ARIANA TREVIZAN NOSSE

MODELAGEM TERMODINÂMICA DA PRESSÃO OSMÓTICA DE
SOLUÇÕES PROTÉICAS POR MEIO DE EQUAÇÕES
VOLUMÉTRICAS DE ESTADO

São Paulo
2012

ARIANA TREVIZAN NOSSE

MODELAGEM TERMODINÂMICA DA PRESSÃO OSMÓTICA DE SOLUÇÕES
PROTÉICAS POR MEIO DE EQUAÇÕES VOLUMÉTRICAS DE ESTADO

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia

São Paulo
2012

ARIANA TREVIZAN NOSSE

MODELAGEM TERMODINÂMICA DA PRESSÃO OSMÓTICA DE SOLUÇÕES
PROTÉICAS POR MEIO DE EQUAÇÕES VOLUMÉTRICAS DE ESTADO

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Alcântara
Pessôa Filho

São Paulo
2012

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob responsabilidade única da autora e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 10 de julho de 2012.

Assinatura da autora_____

Assinatura do orientador_____

FICHA CATALOGRÁFICA

Nosse, Arian Trevizan

**Modelagem termodinâmica da pressão osmótica de soluções
protéicas por meio de equações volumétricas de estado / A.T.
Nosse. -- ed.rev. -- São Paulo, 2012.**

105 p.

**Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade
de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.**

**1. Termodinâmica química 2. Modelos matemáticos 3. Sais
4. Proteínas 5. Polímeros sintéticos I. Universidade de São Pau-
lo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.
t.**

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Antonio Kiyoshi (*in memorian*), o herói
que sempre incentivou os meus estudos.

À minha mãe, Edna, minha maior professora.

Agradecimentos

À Deus acima de tudo, pela vida e pela família sempre presente e acolhedora.

Ao Professor Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho, pela brilhante orientação, pela paciência, pela compreensão e por acreditar e confiar em mim.

Às minhas irmãs, Mayara e Máisa, e ao meu cunhado, Fernando, por sempre me incentivar e apoiar.

Aos meus amigos, por me apoiarem e por compreenderem, muitas vezes, a minha ausência.

RESUMO

A pressão osmótica é uma das principais propriedades de interesse no estudo da não-idealidade de soluções proteicas, por fornecer diretamente informações sobre a atividade do solvente e, indiretamente, sobre o comportamento da proteína em solução. O presente trabalho objetiva a investigação do uso de equações osmóticas de estado para o cálculo da pressão osmótica em soluções proteicas contendo co-solventes como sais e polímeros. O modelo desenvolvido compreende um termo de esferas rígidas de Carnahan-Starling e um termo atrativo de van der Waals. Para avaliar a adequação do modelo proposto, correlacionaram-se dados de pressão osmótica de soluções proteicas obtidos da literatura para as proteínas lisozima, α -quimotripsina, albumina de soro bovino e imunoglobulina G humana, em soluções aquosas em diversos valores de pH e com diversos co-solventes.

O modelo desenvolvido foi capaz de representar adequadamente os dados experimentais na maioria dos casos estudados, com uma correspondência maior do que a equação virial, usualmente empregada no estudo dessas soluções. Para a modelagem de soluções de α -quimotripsina, foi necessário considerar a dimerização da molécula proteica. Em poucos casos, especialmente na modelagem de soluções de albumina de soro bovino contendo polietileno glicol, o modelo mostrou-se insuficiente para correlacionar adequadamente os dados experimentais. Na maioria das vezes, o parâmetro do termo atrativo mostrou uma fraca dependência do pH próximo ao ponto isoelétrico, uma dependência maior com respeito a esse parâmetro em valores de pH mais distantes deste ponto, e uma dependência nítida com respeito à força iônica. De maneira geral, embora a representação dos dados experimentais seja adequada, não foi possível observar tendências inequívocas do parâmetro atrativo com respeito ao pH e à força iônica de modo a permitir o desenvolvimento de um modelo preditivo.

Palavras-chave: Termodinâmica Química, Modelos matemáticos, Proteínas, Sais, Polímeros Sintéticos.

ABSTRACT

The osmotic pressure is one of the key properties for the assessment of the non-ideality of protein solutions. Its importance is related to the fact that it allows the evaluation of solvent activity and indirectly of the protein behavior in solution. This work presents an investigation on the use of osmotic equations of state for calculating the osmotic pressure of aqueous solutions of proteins containing co-solvents such as salts or polymers. The developed model comprises a repulsive term, corresponding to the hard-sphere equation by Carnahan-Starling, and an attractive term, corresponding to a van der Waals type equation. To assess the suitability of the proposed model, experimental osmotic pressure data obtained from literature for aqueous solutions containing lysozyme, α -chymotrypsin, bovine serum albumin and human immunoglobulin G, at several values of pH and with different co-solvents, were correlated.

The model was able to adequately represent the experimental data in most of the cases, with a better agreement than the virial equation, which is the most widely used equation in the study of the osmotic pressure of protein solutions. For the modeling of α -chymotrypsin solutions, it was necessary to consider the dimerization of the protein molecule. Only in a few cases, mainly in the modeling of solutions containing bovine serum albumin and polyethylene glycol, it was not possible to correlate adequately the experimental data. In most cases, the attractive parameter presented a weak dependency on the pH close to the isoelectric point, and a stronger dependency on pH otherwise. The dependency on the ionic strength was almost always strong. To conclude, in spite of the good performance of the model in the correlation of experimental data, definite tendencies of the attractive parameter in relation to pH and ionic strength were not observed, and hence a predictive model could not be developed.

Keywords: Chemical Thermodynamics, Mathematical models, Proteins, Salts, Synthetic Polymers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Sistema com dois compartimentos separados por membrana semipermeável, sendo que em um dos compartimentos há solvente mais soluto e no outro apenas solvente em equilíbrio termodinâmico.....27
- Figura 2: $\diamond$ Dados experimentais para pressão osmótica da α -quimotripsina obtidos por Haynes et al. (1992), em solução 0,1M de dihidrogenofosfato de sódio e pH 9 e (—) pressão osmótica obtida a partir da equação ideal, equação (9).....29
- Figura 3: Valores de a para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1M. $\diamond$ valores de a estimados para soluções em pH 4 e $\square$ para soluções em pH 7.44
- Figura 4: Valores de FO para dados experimentais da lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1M, pH 4.45
- Figura 5: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,0, (.....) Π calculada para pH 4,0, $\square$ valores experimentais para pH 7,0, (-----) Π calculada para pH 7,0, $\circ$ valores experimentais para pH 8,0, (.....) Π calculada para pH 8,0 e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$51
- Figura 6: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,0, (.....) $\square$ calculada para pH 4,0, $\square$ valores experimentais para pH 7,0, (-----) $\square$ calculada para pH 7,0, $\circ$ valores experimentais para pH 8,0, (.....) $\square$ calculada para pH 8,0 e (—) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$51
- Figura 7: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 4 e diferentes forças iônicas. $\diamond$ valores experimentais para 1M, (.....) $\square$ calculada para 1M, $\circ$ valores experimentais para 3M, (-----) $\square$ calculada para 3M, e (—) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$53

- Figura 8: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 7 e diferentes forças iônicas. $\diamond$ valores experimentais para 1M, (.....) $\square$ calculada para 1M, $\circ$ valores experimentais para 3M, (-----) $\square$ calculada para 3 M, e (———) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$53
- Figura 9: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 8 e diferentes forças iônicas. $\diamond$ valores experimentais para 1M, (.....) $\square$ calculada para 1M, $\circ$ valores experimentais para 3M, (-----) $\square$ calculada para 3M, e (———) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$54
- Figura 10: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ 1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4, (.....) $\square$ calculada para pH 4, $\square$ valores experimentais para pH 7, (-----) $\square$ calculada para pH 7, $\circ$ valores experimentais para pH 8, (·-·-·-·-·-) $\square$ calculada para pH 8 e (———) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$54
- Figura 11: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em 1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 7, (.....) $\square$ calculada para pH 7, $\circ$ valores experimentais para pH 8, (-----) $\square$ calculada para pH 8, e (———) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$55
- Figura 12: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em 3M. $\diamond$ valores experimentais para pH 7, (.....) $\square$ calculada para pH 7, $\circ$ valores experimentais para pH 8, (-----) $\square$ calculada para pH 8, e (———) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$56
- Figura 13: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em pH 7. $\diamond$ valores experimentais para 1M, (.....) $\square$ calculada para 1M, $\circ$ valores experimentais para 3M, (-----) $\square$ calculada para 3M, e (———) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$57

