aqueles obtidos a partir da curva de titulação.

**A**



**B**



**Figura 7.1.** Estrutura primária da insulina suína. A: seqüência de aminoácidos e pontes dissulfeto. B: distribuição de cargas da configuração neutra mais comum (em itálico, grupos carregados negativamente, em negrito, grupos carregados positivamente).

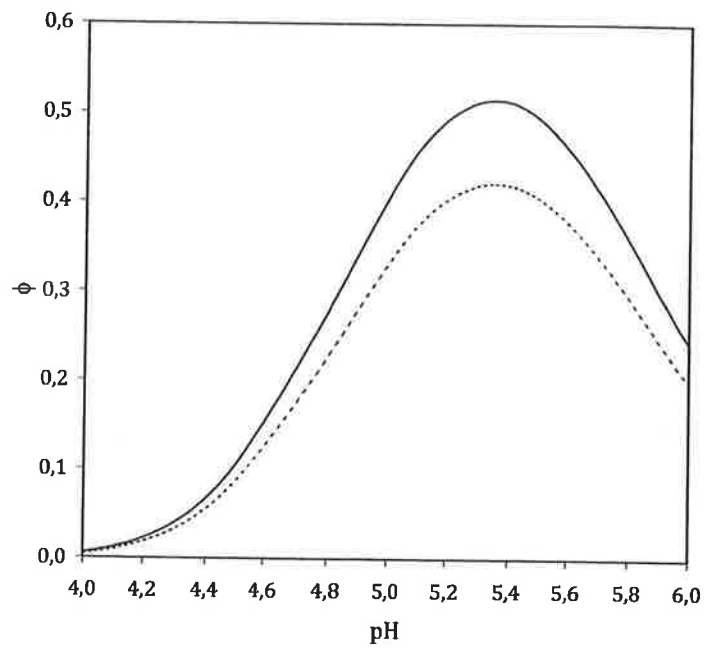
**Tabela 7.2.** Valores de pK<sub>A</sub> dos grupos ionizáveis da insulina suína

Aminoácido	Grupo	Número	pK <sub>A</sub> (isolado) <sup>a</sup>	pK <sub>A</sub> (cadeia) <sup>b</sup>
Gly	-NH <sub>2</sub> (terminal)	1	9,80	7,38
Glu	γ-COOH	4	4,30	4,37
Tyr	Fenol-OH	4	10,90	10,20
Asn	-COOH (terminal)	1	2,00	3,45
Phe	-NH <sub>2</sub> (terminal)	1	9,10	7,38
His	Imidazólio-NH <sub>2</sub>	2	6,00	5,98
Arg	Guanidínio-NH <sub>2</sub>	1	12,50	11,10
Lys	ε-NH <sub>2</sub>	1	10,80	8,52
Ala	-COOH (terminal)	1	2,30	3,45

a. Stryer [21]

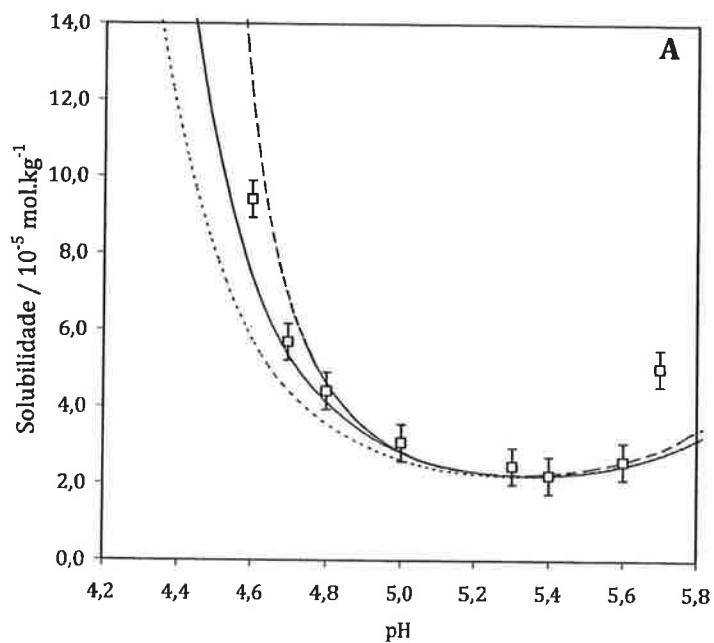
b. Kaarsholm *et al.* [19]