Figura 14: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em pH 8. $\diamond$ valores experimentais para 1M, (.....) $\square$ calculada para 1M, $\circ$ valores experimentais para 3M, (-----) $\square$ calculada para 3M, e (——) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$58

Figura 15: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em soluções de diferentes força iônica, a 1M em pH 4. $\diamond$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (.....) $\square$ calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\circ$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, (-----) $\square$ calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, e (——) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$58

Figura 16: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em soluções de diferentes força iônica, a 1M em pH 7. $\diamond$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (.....) $\square$ calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\square$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, (-----) $\square$ calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, $\circ$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, (.....) $\square$ calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e (——) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$59

Figura 17: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em soluções de diferentes força iônica, a 1M em pH 8. $\diamond$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (.....) $\square$ calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\square$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, (-----) $\square$ calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, $\circ$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, (.....) $\square$ calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e (——) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$60

Figura 18: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em soluções de 3M e pH 7. $\diamond$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (.....) $\square$ calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\circ$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, (-----) $\square$ calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, e (——) $\square$ calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$60

Figura 19: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon et al. (2000) em soluções de 3M e pH 8. $\diamond$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (.....) $\square$ calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\circ$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, (-----) $\square$ calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, e (——) calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$61

Figura 20: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992), em soluções de K_2SO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4, (.....) Π calculada para pH 4, $\square$ valores experimentais para pH 5, (-----) Π calculada para pH 5, $\circ$ valores experimentais para pH 6, (·-·-·-·-·-) Π calculada para pH 6, * valores experimentais para pH 8, (-·-·-·-·-) Π calculada para pH 8 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$65

Figura 21: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992), em soluções de K_2SO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 8,25, (.....) Π calculada para pH 8,25, $\square$ valores experimentais para pH 10, (-----) Π calculada para pH 10, $\circ$ valores experimentais para pH 11, (·-·-·-·-·-) Π calculada para pH 11, * valores experimentais para pH 12, (-·-·-·-·-) Π calculada para pH 12 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$65

Figura 22: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992), em soluções de NaH_2PO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,5, (.....) Π calculada para pH 4,5, $\square$ valores experimentais para pH 5, (-----) Π calculada para pH 5, $\circ$ valores experimentais para pH 6, (·-·-·-·-·-) Π calculada para pH 6 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$66

Figura 23: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992), em soluções de NaH_2PO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 7, (.....) Π calculada para pH 7, $\square$ valores experimentais para pH 8,25, (-----) Π calculada para pH 8,25, $\circ$ valores experimentais para pH 9, (·-·-·-·-·-) Π calculada para pH 9 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$66

Figura 24: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992) em soluções de 0,1M e pH 5. $\diamond$ valores experimentais para K_2SO_4 , (.....) Π calculada para K_2SO_4 , $\circ$ valores experimentais para NaH_2PO_4 , (-----) Π calculada para NaH_2PO_4 , e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$67

Figura 25: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992) em soluções de 0,1M e pH 6. $\diamond$ valores experimentais para NaH_2PO_4 , (.....) Π calculada para NaH_2PO_4 , $\circ$ valores experimentais para K_2SO_4 , (-----) Π calculada para K_2SO_4 , e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$68

Figura 26: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992) em soluções de 0,1M e pH 8,25. $\diamond$ valores experimentais para NaH_2PO_4 , (.....) Π calculada para NaH_2PO_4 , $\circ$ valores experimentais para K_2SO_4 , (-----) Π calculada para K_2SO_4 , e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$68

Figura 27: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992), em soluções de K_2SO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4, (.....) Π calculada para pH 4, $\square$ valores experimentais para pH 5, (-----) Π calculada para pH 5, $\circ$ valores experimentais para pH 6, (·-·-·-·-·-) Π calculada para pH 6, * valores experimentais para pH 8, (·-·-·-·-·-) Π calculada para pH 8 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$70

Figura 28: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992), em soluções de K_2SO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 8,25, (.....) Π calculada para pH 8,25, $\square$ valores experimentais para pH 10, (-----) Π calculada para pH 10, $\circ$ valores experimentais para pH 11, (·-·-·-·-·-) Π calculada para pH 11, * valores experimentais para pH 12, (·-·-·-·-·-) Π calculada para pH 12 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$70

Figura 29: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992), em soluções de NaH_2PO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais

para pH 4,5, (·····) Π calculada para pH 4,5, $\circ$ valores experimentais para pH 5, (-----) Π calculada para pH 5, $\square$ valores experimentais para pH 6, (·-·-·-·-·-) Π calculada para pH 6, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$71

Figura 30: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992), em soluções de NaH_2PO_4 a 0,1M. $\square$ valores experimentais para pH 7, (·····) Π calculada para pH 7, $\diamond$ valores experimentais para pH 8,25, (-----) Π calculada para pH 8,25, $\circ$ valores experimentais para pH 9, (·-·-·-·-·-) Π calculada para pH 9, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$72

Figura 31: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992) em soluções de 0,1M e pH 5. $\diamond$ valores experimentais para NaH_2PO_4 , (·····) Π calculada para NaH_2PO_4 , $\circ$ valores experimentais para K_2SO_4 , (-----) Π calculada para K_2SO_4 , e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$73

Figura 32: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992) em soluções de 0,1M e pH 6. $\diamond$ valores experimentais para NaH_2PO_4 , (·····) Π calculada para NaH_2PO_4 , $\circ$ valores experimentais para K_2SO_4 , (-----) Π calculada para K_2SO_4 , e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$73

Figura 33: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes et al. (1992) em soluções de 0,1M e pH 8,25. $\diamond$ valores experimentais para NaH_2PO_4 , (·····) Π calculada para NaH_2PO_4 , $\circ$ valores experimentais para K_2SO_4 , (-----) Π calculada para K_2SO_4 , e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$74

Figura 34: Pressão osmótica para a BSA obtida por Alves et al. (2010), em soluções contendo 0,5% de PEG 2000. $\diamond$ valores experimentais para pH 4, (·····) Π calculada para pH 4, $\circ$ valores experimentais para pH 5, (-----) Π calculada para pH 5, $\square$ valores experimentais para pH 6, (·-·-·-·-·-) Π calculada para pH 6, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$76

Figura 35: Pressão osmótica para a BSA obtida por Alves et al. (2010), em soluções contendo 1% de PEG 2000. $\diamond$ valores experimentais para pH 4, (.....) Π calculada para pH 4, $\circ$ valores experimentais para pH 5, (-----) Π calculada para pH 5, $\square$ valores experimentais para pH 6, (-·-·-·-·-) Π calculada para pH 6, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$76

Figura 36: Pressão osmótica para a BSA obtida por Alves et al. (2010), em soluções contendo 2% de PEG 2000. $\diamond$ valores experimentais para pH 4, (.....) Π calculada para pH 4, $\circ$ valores experimentais para pH 5, (-----) Π calculada para pH 5, $\square$ valores experimentais para pH 6, (-·-·-·-·-) Π calculada para pH 6, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$77

Figura 37: Pressão osmótica para a BSA obtida por Alves et al. (2010), em soluções contendo PEG 2000 e pH 4. $\diamond$ valores experimentais para 0,5%, (.....) Π calculada para pH 0,5%, $\circ$ valores experimentais para 1%, (-----) Π calculada para 1%, $\square$ valores experimentais para 2%, (-·-·-·-·-) Π calculada para 2%, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$78