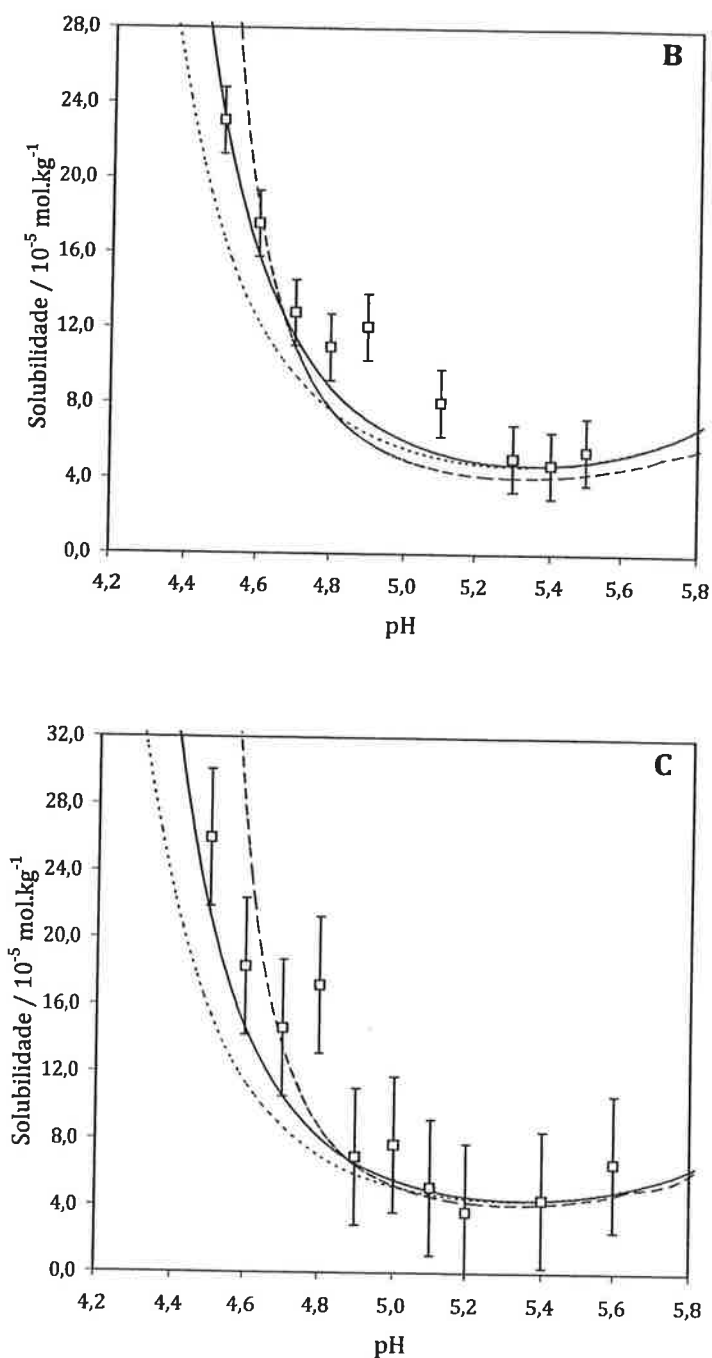
O número de diferentes configurações ( $\psi$ ) para a molécula de insulina suína é 65536, dos quais 2002 têm carga líquida nula. A configuração neutra mais comum é apresentada na Figura 7.1B, e corresponde àquela em que todos os grupos -NH<sub>2</sub> estão positivamente carregados e todos os grupos -COOH estão negativamente carregados (os grupos fenol-OH da tirosina, cujo pK<sub>A</sub> é elevado, estão neutros). A fração de moléculas protéicas neutras em função do pH, calculada usando os valores de pK<sub>A</sub> de Kaarsholm *et al.* [19], é apresentada na Figura 7.2. A fração total de moléculas neutras e a fração da configuração neutra mais comum apresentam o mesmo comportamento, alcançando um máximo no pI calculado da insulina. É evidente que ambas as frações são proporcionais – como deveriam ser, pois pela equação (7.17) a razão de equilíbrio entre duas configurações neutras não depende do valor do pH. Ambas as curvas tendem a zero para valores de pH distantes do ponto isoelétrico.



**Figura 7.2.** Fração de moléculas neutras de insulina como função do pH. Linha contínua: total de moléculas neutras; linha pontilhada: configuração mais comum.

Os resultados obtidos pela aplicação dos modelos estão apresentados na Figura 7.3. Por comparação, são apresentados também os resultados da modelagem realizada por Tashima et al. [18].





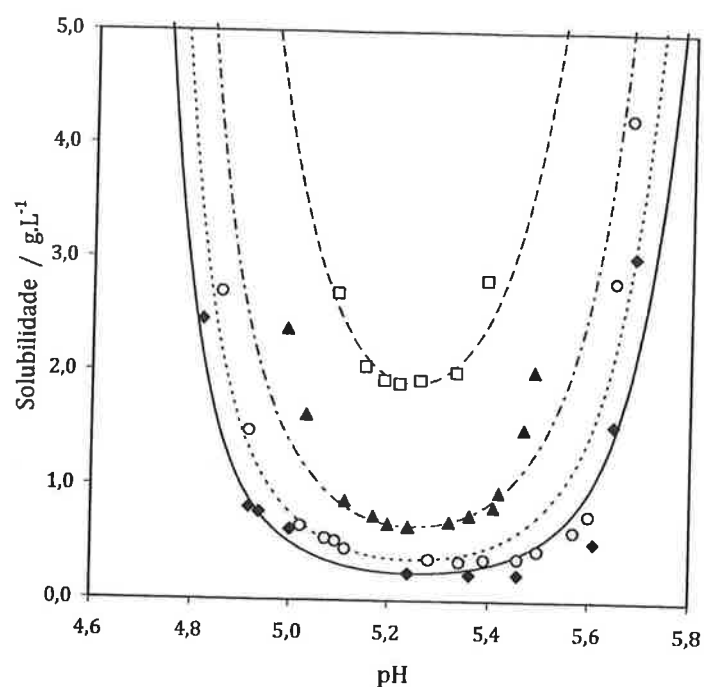
**Figura 7.3.** Solubilidade da insulina suína em função do pH em tampão NaHCO<sub>3</sub>. Dados experimentais (□) e barras de erro de Tashima et al. [18]. Modelagem: curva contínua: modelo proposto com valores de pK<sub>A</sub> de Kaarsholm et al. [19]; curva pontilhada: modelo proposto com valores de pK<sub>A</sub> livres de Stryer [20]; curva tracejada: modelo de Tashima et al. [18]. A: 298,2 K, B: 288,2 K e C: 278,2 K.

Dos resultados apresentados na Figura 7.3 observa-se que a abordagem proposta é adequada à modelagem da curva de solubilidade. Deve-se observar, também, que as

curvas foram obtidas sem o ajuste de qualquer parâmetro – o único dado necessário é o valor da solubilidade no ponto isoelétrico (5,4), igual a  $2,22 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$  a 298,2 K,  $4,76 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$  a 288,2 K e  $4,39 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$  a 278,2 K. As curvas geradas tanto com os valores de  $pK_A$  dos aminoácidos livres quanto com os valores obtidos a partir da curva de titulação mostram um comportamento semelhante – as curvas geradas com os valores de  $pK_A$  na cadeia são superiores, o que é razoável de se esperar (embora as condições da titulação sejam muito diversas daquelas em que se obtiveram os dados de solubilidade). A descrição proposta é superior àquela apresentada no Capítulo 5 no que diz respeito exclusivamente à solubilidade da insulina – obviamente, o modelo anteriormente apresentado é mais completo no que se refere a outros equilíbrios de fases (como o líquido-vapor) e químicos (como as reações de dissolução do  $\text{CO}_2$ ) que não são aqui contemplados.

A segunda proteína investigada foi a  $\beta$ -lactoglobulina. A estrutura utilizada para esta proteína foi obtida de Qin et al. [22]; os valores de  $pK_A$  utilizados foram obtidos de Cox e Nelson [23], e estão apresentados na Tabela 7.3. Neste caso específico, o ponto isoelétrico da proteína (aproximadamente 5,25 [10]) não corresponde ao ponto isoelétrico calculado pelos valores de  $pK_A$  dos aminoácidos isolados (4,51) – que pode ser obtido impondo-se  $\bar{c} = 0$  na equação (7.25). Considerando-se os grupos ionizáveis, aquele cujo valor de  $pK_A$  é mais próximo ao pI desta proteína é o ácido glutâmico; pode-se alterar o  $pK_A$  deste aminoácido de modo a que o valor do pI calculado coincida com o valor experimental – o que leva a que se considere, nesse caso, um valor de 5,14 em lugar de 4,25. A diferença entre os dois valores é da mesma ordem de magnitude que a diferença entre valores de  $pK_A$  na cadeia e isolados, no caso da insulina suína (Tabela 7.1).

O conjunto de curvas de solubilidade obtidas está apresentado na Figura 7.4. A solubilidade no pI tem o valor de  $0,24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (para uma concentração de NaCl de  $0,001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $0,36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $0,005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $0,65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e  $1,93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $0,02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Também nesse caso o modelo fornece resultados muito bons, provavelmente dentro do desvio experimental – a fonte dos dados [10] não menciona o desvio padrão. Embora um valor de  $pK_A$  tenha sido ajustado, este ajuste foi feito apenas com a informação do pI, de modo que o modelo mantém uma característica semi-preditiva também para a  $\beta$ -lactoglobulina. Neste caso não há modelos com os quais a abordagem apresentada possa ser comparada.



**Figura 7.4.** Solubilidade de  $\beta$ -lactoglobulina em soluções de NaCl a 298.2 K. Dados experimentais [10]: 0,001 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl (◆), 0,005 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl (○), 0,01 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl (▲) e 0,02 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl (□). Modelagem: linha contínua, 0,001 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl; linha pontilhada, 0,005 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl; linha alternada (pontilhada/tracejada), 0,01 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl, e linha tracejada, 0,02 mol·L<sup>-1</sup> de NaCl.

**Tabela 7.3.** Valores de pK<sub>A</sub> dos grupos ionizáveis da  $\beta$ -lactoglobulina bovina

Aminoácido	Grupos	Número	pK <sub>A</sub> <sup>a</sup>
Leu	-NH <sub>2</sub> (terminal)	1	9,60
Glu	$\gamma$ -COOH	16	4,25
Tyr	Phenol-OH	4	10,07
Cys	$\beta$ -SH	1	8,18
His	Imidazólio-NH <sub>2</sub>	2	6,00
Arg	Guanidínio-NH <sub>2</sub>	3	12,48
Asp	$\beta$ -COOH	11	3,65
Lys	$\epsilon$ -NH <sub>2</sub>	15	10,53
Ile	-COOH (terminal)	1	2,36

a. Cox and Nelson [23].

Os dois exemplos apresentados mostram que a abordagem é adequada para a modelagem da curva de solubilidade e permitem que se analisem suas possíveis limitações e extensões.

Inicialmente, a metodologia é limitada pela validade da lei de Henry. Nos casos estudados essa hipótese não chega a ser restritiva, pois ambas são proteínas relativamente pouco solúveis nas vizinhanças do pI. Em duas situações poderia ser necessário rever essa hipótese: em soluções cujo pH seja distante do ponto isoelétrico e na modelagem de proteínas mais solúveis. Seria possível, nesse caso, incluir o correspondente coeficiente de atividade na equação (7.7), embora provavelmente fossem necessários métodos numéricos para o cálculo da curva de solubilidade. Enquanto na modelagem de proteínas mais solúveis a adoção de um coeficiente de atividade poderia não ser tão relevante (uma vez que os termos correspondentes, se incluídos na equação (7.4), praticamente se cancelariam), para valores de pH distantes do pI tal adoção seria necessária, uma vez que a fração de moléculas neutras tende a zero nessas condições, mas a solubilidade não aumenta indefinidamente.