Figura 38: Pressão osmótica para a BSA obtida por Alves et al. (2010), em soluções contendo PEG 2000 e pH 5. $\diamond$ valores experimentais para 0,5%, (.....) Π calculada para pH 0,5%, $\circ$ valores experimentais para 1%, (-----) Π calculada para 1%, $\square$ valores experimentais para 2%, (-·-·-·-·-) Π calculada para 2%, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$78

Figura 39: Pressão osmótica para a BSA obtida por Alves et al. (2010), em soluções contendo PEG 2000 e pH 6. $\diamond$ valores experimentais para 0,5%, (.....) Π calculada para pH 0,5%, $\circ$ valores experimentais para 1%, (-----) Π calculada para 1%, $\square$ valores experimentais para 2%, (-·-·-·-·-) Π calculada para 2%, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$79

Figura 40: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu et al. (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,15M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,5, (.....) Π calculada para pH 4,5, $\circ$ valores experimentais para pH 4,8, (-----) Π calculada para pH 4,8, $\square$ valores experimentais para pH 5,4, (-·-·-·-·-) Π calculada para pH 5,4, * valores experimentais para pH 7,4, (-·-·-·-·-) Π calculada para pH 7,4 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$81

Figura 41: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu et al. (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,5M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,5, (.....) Π calculada para pH 4,5, $\circ$ valores experimentais para pH 4,8, (-----) Π calculada para pH 4,8, $\square$ valores experimentais para pH 5,4, (-·-·-·-·-) Π calculada para pH 5,4, * valores experimentais para pH 7,4, (-·-·-·-·-) Π calculada para pH 7,4 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$82

Figura 42: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu et al. (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,5, (.....) Π calculada para pH 4,5, $\circ$ valores experimentais para pH 4,8, (-----) Π calculada para pH 4,8, $\square$ valores experimentais para pH 5,4, (-·-·-·-·-) Π calculada para pH 5,4, * valores experimentais para pH 7,4, (-·-·-·-·-) Π calculada para pH 7,4 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$82

Figura 43: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu et al. (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1,5M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,5, (.....) Π calculada para pH 4,5, $\circ$ valores experimentais para pH 4,8, (-----) Π calculada para pH 4,8, $\square$ valores experimentais para pH 5,4, (-·-·-·-·-) Π calculada para pH 5,4, * valores experimentais para pH 7,4, (-·-·-·-·-) Π calculada para pH 7,4 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$83

Figura 44: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu et al. (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH 4,5. $\diamond$ valores experimentais para 0,15M, (.....) Π calculada para 0,15M, $\circ$ valores experimentais para 0,5M, (-

-----) Π calculada para 0,5M, $\square$ valores experimentais para 1,0M, (---
 -----) Π calculada para 1,0M, * valores experimentais para 1,5M, (---
 -----) Π calculada para 1,5M e (————) Π calculada
 desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$84

Figura 45: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu et al. (2009), em
 soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH 4,8. $\diamond$ valores experimentais para 0,15M,
 (.....) Π calculada para 0,15M, $\circ$ valores experimentais para 0,5M, (-
 -----) Π calculada para 0,5M, $\square$ valores experimentais para 1,0M, (---
 -----) Π calculada para 1,0M, * valores experimentais para 1,5M, (---
 -----) Π calculada para 1,5M e (————) Π calculada
 desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$84

Figura 46: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu et al. (2009), em
 soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH 5,4. $\diamond$ valores experimentais para 0,15M,
 (.....) Π calculada para 0,15M, $\circ$ valores experimentais para 0,5M, (-
 -----) Π calculada para 0,5M, $\square$ valores experimentais para 1,0M, (---
 -----) Π calculada para 1,0M, * valores experimentais para 1,5M, (---
 -----) Π calculada para 1,5M e (————) Π calculada
 desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$85

Figura 47: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu et al. (2009), em
 soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH 7,4. $\diamond$ valores experimentais para 0,15M,
 (.....) Π calculada para 0,15M, $\circ$ valores experimentais para 0,5M, (-
 -----) Π calculada para 0,5M, $\square$ valores experimentais para 1,0M, (---
 -----) Π calculada para 1,0M, * valores experimentais para 1,5M, (---
 -----) Π calculada para 1,5M e (————) Π calculada
 desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$85

Figura 48: Termo atrativo em função do pH para os dados obtidos por Lu et al.
 (2009) em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. $\diamond$ valores experimentais para
 0,15M, $\circ$ valores experimentais para 0,50M, $\square$ valores experimentais
 para 1,00M e * valores experimentais para 1,50M.86

Figura 49: Termo atrativo em função do pH para os dados obtidos por Lu et al.
 (2009) em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. $\diamond$ valores experimentais para pH

4,5, $\circ$ valores experimentais para pH 4,8, $\square$ valores experimentais para pH 5,4 e * valores experimentais para pH 7,487

Figura 50: Pressão osmótica para a BSA obtida por Wu et al. (1999) em soluções de NaCl a 1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 7,4, (.....) Π calculada para pH 7,4, $\circ$ valores experimentais para pH 4,5, (-----) Π calculada para pH 4,5, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$88

Figura 51: Pressão osmótica para a BSA obtida por Wu et al. (1999) em soluções de NaCl a 3M. $\diamond$ valores experimentais para pH 7,4, (.....) Π calculada para pH 7,4, $\circ$ valores experimentais para pH 5,4, (-----) Π calculada para pH 5,4, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$89

Figura 52: Pressão osmótica para a BSA obtida por Wu et al. (1999) em soluções de NaCl a 5M. $\diamond$ valores experimentais para pH 7,4, (.....) Π calculada para pH 7,4, $\circ$ valores experimentais para pH 5,4, (-----) Π calculada para pH 5,4, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$89

Figura 53: Pressão osmótica para a BSA obtida por Wu et al. (1999) em soluções de NaCl e pH 5,4. $\diamond$ valores experimentais para 3M, (.....) Π calculada para 3M, $\circ$ valores experimentais para 5M, (-----) Π calculada para 5M, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$90

Figura 54: Pressão osmótica para a BSA obtida por Wu et al. (1999), em soluções contendo PEG 2000 e pH 7,4. $\diamond$ valores experimentais para 1M, (.....) Π calculada para 1M, $\circ$ valores experimentais para 3M, (-----) Π calculada para 3M, $\square$ valores experimentais para 5M, (-----) Π calculada para 5M, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$91

Figura 55: Pressão osmótica para IgG obtida por Alves et al. (2011), em soluções contendo 0,9% de NaCl. $\diamond$ valores experimentais para pH 6, (.....) Π calculada para pH 6, $\square$ valores experimentais para pH 7, (-----)

(-----) Π calculada para 5%, $\square$ valores experimentais para 10%, (---
 - - - - -) Π calculada para 10%, e (————) Π calculada
 desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$96

Figura 61: Pressão osmótica para Lisozima obtida por Moon et al. (2000) em
 solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 1M e pH 8. $\diamond$ dados experimentais, (.....)
 Π calculada pela equação proposta, (-----) Π calculada para
 equação Virial e (————) Π calculada desconsiderando o termo
 atrativo, com $a = 0$97

Figura 62: Pressão osmótica para a α -quimotripsina obtida por Haynes et al.
 (1992), em soluções de NaH_2PO_4 em 0,1M e pH 9. $\diamond$ valores
 experimentais, (.....) Π calculada pela equação proposta, (-----)
 Π calculada para equação Virial e (————) Π calculada
 desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$97

Figura 63: Pressão osmótica a BSA obtida por Alves et al. (2010), em
 soluções contendo 2% de PEG 2000 e pH 5. $\diamond$ valores experimentais,
 (.....). Π calculada pela equação proposta, (-----) Π calculada
 para equação Virial e (————) Π calculada desconsiderando o termo
 atrativo, com $a = 0$98

Figura 64: Pressão osmótica a BSA obtida por Lu et al. (2009), em soluções
 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 0,5M e pH 7,4. $\diamond$ valores experimentais, (.....) Π
 calculada pela equação proposta, (-----) Π calculada para equação
 Virial e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com
 $a = 0$98

Figura 65: Pressão osmótica a BSA obtida por Wu et al. (1999) em soluções
 de NaCl em 3M e pH 5,4. $\diamond$ valores experimentais, (.....) Π calculada
 pela equação proposta, (-----) Π calculada para equação Virial e (—
 ———) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$99