A insulina é uma proteína relativamente pequena, e todos os seus grupos ionizáveis podem ser considerados expostos. Proteínas maiores, como a  $\beta$ -lactoglobulina, podem ter alguns de seus grupos ionizáveis inacessíveis, em regiões hidrofóbicas, na estrutura terciária. Este fato pode afetar a metodologia proposta de duas maneiras. Inicialmente, nem todos os grupos ionizáveis obtidos da estrutura primária podem ser considerados *efetivamente ionizáveis* – mas não há metodologia segura para distinguir entre ambos (estruturas terciárias são usualmente baseadas em informação cristalográfica, relacionada à fase sólida, e podem não ser diretamente extensíveis a moléculas em solução). No caso específico da  $\beta$ -lactoglobulina, dados de acessibilidade de grupos para moléculas em estrutura cristalina estão disponíveis [22], mas não há um critério definido para definir quais desses grupos são ionizáveis – assim, todos os grupos (exceto as cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto) foram considerados ionizáveis. Em segundo lugar, em soluções de pH distante do pI, moléculas densamente carregadas podem apresentar mudanças na própria estrutura terciária, expondo grupos ionizáveis anteriormente inacessíveis, alterando o equilíbrio químico e, portanto, a solubilidade calculada. Deve-se considerar que em experimentos de titulação ocorrem as mesmas mudanças estruturais, de modo que os valores de  $pK_A$  obtidos pelo



ajuste da curva de titulação são, na verdade, aparentes – entre os fatores que podem afetar seu valor está também a acessibilidade dos grupos.

Como qualquer polieletrólito, pode haver um limite ao número de cargas que a cadeia pode suportar [24]. Entretanto, ao contrário de polieletrólitos sintéticos (como os apresentados no Capítulo 6 desta tese), experimentalmente observa-se que proteínas não atingem esse limite, em princípio pelo fato de a distância entre os grupos carregados ser maior. De modo geral, as cargas máximas experimentalmente determinadas, em valores extremos de pH, são aquelas resultantes da ionização completa dos resíduos acessíveis.

A metodologia é dependente da qualidade da curva de titulação (quando existente), fonte principal dos valores de  $pK_A$ . Alterações nesses valores podem ter um efeito significativo na curva de solubilidade calculada, especialmente no que diz respeito àqueles grupos cujo  $pK_A$  seja próximo ao ponto isoelétrico da proteína – como se pôde observar no caso da  $\beta$ -lactoglobulina. Isto é um aspecto relevante, por exemplo, em mudanças de temperatura: os dados de  $pK_A$  utilizados na modelagem da insulina foram obtidos em temperatura ambiente, e isso é uma provável razão para que a modelagem seja mais distante dos pontos experimentais para a temperatura de 277,2 K (mesmo considerando que a incerteza experimental é maior para os dados a esta temperatura).

Uma questão específica a ser considerada diz respeito à possibilidade de que a fase sólida seja na verdade um hidrato de proteína, e não uma fase protéica pura. Mesmo neste caso, o modelo ainda é aplicável. A presença de um hidrato, formado por uma configuração neutra  $P_0$  e  $d$  moléculas de água, pode ser levada em conta por meio da seguinte reação química:



O hidrato estaria em equilíbrio com a fase sólida (formada também pelo composto  $[P_0](H_2O)_d$ ), e seu potencial químico seria constante. Entretanto, na faixa de concentrações considerada, o potencial químico da água também pode ser considerado constante, do que seguiria a invariância do potencial químico da forma neutra.

Uma segunda questão específica relaciona-se ao fato de que muitas proteínas apresentam oligomerização em solução. No caso da insulina, o hexâmero é considerado a forma mais estável [25,26], enquanto a  $\beta$ -lactoglobulina dimeriza-se em condições próximas ao pI (em valores de pH superiores a 4,0), formando octâmeros em algumas condições [27], existindo evidência de dimerização inclusive em fase sólida [28]. Não

existe a necessidade de considerar as reações de auto-associação na aplicação do modelo: a relação de equilíbrio entre formas oligoméricas envolvendo apenas espécies neutras implica em que o potencial químico de cada oligômero neutro também se mantenha constante na condição de equilíbrio sólido-líquido. Em conjunto com a lei de Henry, equação (7.2), essa condição significaria que a concentração de oligômeros neutros também seria constante. É irrelevante, para o uso da equação (7.4), qual configuração neutra ou mesmo qual forma oligomérica neutra é considerada.

Na aplicação da modelagem proposta, optou-se por manter o ajuste de parâmetros em um mínimo - não correlacionando sequer um parâmetro (no caso da insulina) ou correlacionando apenas um parâmetro à curva de titulação (no caso da  $\beta$ -lactoglobulina). É evidente que a concordância poderia ser ainda maior caso se ajustassem valores de  $pK_A$  diretamente à curva de solubilidade, e que isto ocorreria provavelmente com pequenas mudanças nestes valores. Entretanto, mais do que a melhor concordância, visou-se neste trabalho a demonstrar a relação entre a curva de solubilidade e a fração de moléculas neutras, e este objetivo pôde ser atingido. É claro que isto não impede que ajustes sejam feitos com o objetivo de aproximar os resultados do modelo a dados experimentais, mas isto está fora do escopo deste trabalho.

#### 7.4. Conclusões

Um modelo termodinâmico para a descrição da solubilidade de proteínas em função do pH na vizinhança do ponto isoelétrico foi desenvolvido e aplicado com sucesso ao estudo de curvas de solubilidade da insulina suína e da  $\beta$ -lactoglobulina. Foi possível mostrar que a aplicação da condição de eletro-neutralidade ao cálculo do equilíbrio sólido-líquido leva à mesma equação que a obtida pela extensão da abordagem de Liderstrøm-Lang e Grönwall. Esta equivalência mostra que a relação correta entre a curva de titulação e a curva de solubilidade pôde ser estabelecida por meio do modelo proposto. Os resultados obtidos mostram que o cálculo da distribuição de cargas em uma população de moléculas protéicas é uma abordagem possível e promissora para a descrição do equilíbrio de fases destas moléculas.

## 7.5. Nomenclatura

### Letras latinas

$a_{p_0}$	atividade de uma configuração neutra específica
$a_{p_k}$	atividade da proteína em uma configuração $k$
$\bar{c}$	carga média das moléculas protéicas
$c[k]$	carga das moléculas protéicas em uma configuração $k$
$k$	configuração de uma molécula protéica, ou seja, seu estado de ionização
$K_k$	constante de equilíbrio entre a proteína neutra e uma certa configuração $k$
$n$	número de grupos ionizáveis de uma proteína
$n_A$	número de grupos carregados negativamente
$n_B$	número de grupos neutros cujo estado carregado seja negativo
$n_C$	número de grupos carregados positivamente
$n_D$	número de grupos neutros cujo estado carregado seja positivo
$n_+$	número de grupos ionizáveis positivamente de uma proteína
$P_0$	molécula protéica neutra em configuração correspondente à fase sólida
$P_k^c$	molécula protéica com carga $c$ em uma configuração $k$
$R$	constante dos gases [ $8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ]
$S$	solubilidade
$T$	temperatura absoluta [K]
$\mathbf{x}$	composição do sistema
$\mathbf{x}^{ref}$	composição do sistema em um estado de referência
$x_p$	fração numérica de proteínas
$x_0$	fração numérica das moléculas protéicas neutras

### Letras gregas

$\alpha_j$	fração de grupos $j$ ionizados
$\alpha'_j$	termo definido pela equação (7.11)
$\varepsilon[j, k]$	carga do grupo $j$ na configuração $k$
$\phi[k]$	fração de moléculas protéicas na configuração $k$
$\gamma_k$	coeficiente de atividade da proteína na configuração $k$
$\eta[j]$	função definida pela equação (7.31)

$\mu_p^L$	potencial químico da proteína $p$ na fase líquida [ $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]
$\mu_p^S$	potencial químico da proteína $p$ na fase sólida [ $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]
$\mu_p^{ref}$	potencial químico da proteína $p$ em um estado de referência [ $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]
$\nu_j$	carga do grupo $j$ em seu estado ionizado
$\theta[j, k]$	função definida pela equação (7.32)
$\psi$	número de diferentes configurações de uma proteína

### Abreviaturas

pK <sub>A</sub>	co-logaritmo da constante de equilíbrio de ionização
pI	ponto isoelétrico

### 7.6. Nota adicional

Considerar uma proteína em solução como uma população de moléculas com diferentes cargas é uma idéia que, como apresentado nesse capítulo, foi considerada pela primeira vez ainda na década de 30 do século XX. Este capítulo mostra que a abordagem é promissora e ainda pode ser explorada. Entretanto, cabe aqui uma pergunta, específica sobre o equacionamento apresentado: é muito mais usual que se considere que uma proteína em solução é uma molécula única com carga média; seria possível, a partir dessa abordagem, obter as mesmas equações?

A resposta é positiva (e deveria ser, pois a relação entre pH e solubilidade deve ser única), e sua demonstração é relativamente simples. Efetivamente, pode-se considerar que exista uma única espécie em solução, com carga  $c$ . Nesse caso, estabelece-se o seguinte equilíbrio, entre a fase sólida e a espécie em solução:



Considere-se, por hipótese, que  $c$  não necessariamente seja inteiro. Ainda assim, por extensão a relação de equilíbrio escrever-se-ia:

$$K = \frac{a_{P^c} a_{H^+}^{-c}}{a_{P_0(s)}} \quad (7.38)$$

Sendo a atividade do sólido constante (igual à unidade, vez que o estado de referência é o próprio sólido puro), da relação acima se segue que:

$$\log(a_{P^c}) - c \log(a_{H^+}) = \log(K) + \log(a_{P_0(s)}) \quad (7.39)$$

O segundo termo desta equação é independente das condições da solução; derivando-se ambos os membros com respeito ao pH, segue-se:

$$\frac{d \log(a_{pc})}{dpH} + c = 0 \quad (7.40)$$

Sendo válida a lei de Henry, a atividade da proteína em solução será sua fração numérica ou, pela condição de equilíbrio sólido-líquido, sua solubilidade, do que segue que:

$$\frac{d \log S}{dpH} = -c \quad (7.41)$$

Cuja forma é idêntica à equação (7.23), com a ressalva de que, neste caso,  $c$  é a carga da única molécula em solução. Pode-se considerar, simplesmente, que o caso de uma molécula única com carga média é tão somente um caso particular da abordagem. Por esta razão, o estudo apresentado no Capítulo 5 não pode ser desprezado em face do apresentado neste capítulo.