Figura 66: Pressão osmótica a IgG obtida por Cruvinel et al. (2011) em
 soluções de NaCl em 5% e pH 7. $\diamond$ valores experimentais, (.....) Π
 calculada pela equação proposta, (-----) Π calculada para equação

Virial e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com
 $a = 0$99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Termo atrativo calculado para a lisozima. Dados experimentais obtidos a 25°C por Moon et al. (2000).	49
Tabela 2: Condições e termo atrativo para a α -quimotripsina. Dados experimentais obtidos a 25°C por Haynes et al. (1992).	63
Tabela 3: Condições e termo atrativo para a α -quimotripsina desconsiderando-se a ocorrência de dimerização. Dados experimentais obtidos a 25°C por Haynes et al. (1992).	69
Tabela 4: Condições e termo atrativo para a BSA em soluções poliméricas. Dados experimentais obtidos a 25°C por Alves et al. (2010).	75
Tabela 5: Condições e termo atrativo para a BSA em soluções contendo sulfato de amônio. Dados experimentais obtidos a 25°C por Lu et al. (2009).	80
Tabela 6: Condições e termo atrativo para a BSA em soluções contendo cloreto de sódio. Dados experimentais obtidos a 25°C por Wu et al. (1999).	87
Tabela 7: Condições e termo atrativo para a IgG humana em soluções poliméricas contendo NaCl. Dados experimentais obtidos a 25°C por Alves et al. (2010).	92

LISTA DE SÍMBOLOS

SÍMBOLOS LATINOS

a	parâmetro atrativo [$\text{Pa}\cdot\text{m}^6\cdot\text{mol}^{-2}$]
a_i	atividade do componente i
a_1	atividade do solvente
a_m	parâmetro atrativo do monômero [$\text{Pa}\cdot\text{m}^6\cdot\text{mol}^{-2}$]
a_d	parâmetro atrativo do dímero [$\text{Pa}\cdot\text{m}^6\cdot\text{mol}^{-2}$]
A_2 e A_3	constantes obtidas em função do número de carga do microíon,
b_1 e b_2	coeficiente do potencial de Asakuara Oosawa
B_{22}	segundo coeficiente virial [$\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$]
B_{222}	terceiro coeficiente virial [$\text{m}^6\cdot\text{mol}^{-2}$]
c	concentração mássica da proteína [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ou $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]
d	número de densidade [$\text{moléculas}\cdot\text{cm}^{-3}$]
d_i	diâmetro do segmento da proteína em função da temperatura
κ	parâmetro relativo a forças de atração
k	constante de Boltzmann [$1,381\cdot 10^{-23} \text{ m}^2\cdot\text{kg}\cdot\text{s}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$]
m_p	massa da proteína [g]
m_s	concentração molar do sal [$\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$]
M	função de parâmetros adimensionais que relaciona as interações entre duas partículas e o tamanho da molécula
M_w	massa molar da proteína [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ou $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$]
$\bar{M}_w$	massa molar aparente [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]

$M_{W_{mon}}$	massa molar do monômero [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]
n	velocidade de decaimento do potencial
n_d	número de mols do dímero [mol]
n_m	número de mols do monômero [mol]
n_1	número de mols de solvente [mol]
n_2	número de mols de soluto ou proteína [mol]
N_A	número de Avogrado [$6,022\cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$]
q	grau de dimerização
P	pressão absoluta [Pa]
P_1	pressão do solvente puro [Pa]
r	distância entre duas moléculas de centro a centro [m]
r_a	raio da proteína [m]
r_i	número de segmentos da proteína
R	constante dos gases [$8,314 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$]
T	temperatura [K]
T_c	temperatura crítica [K]
V	volume total [m^3]
V_1	volume molar do solvente [$\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$]
$\bar{V}_1$	volume parcial molar do solvente [$\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$]
V_2	volume molar da proteína [$\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$]
x_1	fração molar do solvente
x_2	fração molar do soluto
y	função de parâmetros adimensionais Π/P_1
y_i	fração molar do componente

y_d	fração molar do dímero
y_m	fração molar do monômero
Z	número de carga do macroíon
Z^{hs}	fator de compressibilidades de esfera rígida
Z_1	relaciona a pressão com a temperatura

SÍMBOLOS GREGOS

γ_i	coeficiente de atividade do componente i
δ	razão do tamanho da partícula e do polímero
ε	energia máxima de atração
η	fator de empacotamento [$\text{m} \cdot \text{mol}^{-1}$]
η_{cp}	o maior valor para o fator de empacotamento [$\text{m} \cdot \text{mol}^{-1}$]
η_P	fator de empacotamento com densidade ρ_P [$\text{m} \cdot \text{mol}^{-1}$]
θ_i	representação genérica para componentes que estão relacionados à composição do componente i
μ	potencial de interação intermolecular [$\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$]
μ^P	potencial de perturbação [$\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$]
μ^Y	potencial de Yukawa [$\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$]
μ^{AO}	potencial de Asakura-Oosawa (AO) [$\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$]
μ_{hs}	potencial repulsivo referente ao termo das esferas rígidas [$\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$]
μ_{qq}	potencial referente às interações repulsivas eletrostáticas carga – carga (Debye-Hückel) [$\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$]

μ_{qu} potencial referente às interações atrativas carga – dipolo (Debye-Hückel) [J·K⁻¹]

μ_{uu} potencial referente às interações atrativas dipolo – dipolo (Debye-Hückel) [J·K⁻¹]

μ_{disp} potencial referente a dispersão de Hamaker [J·K⁻¹]

μ_{OA} componente osmótico do potencial de força média [J·K⁻¹]

μ_1 potencial químico do solvente [J·mol⁻¹]

μ_1^0 potencial químico do solvente puro [J·mol⁻¹]

ξ_k auxiliar de equação

ρ densidade molar do soluto [mol·m⁻³]

ρ_{ap} densidade aparente [mol·m⁻³]

ρ_c densidade molar do componente [mol·m⁻³]

σ diâmetro da esfera rígida [m³]

σ_P diâmetro de giração do polímero [m³]

Π pressão osmótica [Pa]

Π^{exp} pressão osmótica experimental [Pa]

Π^{hs} pressão osmótica de esfera rígida [Pa]

Π^V pressão osmótica segundo a equação do virial [Pa]

LISTA DE ABREVIações

BSA Albumina de Soro Bovino

DLVO Teoria de Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO)

FCC Estrutura cúbica de fase centrada

FO Função objetivo

IgG Imunoglobulina G

MSA Aproximação esférica média

PEG Polietileno glicol

RPA Aproximação de fase randômica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
1.1	PRESSÃO OSMÓTICA	26
2	OBJETIVO	32
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1	TERMODINÂMICA MOLECULAR	33
3.2	MODELOS PROPOSTOS PARA PRESSÃO OSMÓTICA DE SOLUÇÕES PROTEICAS	35
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	43
4.1	EQUAÇÃO VIRIAL	45
4.2	DIMERIZAÇÃO	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	LISOZIMA	49
5.2	α -QUIMOTRIPSINA.....	61
5.3	ALBUMINA DE SORO BOVINO	74
5.4	IMUNOGLOBULINA G.....	91
5.5	COMPARAÇÃO DO MODELO COM A EQUAÇÃO VIRIAL	96
6	CONCLUSÃO	101
6.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	102
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

1 INTRODUÇÃO

O estudo de processos de recuperação e purificação de proteínas em solução é de grande importância para as indústrias de transformação biotecnológica, uma vez que esses processos são complexos e os custos a eles associados são altos. Mireles *et al.* (2008) ressaltam que a dificuldade associada a esses processos é resultante do fato de propriedades (como tamanho da cadeia e carga líquida) do produto requerido – a proteína alvo em solução – serem muito próximas das propriedades das demais proteínas presentes no meio. Ademais, é necessário que estes processos sejam suficientemente brandos de modo a que não comprometam a manutenção da atividade biológica.