Uma última observação diz respeito aos conjuntos de  $pK_A$  utilizados na modelagem da solubilidade da insulina. No Capítulo 5 observou-se que os resultados gerados tanto pelo conjunto de valores dos aminoácidos isolados quanto pelos aminoácidos na cadeia eram muito semelhantes, de modo que se escolheu trabalhar com os aminoácidos isolados; já neste capítulo os valores na cadeia resultaram em uma predição melhor. A aparente contradição resolve-se pela análise da forma final das equações utilizadas: enquanto no Capítulo 5 a solubilidade relaciona-se ao valor absoluto da carga, pela equação (7.23) a solubilidade é dependente da integral da carga como função do pH, sendo o efeito de eventuais desvios, portanto, cumulativo. Além disso, o parâmetro ajustável  $k$  do Capítulo 5 pode, em seu ajuste, encobrir eventuais diferenças.

### 7.7. Referências

- [1] Moretti JJ, Sandler SI, Lenhoff AM, Phase equilibria in the lysozyme-ammonium sulfate-water system, *Biotechnol. Bioeng.*, **70**, 498-506, 2000.
- [2] Watanabe EO, Popova E, Miranda EA, Maurer G, Pessôa Filho, PA, Phase equilibria for salt-induced lysozyme precipitation: effect of salt type and temperature, *Fluid Phase Equilib.*, **281**, 32-39, 2009.

- [3] Shulgin IL, Ruckenstein E, Various contributions to the osmotic second virial coefficient in protein-water-cosolvent solutions, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 14665–14671, 2008.
- [4] Tavares FW, Prausnitz JM, Analytic calculation of phase diagrams for solutions containing colloids or globular proteins, *Colloid Polym. Sci.*, **282**, 620-632, 2004.
- [5] Mollerup JM, Breil MP, On the thermodynamics of the McMillan–Mayer state function, *Fluid Phase Equilibr.*, **276**, 18-23, 2009.
- [6] Mollerup JM, Breil MP, The osmotic second virial coefficient and the Gibbs–McMillan–Mayer framework, *Fluid Phase Equilibr.*, **286**, 88-94, 2009.
- [7] Agena SM, Pusey ML, Bogle IDL, Protein solubility modeling, *Biotechnol. Bioeng.*, **64**, 144-150, 1999.
- [8] Coutinho JAP, Pessoa FLP, A modified extended UNIQUAC model for proteins, *Fluid Phase Equilibr.*, **222-223**, 127-133, 2004.
- [9] Green AA, Studies in the Physical Chemistry of the proteins, *J. Biol. Chem.*, **93**, 517-541, 1931.
- [10] Grönwall A, Studies on the solubility of lactoglobulin, *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **24**, 185-200, 1941.
- [11] Linderstrøm-Lang K, On the ionization of proteins, *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **15**, 1-29, 1924.
- [12] Pinho SP, Silva CM, Macedo EA, Solubility of amino acids: a group-contribution model involving phase and chemical equilibrium, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **33**, 1341-1347, 1994.
- [13] Khoshkbarchi MK, Vera JH, A simplified perturbed hard-sphere model for the activity coefficients of amino acids and peptides in aqueous solutions, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **35**, 4319-4327, 1996.
- [14] Tseng HC, Lee CY, Weng WL, Shiah IM, Solubilities of amino acids in water at various pH values under 298.15 K, *Fluid Phase Equilib.*, **285**, 90-95, 2009.
- [15] Pradhan AA, Vera JH, Effects of acids and bases on the solubility of amino acids, *Fluid Phase Equilib.*, **152**, 121-132, 1998.
- [16] Seyfi S, Pazuki G, Aghamiri SF, Beheshti, M, On the prediction of equilibrium phase behavior of amino acids in aqueous and aqueous-electrolyte solutions using SAFT equation of state, *Fluid Phase Equilib.*, **287**, 15-22, 2009.

- [17] Tjong H, Zhou HX, Prediction of protein solubility from calculation of transfer free energy, *Biophys. J.*, **95**, 2601-2609, 2008.
- [18] Tashima AK, Ottens M, van der Wielen LAM, Cintra DE, Pauli JR, Pessôa Filho PA, Miranda EA, Precipitation of porcine insulin with carbon dioxide, *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 909-919, 2009.
- [19] Kaarsholm NC, Havelung S, Hougaard P, Ionization behavior of native and mutant insulins: pK perturbation of B13-Glu in aggregated species, *Arch. Biochem. Biophys.*, **283**, 496-502, 1990.
- [20] Stryer L, Biochemistry, 4<sup>th</sup> ed, New York: W. H. Freeman and Company, 1064p, 1995.
- [21] Blundell T, Dodson G, Hodgkin D, Mercola D, Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology, In: Anfinsen Jr CB, Edsall JT, Richards FM (eds.), 1972, Advances in Protein Chemistry, New York: Academic Press, p. 279-403, 1972.
- [22] Qin BY, Bewley MC, Creamer LK, Baker HM, Baker EN, Jameson GB, Structural basis of the Tanford transition of bovine  $\beta$ -lactoglobulin, *Biochemistry*, **37**, 14014-14023, 1998.
- [23] Cox MM, Nelson DL, *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Worth Publishers, 1200p, 2003.
- [24] Manning GS, Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. I. Colligative properties, *J. Chem. Phys.*, **51**, 924-933, 1969.
- [25] Jeffrey PD, Coates JH, An equilibrium ultracentrifuge study of the self-association of bovine insulin, *Biochemistry-US*, **5**, 489-498, 1966.
- [26] Helmerhorst E, Stokes GB, Self-association of insulin: determinations based on a differential gel adsorption procedure, *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**, 238-247, 1986.
- [27] Gottschalk M, Nilsson H, Roos H, Halle B, Protein self-association in solution: The bovine  $\beta$ -lactoglobulin dimer and octamer, *Protein Sci.* **12**, 2404-2411, 2003.
- [28] Adams JJ, Anderson BF, Norris GE, Creamer LK, Jameson GB, Structure of bovine  $\beta$ -lactoglobulin (variant A) at very low ionic strength, *J. Struct. Biol.*, **154**, 246-254, 2006.