Nos processos de separação em escala industrial, a proteína usualmente se encontra em solução aquosa com outros contaminantes. A pressão osmótica é uma das propriedades termodinâmicas que permite a avaliação da não-idealidade (em sentido termodinâmico) de uma proteína em solução, permitindo que se relacionem as interações entre as moléculas, por meio do potencial químico. O cálculo da pressão osmótica pode aparecer como etapa do cálculo do equilíbrio de fases: a igualdade de pressões osmóticas pode ser usada como condição de equilíbrio de fases, uma vez que se relaciona diretamente ao potencial químico do solvente.

1.1 PRESSÃO OSMÓTICA

Considere-se inicialmente o fenômeno físico da osmose: um sistema, conforme representado na Figura 1, contendo uma solução (exemplo, solvente e soluto) é separado do solvente puro por uma membrana permeável apenas para o solvente. A pressão osmótica é definida por Smith *et al.* (2000), como a diferença de pressão (Π) que faria com que esses dois sistemas se mantivessem em equilíbrio termodinâmico.

Figura 1: Sistema com dois compartimentos separados por membrana semipermeável, sendo que em um dos compartimentos há solvente mais soluto e no outro apenas solvente em equilíbrio termodinâmico.

A pressão osmótica relaciona-se ao potencial químico do solvente em solução (identificado pelo subscrito 1) conforme a equação (1) seguinte:

$$\mu_1(T, P) - \mu_1(T, P + \Pi, \theta) = RT \ln a_1(T, P + \Pi, \theta) = - \int_P^{P+\Pi} \bar{V}_1 dP \quad (1)$$

em que $\mu_1 = \mu_1(T, P + \Pi, \theta)$ é o potencial químico do solvente em uma solução proteica cuja composição é θ , em função da temperatura T , pressão absoluta P ; $\mu_1^0(T, P)$ é o potencial químico do solvente puro em função da temperatura e pressão, cuja composição da proteína é nula e $\bar{V}_1$ é o volume parcial molar do solvente. Para sistemas incompressíveis, em que o volume molar do solvente $\bar{V}_1$ seja constante em relação à pressão e à composição, a equação (1) pode ser escrita simplificada como:

$$\Pi = - \frac{RT}{V_1} \ln a_1 \quad (2)$$

em que a_1 é a atividade do solvente (em T , $P + \Pi$ e composição θ , calculada com referência ao solvente puro nas mesmas T e P), R é a constante dos gases e V_1 é o volume molar do solvente puro. De maneira geral a atividade não é considerada função da pressão.

A relação entre pressão osmótica e atividade de solvente dada pela equação anterior faz com que ela seja importante na definição de estados de equilíbrio termodinâmico. Assim, um estado de equilíbrio em que uma proteína se distribua em duas fases (α e β) pode ser definido pelas equações:

$$T^\alpha = T^\beta \quad (3)$$

$$\Pi^\alpha = \Pi^\beta \quad (4)$$

$$\mu_2^\alpha = \mu_2^\beta \quad (5)$$

em que μ_2 é o potencial químico do soluto (proteína). Desse modo, além da importância em si do fenômeno da osmose, a pressão osmótica também é importante na descrição de estados de equilíbrio de soluções proteicas.

A atividade é definida pela equação seguinte:

$$a_i(T, P, \theta) = \gamma_i(T, P, \theta)\theta_i \quad (6)$$

em que a_i é a atividade do componente i em função da temperatura, pressão e da concentração θ_i do componente i (por exemplo, fração mássica, fração molar, densidade), e γ_i é o coeficiente de atividade do componente i . Em soluções ideais, a atividade é igual à fração molar do componente. A mesma igualdade entre atividade e fração molar também é encontrada na situação em que a concentração do soluto é pequena; nesse caso, a atividade do solvente torna-se próxima a sua fração molar. Assim, a equação (2) pode ser reescrita na forma da equação (7) seguinte:

$$\Pi = -\frac{RT}{V_1} \ln x_1 \quad (7)$$

em que x_1 é a fração molar do solvente. Nessas circunstâncias, a fração molar do soluto, x_2 , é muito menor que a unidade (ou seja, x_1 é aproximadamente 1). Também nestas condições o número total de mols é praticamente igual ao número de mols do solvente, e o volume molar da solução é próximo ao volume molar do solvente. Desse modo, algumas simplificações podem ser introduzidas:

$$\ln x_1 \cong x_1 - 1 = -x_2 \cong -\frac{n_2}{n_1} \quad (8)$$

em que n_1 é o número de mols de solvente e n_2 , de soluto, de modo que a equação (7) pode ser reescrita como:

$$\Pi = \frac{RT}{V_1} \frac{n_2}{n_1} = RT\rho \quad (9)$$

em que ρ é densidade molar do soluto (proteína).

Entretanto, a equação anterior não fornece bons resultados para a predição da pressão osmótica de soluções proteicas, como é possível observar na Figura 2, na qual se comparam a pressão osmótica obtida a partir desta equação e os dados experimentais para pressão osmótica da α -quimotripsina (Haynes *et al.*, 1992).

Figura 2: $\diamond$ Dados experimentais para pressão osmótica da α -quimotripsina obtidos por Haynes *et al.* (1992), em solução 0,1M de dihidrogenofosfato de sódio e pH 9 e (—) pressão osmótica obtida a partir da equação ideal, equação (9).

A diferença entre a pressão osmótica calculada a da suposição $a_1 = x_1$ e os dados experimentais mostra a importância de se desenvolverem equações osmóticas de estado para o cálculo correto desta grandeza.

Uma abordagem possível para o cálculo mais correto da pressão osmótica é o uso de expansões viriais. Uma expansão virial é fundamentalmente uma expansão em série de Taylor da pressão osmótica em função da concentração de soluto. Sendo c a concentração de proteína (expressa em massa por volume), a expansão virial osmótica escreve-se:

$$\frac{\Pi}{cRT} = \frac{1}{M_w} + B_{22}c + B_{222}c^2 \dots \quad (10)$$

em que M_w é a massa molar da proteína, B_{22} é o segundo coeficiente virial osmótico, B_{222} é o terceiro coeficiente, e assim sucessivamente.

McMillan e Mayer (1945) mostraram que as mesmas relações que se aplicam à pressão de um gás são aplicáveis à pressão osmótica gerada pela presença de um soluto em solução. Desse modo, é possível relacionar o segundo coeficiente osmótico ao potencial de interação conforme a equação seguinte (Prausnitz, 2003):

$$B_{22} = -2\pi N_A \int_0^\infty \left[e^{\left(-\frac{\mu(r)}{kT} \right)} - 1 \right] r^2 dr \quad (11)$$

em que N_A é número de Avogadro, k é a constante de Boltzmann, r é distância entre duas moléculas (de centro a centro) e $\mu(r)$ é o potencial de interação intermolecular. Esta equação mostra o relacionamento entre a pressão osmótica e o potencial de interação intermolecular. Deve-se notar, entretanto, que o valor de B_{22} está relacionado à integral do membro direito; dessa maneira, não é possível, apenas a partir do valor do coeficiente virial, obter expressões para o potencial de interação – pelo contrário, pode-se pensar em diferentes expressões que gerem um mesmo valor em uma mesma condição. Como um exemplo da influência do potencial de interação, como B_{22} está relacionado às interações moleculares, é possível estabelecer uma correlação entre seu valor e as condições em que ocorre a cristalização de uma proteína (George e Wilson, 1994). Segundo Prausnitz (2003), para a formação de cristais de proteínas as moléculas devem estar corretamente orientadas, pois caso não estejam, como as forças atrativas são muito fortes, há a formação de aglomerados de partículas amorfas. Por outro lado se as forças atrativas não existirem não há formação de precipitado. Logo, para que ocorra a cristalização, o segundo coeficiente do virial deve possuir um valor negativo, mas não excessivamente negativo, pois quando este valor é muito baixo há a formação de cristais amorfos.

Termos de ordem superior, como o terceiro coeficiente B_{222} , são usualmente desprezados, pela escassez de informação experimental.

Este trabalho visa a desenvolver um modelo que represente a pressão osmótica, estudando especificamente o relacionamento de equações osmóticas de estado com dados experimentais de pressão osmótica de proteínas. Para isso,

apresenta-se inicialmente uma revisão bibliográfica a respeito de equações osmóticas de estado, expondo-se a seguir a fundamentação teórica do modelo utilizado, aplicando-se as equações desenvolvidas para o cálculo do equilíbrio osmótico de lisozima, α -quimotripsina, albumina de soro bovino e imunoglobulina-G pela adição de sais como co-solventes, e também para a albumina do soro bovino utilizando como co-solvente o polietileno glicol.

2 OBJETIVO

O objetivo do trabalho é estudar a correspondência entre modelos de equações osmóticas de estado com dados experimentais de pressão osmótica de soluções proteicas, e desenvolver um modelo adequado à correlação de dados experimentais de pressão osmótica em faixas de concentração usualmente encontradas em processos de purificação e recuperação de proteínas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Encontram-se na literatura vários trabalhos focados no estudo da modelagem termodinâmica para a descrição do comportamento de soluções proteicas. Como dito anteriormente, esta modelagem pode ser de grande importância no projeto de processos de separação na indústria de transformação biotecnológica.

Para desenvolver métodos quantitativos que descrevam o equilíbrio de fase em soluções aquosas proteicas são necessários dois tipos de informação. Inicialmente, são requeridas relações termodinâmicas que apresentem o potencial químico da proteína em função das propriedades de estado, como temperatura, concentração de proteína e de outras espécies presentes na solução, e pH (pois a carga elétrica da proteína, resultante de múltiplos estados de ionização dos resíduos dos aminoácidos depende fortemente do pH da solução). Além disso, necessita-se também de uma expressão quantitativa que descreva as forças intermoleculares. Estas forças estão relacionadas à termodinâmica molecular desses sistemas, sendo importantes para se conhecer como as moléculas de proteínas se aglomeram na formação de uma fase sólida, por exemplo (Prausnitz, 2003).

3.1 TERMODINÂMICA MOLECULAR

Ao potencial de interação entre duas moléculas chama-se potencial de força média. Usualmente, o potencial de força média pode ser decomposto em várias componentes, e esta decomposição pode ser feita de várias maneiras. Por exemplo, Yokozeki (2006) descreveu o potencial de força média conforme a equação seguinte:

$$\mu(r) = \mu_{disp} + \mu_{qq} + \mu_{qu} + \mu_{uu} + \mu_{OA} \quad (12)$$

em que μ_{disp} representa o potencial dispersivo de Hamaker, μ_{qq} as interações repulsivas carga–carga, μ_{qu} as interações atrativas carga–dipolo, μ_{uu} interações atrativas dipolo–dipolo, e μ_{OA} , o componente osmótico do potencial de força média.

Prausnitz (2003) apresenta também uma expressão para o potencial de força média, considerando as forças atrativas entre duas moléculas (esféricas e simétricas

por hipótese), incluindo a distribuição da carga de uma molécula de proteína e o momento dipolar:

$$\mu(r) = \mu_{hs} + \mu_{qq} + \mu_{qu} + \mu_{uu} + \mu_{disp} \quad (13)$$

em que μ_{hs} representa o potencial repulsivo referente ao termo das esferas rígidas, e μ_{disp} , a dispersão atrativa baseada na teoria de Hamaker, usualmente desprezada devido à sua pequena contribuição.

Fornasiero *et al.* (1999) salientaram em seu trabalho a importância de informações referentes às forças intermoleculares para a obtenção do diagrama de fase de soluções proteicas. Estes autores utilizaram expressões distintas para as fases líquida e sólida, e a função potencial utilizada para as duas fases em equilíbrio foi:

$$\mu(r) = \infty \quad r < \sigma \quad (14)$$

$$\mu(r) = -\varepsilon \left(\frac{\sigma}{r} \right)^n \quad r \geq \sigma \quad n > 3 \quad (15)$$

em que σ é o diâmetro da esfera rígida, ε é o parâmetro atrativo (energia máxima de interação) e n o parâmetro de decaimento do potencial. Para a modelagem da fase sólida, é necessário incluir o número de coordenação e a distância média intermolecular, dados por $\tilde{R} = d^{1/3}$, sendo $d = \eta / \eta_{cp}$, η fator de empacotamento e η_{cp} o maior valor para o fator de empacotamento.

Fu *et al.* (2001), salientaram a importância das interações moleculares partindo das expressões do potencial de Yukawa e de Asakura-Oosawa para calcular o diagrama de fases de sistemas coloidais. O potencial de Yukawa é dado pela seguinte equação:

$$\mu^Y(r) = \begin{cases} \infty, & r < \sigma \\ -\varepsilon \frac{\exp[-\kappa(r - \sigma)]}{r/\sigma}, & r \geq \sigma \end{cases} \quad (16)$$

em que κ define as forças de atração. E o potencial de Asakura Oosawa, é representado pela equação:

$$\mu^{AO}(r) = \begin{cases} -\eta_p kT \left(\frac{1+\delta}{\delta} \right)^3 \left[1 - b_1 \left(\frac{r}{\sigma} \right) + b_2 \left(\frac{r}{\sigma} \right)^3 \right], & \sigma \leq r < \sigma_p \\ 0, & r \geq \sigma + \sigma_p \end{cases} \quad (17)$$

em que σ_p é o diâmetro de giração do polímero, $\delta = \sigma/\sigma_p$ é a razão do tamanho da partícula e do polímero e $\eta_p = \pi\sigma_p\rho_p/6$ é o fator de empacotamento. Os coeficientes b_1 e b_2 são dados respectivamente, por $b_1 = 1,5/(1+\delta)$ e $b_2 = 0,5/(1+\delta)^3$. De acordo com este potencial, o alcance das atrações deve ser controlado pelo fator de empacotamento. O mesmo modelo é usualmente empregado na descrição de dispersões coloidais de polímeros.

Tavares e Prausnitz (2004) enfatizaram a termodinâmica molecular na obtenção do diagrama de fase de soluções proteicas, considerando a teoria de perturbação. Usando como referência uma solução de esferas rígidas, onde o potencial de força média foi dado pela equação a seguir:

$$\begin{aligned} \mu(r) &= \infty & r < \sigma \\ \mu(r) &= \mu^P & r \geq \sigma \end{aligned} \quad (18)$$

em que μ^P é o potencial de perturbação.

3.2 MODELOS PROPOSTOS PARA PRESSÃO OSMÓTICA DE SOLUÇÕES PROTEICAS

Na descrição da pressão osmótica de soluções proteicas, normalmente faz-se uso da equação virial. Para isso há uma razão prática (como a maioria dos dados experimentais refere-se a soluções relativamente diluídas, a equação virial é suficiente para a correlação dos dados) e uma razão teórica (a equação virial permite o relacionamento entre o potencial de força média com uma grandeza mensurável). Recorde-se que o relacionamento entre o segundo coeficiente osmótico e o potencial de força média é dado pela equação (11):

$$B_{22} = -2\pi N_A \int_0^\infty \left[e^{\left(\frac{\mu(r)}{kT} \right)} - 1 \right] r^2 dr \quad (11)$$

Entretanto, a equação virial não é a única equação utilizada nesta modelagem – outras equações, e variantes da equação virial, também são encontradas. Assim, Vilker *et al.* (1982), representaram o equilíbrio termodinâmico de soluções proteicas propondo dois modelos, nos quais consideraram as formas e o tamanho das partículas, e são de algum modo variantes da equação virial. O primeiro modelo apresentado pelos autores é uma equação virial modificada para incluir o efeito de carga por meio da contribuição de Donnan (referente à da distribuição desigual de íons em fases líquidas em equilíbrio osmótico):

$$\Pi = RT \left\{ 2 \left[\left(\frac{Zc}{2M_w} \right)^2 + m_s^2 \right]^{1/2} - 2m_s \right\} + \frac{RT}{M_w} [c + A_2 c^2 + A_3 c^3] \quad (19)$$

em que m_s é a concentração molar do sal, Z é a carga do macroíon e as constantes A_2 e A_3 são coeficientes semelhantes aos viriais. Nesta equação, o termo entre chaves representa o efeito Donnan e o segundo termo, representa a não-idealidade decorrente das atrações entre macro e micro íons.