## 8. Considerações finais

A aplicação da Termodinâmica ao estudo de processos de purificação e recuperação de proteínas foi preconizada em 1986 por Ronald D. Johnson<sup>1</sup>: entretanto, ainda em 2008, Nfor et al.<sup>2</sup> asseveravam que:

*“Quando se comparam esses dois tipos de processo [químico e bioquímico], duas deficiências dos projetos de processos bioquímicos atuais são imediatamente evidentes: (1) a ausência de modelos termodinâmicos confiáveis para a estimativa de propriedades moleculares e (2) a ausência geral de bancos de dados confiáveis de propriedades físico-químicas e termodinâmicas de macro-biomoléculas, incluindo proteínas.”*

Os três anos que separam esta afirmação e esta tese não alteraram significativamente o panorama geral. Neste sentido, à parte as conclusões individuais de cada capítulo, algumas observações gerais podem ser feitas a partir do trabalho relatado nesta tese.

Inicialmente, deve-se considerar que a aplicação do ferramental termodinâmico ao equilíbrio de fases de sistemas contendo biomoléculas é substancialmente mais complexa. Isto não ocorre simplesmente pelo fato de as moléculas serem macromoléculas, mas principalmente pelo papel desempenhado por fatores como estrutura, carga e forma destas macromoléculas no equilíbrio de fases. Um exemplo: os dados de equilíbrio sólido-líquido para a  $\beta$ -lactoglobulina estudados no Capítulo 7 foram obtidos para a proteína de origem bovina. Entretanto, existem inúmeras variantes dessa proteína, com pequenas mudanças na estrutura primária, que levam por sua vez a diferentes perfis de carga e, conseqüentemente, a diferentes curvas de solubilidade. O ajuste do  $pK_A$  do ácido glutâmico, tal como realizado, em certo sentido encobre a ausência de conhecimento sobre a estrutura da proteína utilizada no estudo original.

---

<sup>1</sup> Johnson RD, The processing of biomolecules: a challenge for the eighties, *Fluid Phase Equilibria*, **29**, 109-123, 1986.

<sup>2</sup> Nfor BK, Ahamed T, van Dedem GWK, van der Wielen LAM, van de Sandt EJAX, Eppink MHM, Ottens M, Design strategies for integrated protein purification processes, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **83**, 124-132, 2008.

Uma preocupação que praticamente inexiste na Engenharia Química – conhecer a exata estrutura da molécula – é relevante para o estudo da Termodinâmica de Bioprocessos.

Embora metodologias clássicas de equilíbrio de fases tenham sido utilizadas neste trabalho (e possam ser utilizadas), há que se mencionar que a incerteza experimental muitas vezes é elevada – como pode ser visto nas Figuras 3.4 a 3.8 (Capítulo 3) e 7.3 (Capítulo 7, sobre os dados do Capítulo 5)<sup>3</sup>. Esta imprecisão não é privilégio dos trabalhos apresentados nesta tese, mas é inerente à obtenção de dados de equilíbrio de sistemas contendo biomoléculas<sup>4</sup>. Enquanto um desvio da ordem de 1,5% no valor da pressão de saturação pode comprometer totalmente o cálculo de uma coluna de destilação, como sabido desde a análise exemplar de Zudkevitch<sup>5</sup>, um desvio da mesma ordem na solubilidade de uma proteína, por exemplo, é experimentalmente irrelevante (metodologias analíticas de determinação de concentração protéica têm desvio maior que este). Além disso, alguns cuidados, como traçar curvas de calibração de métodos espectrofotométricos com as próprias proteínas em estudo (e não usando a albumina de soro bovino como padrão), tomados nos trabalhos aqui relatados, não são comuns na literatura – às vezes, tampouco são possíveis.

Finalmente, o impacto de contaminantes no equilíbrio de fases em sistemas contendo biomoléculas é relevante, mas quase nunca levado em conta. Estudos de equilíbrio de fases (e, neste sentido, os aqui apresentados não são exceção) usam biomoléculas previamente purificadas por cromatografia e cristalização; mesmo assim, contaminantes da ordem de alguns centésimos em fração mássica não são raros. Isso pode comprometer, por exemplo, a obtenção de medidas de pressão osmótica. Quando se pretende estender os estudos de equilíbrio de fases à purificação partindo de clarificados celulares, por exemplo, a aplicação da Termodinâmica torna-se ainda mais incerta.