A segunda equação proposta pelos autores é uma equação virial modificada:

$$\frac{\Pi}{kT} = d + B_{22}d^2 + B_{222}d^3 + \dots \quad (20)$$

em que o número de densidade d é relacionado à concentração mássica pela equação seguinte:

$$d = \frac{N_A c}{10^3 M_w} \quad (21)$$

Comparando os modelos propostos com soluções de albumina de soro bovino (BSA), os autores concluíram que a melhor modelagem foi obtida a partir da equação que considera o efeito de Donnan, e que o volume excluído fornece a contribuição mais significativa na estimativa do segundo e do terceiro coeficientes viriais. Eles verificaram que as contribuições eletrostática e indutiva são válidas somente para grandes distâncias intermoleculares, e que os valores para as constantes de Hamaker eram incertos, sendo provavelmente os valores calculados superestimados. Finalmente, a consideração de uma distribuição de cargas uniformes pode ter mascarado as orientações preferenciais entre as moléculas de BSA e o aumento das interações eletrostáticas. Os autores também avaliaram as

contribuições atrativas, baseadas em aproximação das interações tipo van der Waals entre dois corpos. Porém os autores concluíram que as contribuições repulsivas devem ser maiores que as consideradas e devem ter maior dependência da carga elétrica do que o estimado em seus estudos.

Assim como Vilker, Haynes *et al.* (1992), estudaram o comportamento osmótico de soluções proteicas concentradas partindo da teoria de McMillan e Mayer, com coeficientes viriais osmóticos calculados a partir da correlação da pressão osmótica com a expressão do potencial intermolecular, equações (1), (10) e (11), e a partir de equações que representavam a contribuição de cada interação intermolecular para a força potencial média. Como premissa os autores assumiram uma simetria esférica para as contribuições da força potencial, embora estudos de cristalografia de raio X mostrem que as moléculas de α -quimotripsina, proteína estudada, não são perfeitamente esféricas. Os autores também consideraram o solvente como sendo um meio dielétrico contínuo, ignorando os efeitos específicos do solvente, além de obter a constante de Hamaker. De acordo com os resultados obtidos, os autores verificaram que as equações propostas para as principais contribuições da força potencial eram muito simples para representar as interações intermoleculares. Verificaram também que a presença de dímeros e outros oligômeros maiores de α -quimotripsina aumentava à medida que o pH tendia ao ponto isoelétrico da proteína, e que a simplicidade da teoria de Hamaker é insuficiente para descrever as forças dispersivas entre as proteínas em solução.

Yousef *et al.* (1998a) estudaram a pressão osmótica de soluções de imunoglobulina G (IgG). Os autores utilizaram um modelo de hidratação, ou seja, um modelo que considera a ligação de moléculas de solvente e soluto, e que calcula a pressão osmótica considerando a fração molar de solvente livre (isto é, não ligada a moléculas de soluto). Como o modelo foi utilizado para o estudo de soluções com concentração de sal moderada, o efeito de Donnan foi desprezado. Em comparação com dados experimentais de soluções IgG, em diferentes concentrações, o modelo forneceu bons resultados mesmo para altas concentrações de proteína. Nessa aplicação o número de moléculas de água na camada de hidratação foi considerado constante independente da concentração. Os resultados também mostraram que as macromoléculas hidratadas têm forças atrativas entre si minimizadas em altas concentrações.

Os mesmos autores, Yousef *et al.* (1998b), aplicaram o mesmo modelo no estudo de dados da albumina do soro bovino, BSA, obtidos por Vilker *et al.* (1982). Os resultados mostraram boa aproximação para todas as concentrações de BSA e para todos os valores de pH, mostrando que a não-idealidade observada na pressão osmótica pode ser devida à hidratação e a interações iônicas.

Fornasiero *et al.* (1999) utilizaram expressões distintas para as fases líquida e sólida, e as equações foram desenvolvidas em função de parâmetros adimensionais. Para ambas as fases fez-se uso do modelo de van der Waals, inserindo o termo de esferas rígidas e considerando o potencial de força média apresentada nas equações 14 e 15.

Os autores também obtiveram o segundo coeficiente virial osmótico representado pela equação seguinte

$$B_{22} = \frac{2\pi\sigma^3}{3} \left[1 - 3\alpha \frac{T_c}{T} \right] \quad (22)$$

em que α é uma constante igual a 0,8834, segundo Fornasiero, e T_c é a temperatura crítica [K].

Fornasiero *et al.* (1999) mostraram que o alcance das interações atrativas decai com o aumento de n , ou seja, as forças intermoleculares atrativas estão relacionadas ao expoente n do inverso da função potencial. Este modelo prediz a separação fluido-fluido em altas concentrações proteicas, mesmo no caso em que essa transição seja metaestável, respeitando termodinamicamente a transição de estado fluido-sólido. Estados metaestáveis são estados de equilíbrio que não correspondem ao equilíbrio mais estável. Por razões cinéticas, no estudo de soluções proteicas, estados metaestáveis muitas vezes são erroneamente confundidos com estados de equilíbrio estável.

Moon *et al.* (2000) também abordaram as interações intermoleculares no estudo de pressões osmóticas de soluções proteicas. Como premissa, e coerentemente com a teoria de McMillan e Mayer, os autores não consideraram em seus estudos o sal como um componente da solução, considerando-se a proteína como soluto e a solução salina como solvente. Moon *et al.* (2000) realizaram experimentos com soluções de lisozima em diferentes concentrações, utilizando três tipos de sais de amônio – oxalato, sulfato e fosfato de amônio – em diferentes

valores de pH. Com base nos experimentos foi possível observar que o aumento da concentração de sal causou um decréscimo do volume livre disponível para a proteína. Isso leva ao aumento observado nas interações intermoleculares, que foi considerado no modelo pelo potencial de atração osmótica. Os autores verificaram que a constante de Hamaker calculada depende da concentração de sal. Esta dependência se mostrou menor para soluções com concentrações de sal maiores. Apesar de o oxalato de amônia ser um sal orgânico, as pressões osmóticas da solução com este sal, comparadas às obtidas pelo sulfato de amônia e pelo fosfato de amônia, não desestabilizaram a lisozima. Para os três sais de amônia, o íon mostrou pouca influência sobre o segundo coeficiente virial da lisozima.

Wu *et al.* (1999) propuseram dois modelos a partir da equação de van der Waals. Em ambas as equações foram consideradas o efeito de Donnan em soluções eletrolíticas, a equação de Carnahan-Starling, a dispersão e interações eletrostáticas, essas duas últimas pela aproximação da teoria DLVO. No primeiro modelo o potencial de DLVO foi considerado em conjunto com contribuições de perturbação do segundo coeficiente virial, e no segundo modelo, considerou-se a aproximação de fase aleatória (RPA). Como premissas de trabalho, Wu *et al.* (1999) assumiram que o valor da carga proteica independe da concentração de sal e que há uma distância mínima entre as superfícies de duas proteínas (devido ao fato do potencial de dispersão divergir quando duas moléculas estão em contato). Essa distância é um parâmetro ajustável que pode ser interpretado como o diâmetro médio dos átomos sobre a superfície da proteína. Os autores observaram que geralmente a pressão osmótica decresce à medida aumenta a concentração de sal na solução, devido do aumento do “screening” da repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína, ou seja, a diminuição da força eletrostática entre dois íons ocasionada pela presença de uma grande quantidade de cargas entre eles. Os autores observaram também que o efeito de Donnan é desprezível quando a concentração de sal é muito alta ou quando a concentração de proteína é baixa, pois o “solvente” em ambos os lados do osmômetro utilizado no experimento realizado pelos autores tornaram-se idênticos. Das duas equações estudadas por Wu *et al.* (1999), apesar de ambos modelos descrever semi - quantitativamente a pressão osmótica para a BSA, o modelo em que se utilizou o potencial de DLVO é ligeiramente melhor do que o modelo que considerou a teoria da RPA, apesar de

nenhum dos modelos propostos fornecer bons resultados para altas concentrações de sal.