Deve-se reconhecer que, ao contrário de operações como a destilação e a extração líquido-líquido, em que a necessidade por dados de equilíbrio e modelos

<sup>3</sup> No Capítulo 4, barras de erro estão ausentes em virtude da estrutura dos diagramas, mas se pode inferir que seriam relevantes pelos desvios experimentais mencionados.

<sup>4</sup> Observe-se, por exemplo, que é impossível distinguir apenas pela curva de solubilidade a transição entre os precipitados verdadeiros no Capítulo 4 – mesmo que adotássemos uma escala logarítmica: se há uma mudança de inclinação na curva, ela é mascarada pelo desvio experimental.

<sup>5</sup> Zudkevitch D., Imprecise data impacts plant design and operation, *Hydrocarbon Processing*, **54**, 97-103, 1975.

termodinâmicos passou a fazer parte do desenvolvimento das técnicas industriais, até este momento o setor produtivo de Engenharia de Bioprocessos tem prescindido da Termodinâmica. Essa situação, entretanto, não deve subsistir indefinidamente. Para que esta distância seja abreviada, alguns caminhos deverão ser trilhados pelos pesquisadores desta ciência.

Inicialmente, medidas de atividade biológica devem fazer parte da pesquisa em Termodinâmica de maneira mais efetiva. Até o momento, a atividade biológica não é uma preocupação em pesquisas de equilíbrio de fases: haja vista ao fato de que os dois únicos artigos já publicados na *Fluid Phase Equilibria* com medidas conjuntas de atividade enzimática e equilíbrio de fases são os artigos condensados no Capítulo 4 desta tese. Isso ocorre muito embora proteínas sejam efetivamente estudadas com um viés termodinâmico: entre todos os artigos já publicados na *Fluid Phase Equilibria*, 27 têm *protein* como palavra-chave, 51 apresentam esta palavra no resumo, nas palavras-chave ou no título, e um total de 299 a mencionam. O mesmo ocorre, por exemplo, no *Journal of Chemical Thermodynamics*: há 27 artigos deste periódico que contêm *protein* no resumo, nas palavras-chave ou no título, e um total de 225 artigos mencionam-na, mas em nenhum deles não se encontram medidas de atividade enzimática. É necessário lembrar que um dos critérios primeiros para a qualidade de um bioprocessos deve ser *sempre* a manutenção da atividade biológica. Reconheça-se que esta pode não ser uma tarefa simples: em um dos estudos que compõem esta tese (Capítulo 5), foi necessário recurso a métodos próprios das ciências da saúde para a medida de atividade de insulina, e em um deles (Capítulo 3) não foi feita análise de atividade enzimática da lisozima. Mas é uma tarefa necessária. Recorde-se que a atividade biológica de uma enzima também é função do solvente em que ela se encontra, do pH, da temperatura e da força iônica – ou seja, das mesmas propriedades que afetam o comportamento de fases. Cumpre relacioná-los.

Em segundo lugar, a Termodinâmica deverá se ocupar também das incertezas inerentes aos bioprocessos. Para que os métodos próprios sejam aplicáveis, cada vez mais os contaminantes deverão ser tratados como participantes dos sistemas. Isso pode ser facilmente implementado para as etapas finais de purificação (como a cristalização ou as etapas cromatográficas, em que os contaminantes são, também eles, proteínas), mas não o é em etapas iniciais de concentração e extração. O diálogo com os profissionais especialistas em bioprocessos deve ser intensificado.

Finalmente, deve-se procurar desenvolver modelos tão simples quanto seja possível levando em conta os fenômenos relevantes para cada equilíbrio em questão (como a agregação em dímeros ou oligômeros, a ocorrência de interações específicas com solventes e co-solventes, a possibilidade de enovelamento ou desenovelamento). Uma das razões para isso é a própria necessidade de incluir nos cálculos os outros participantes do processo. Ademais, com o crescimento do número de produtos biotecnológicos, o estudo detalhado de cada molécula pode tornar-se ineficaz. No momento em que esta tese é escrita, já foram publicados estudos sistemáticos sobre a produção de proteínas totalmente sintéticas<sup>6</sup>; é possível pensar que, em um futuro próximo, proteínas assim sejam produzidas em escala mais larga, e métodos de correlação ou predição sejam cada vez mais necessários<sup>7</sup>. Cabe-nos exercer o princípio da parcimônia.

Por estas razões se procurou manter o escopo desta tese ligado à Termodinâmica Clássica, e é por estas razões que seu autor acredita que a pesquisa na aplicação da Termodinâmica Clássica a biomoléculas e bioprocessos continuará relevante em um futuro próximo.

---

<sup>6</sup> Fisher MA, McKinley KL, Bradley LH, Viola SR, Hecht MH, *De novo* designed proteins from a library of artificial sequences function in *Escherichia coli* and enable cell growth, PLoS ONE 6(1): e15364. doi:10.1371/journal.pone.0015364, 2011.

<sup>7</sup> É claro que essa afirmação não subentende uma crítica à utilização de métodos oriundos da Termodinâmica Estatística ou de abordagens baseadas no formalismo de McMillan & Mayer, pelo contrário: a pesquisa nessas áreas fornece informações valiosas ao permitir o estudo detalhado da influência das interações entre moléculas protéicas no comportamento de fases, entre outros aspectos, e certamente seu uso deve se tornar cada vez mais disseminado e mais importante.