Fu *et al.* (2001), conforme mencionado anteriormente, partindo das expressões do potencial de Yukawa e de Asakura-Oosawa, equações 16 e 17 respectivamente, calcularam o diagrama de fases de sistemas coloidais. Eles mostraram que o segundo coeficiente virial, bem como o ponto crítico da transição fluido-fluido, varia de acordo com o alcance das interações atrativas, e que a formação de gel normalmente ocorre devida a atrações de curto alcance. Neste trabalho foi levado em conta o termo de esferas rígidas e uma variação da aproximação esférica média (MSA), que resulta em uma expressão analítica para a equação de estado assim como para a função da distribuição radial.

Os autores utilizaram a teoria da normalização de grupos para corrigir as flutuações de longo alcance próximo ao ponto crítico. Para a fase cristalina (sólida) foi utilizada a função de distribuição radial tanto para o modelo de Yukawa enquanto para Asakura-Oosawa, calculada a partir da estrutura cúbica de face centrada (FCC). Fu *et al.* (2001) também consideraram a teoria da percolação para determinar o potencial de formação de gel. A principal premissa desta teoria é que as atrações de longo alcance entre as partículas coloidais têm efeito mínimo na percolação, e que a fronteira para a formação de gel é dada por um parâmetro que representa as atrações de curto alcance. Os autores concluíram que as interações na fase gel e na transição de fases do equilíbrio dependem do range de interações e do perfil potencial.

Ainda no campo de modelos relacionados à teoria de McMillan e Mayer, Tavares e Prausnitz (2004), para obter o diagrama de fase de soluções proteicas, consideraram a teoria de perturbação, cujo potencia de força média é dado na equação 18.

Três abordagens foram utilizadas para calcular a contribuição do potencial de perturbação tanto para a fase fluida quanto para o sólido. Para a fase fluida utilizaram-se a aproximação randômica (RPA) e os termos de perturbação de primeira e a de segunda ordem de Barker-Henderson. Para a fase sólida utilizaram-se a teoria de van der Waals e também os termos de primeira e segunda ordem de Barker-Henderson. As interações moleculares utilizadas foram consideradas no potencial químico, mais especificamente no termo de perturbação, sendo utilizado

no cálculo deste termo o potencial de Yukawa. Comparando com a simulação molecular, a teoria da perturbação de segunda ordem de Barker-Henderson, quando utilizada tanto para fase fluida quanto para fase sólida, apresentou bons resultados, ao contrário da teoria da aproximação randômica (RPA) para descrever o estado fluido e o simples modelo de van der Waals para sólido.

Embora não relacionado diretamente ao estudo de soluções proteicas, deve-se mencionar o trabalho de Yokoseki (2006), que estudou o equilíbrio termodinâmico a partir da pressão osmótica partindo de equações simplificadas de estado. Em seu trabalho, o autor propôs uma equação adimensional, da qual se obteve a pressão reduzida no equilíbrio, considerando uma solução com um soluto (2) diluído em um solvente (1).

$$\ln y - Z_1(Mx_2^2 - 1)y + \ln x_1 - Z_1 = 0 \quad (23)$$

Em que y é uma função de parâmetros adimensionais Π/P_1 , onde P_1 é a pressão do solvente puro. M , na equação anterior, é uma função de parâmetros adimensionais que relaciona as interações entre duas partículas e o tamanho da molécula, e Z_1 relaciona a pressão com a temperatura, de acordo com as condições ao qual o sistema é submetido, em transformações isotérmicas ou isobáricas. O modelo proposto por Yokoseki (2006) apresentou resultados interessantes: ele obteve dois valores para a pressão osmótica partindo de uma mesma concentração, sendo um valor para casos em que se utiliza a pressão da solução bem acima da pressão do componente puro (maior valor da pressão osmótica obtida para uma mesma concentração) e outro (menor valor) no caso em que a pressão da solução é bem inferior. Este modelo também descreveu o comportamento de dados experimentais obtidos por diversos autores (Moore (1972), Vilker et. al. (1981), Moon et. al. (2000), Wu et. al. (1999)), enquanto que os modelos partindo de ajustes experimentais limitam-se apenas aos valores estudados. Para descrever a pressão osmótica em soluções eletrolíticas de proteínas, Yokoseki (2006) considerou o efeito do pH, incluindo no parâmetro M a dependência do pH, o que fornece também bons resultados.

O autor mostrou que, quando confrontados com dados experimentais, mesmo modelos simples podem fornecer resultados adequados. É importante lembrar, entre outras coisas, que dados experimentais estão sujeitos a desvios, e que modelos

termodinâmicos estão limitados à acurácia dos dados. Essa conclusão estimula a que se desenvolva uma metodologia para o relacionamento de dados experimentais pressão osmótica de proteínas que seja diretamente aplicável e cujos parâmetros sejam facilmente relacionáveis a propriedades do sistema e condições de processo (como concentração de co-solventes).

Lima et. al. (2007), desenvolveram uma equação modificada de Poisson-Boltzmann para representar as interações entre as moléculas de proteína, no qual consideraram duas proteínas globulares usando coordenadas bi-esféricas, em diferentes condições. Os autores analisaram as interações entre as moléculas de lisozima em diferentes concentrações salinas, diferentes valores de pH e em soluções com diferentes sais. Como premissa, desprezaram o momento dipolar das proteínas e o efeito da correlação dos íons e de volume excluído, fatores que devem ser importantes em altas concentrações de sal. Como resultado, os autores observaram que as interações se tornam mais atrativas à medida que aumenta a polarização dos íons, e que a equação resultante pode representar quantitativamente o segundo coeficiente do virial, mesmo para altas concentrações. Os autores também calcularam o diagrama de fases usando a teoria da perturbação de primeira ordem com a premissa que, na faixa de temperaturas estudadas, a força potencial média independe da temperatura e da concentração de proteína. Em resumo, Lima et. al. (2007), mostraram a importância de usar o potencial de dispersão iônica agindo entre os íons de proteína, que é possível obter uma predição do segundo coeficiente osmótico do virial sem ajustar nenhum parâmetro, e que a adição de íons mais polarizados leva à cristalização da proteína em concentrações menores de sal, quando comparado à presença de íons menos polarizados.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

No desenvolvimento deste trabalho, optou-se por utilizar uma equação de estado para a obtenção da pressão osmótica, na qual a contribuição das interações repulsivas é obtida pelo termo de esferas rígidas equação de Carnahan-Starling e a contribuição atrativa pelo termo atrativo de van der Waals, conceitualmente equivalente à aproximação RPA.

$$\Pi = RT\rho \frac{1 + \eta\rho + \eta^2\rho^2 - \eta^3\rho^3}{(1 - \eta\rho)^3} - a\rho^2 \quad (24)$$

em a é o parâmetro atrativo e η é o fator de empacotamento de Fornasiero, representado pela equação seguinte:

$$\eta = \frac{4\pi r_a^3}{3} N_A \quad (25)$$

em que r_a é raio da proteína e N_A é o número de Avogadro. A opção por um termo repulsivo mais exato e por um termo atrativo aproximado deve-se fundamentalmente ao fato de que atenção maior será dada a proteínas em solução, procurando-se entender como se relacionam às condições de equilíbrio com os termos da equação.

A equação de estado proposta pode ser reescrita como:

$$\Pi = \Pi^{hs} - a\rho^2 \quad (26)$$

em que o primeiro termo (Π^{hs}) representa a pressão osmótica de esferas rígidas. A pressão osmótica calculada pela equação anterior depende apenas da concentração da proteína.

O parâmetro atrativo pode ser estimado, para um conjunto de dados experimentais, pela equação a seguir:

$$a = \frac{\Pi^{hs} - \Pi^{exp}}{\rho^2} \quad (27)$$

em que Π^{exp} é o valor experimental da pressão osmótica. Com o objetivo de prever o valor ou uma equação para o termo atrativo da equação, a , foram utilizados dados experimentais para pressão osmótica obtidos na literatura para proteínas em diferentes condições operacionais. A equação anterior foi usada como estimativa inicial, para se tentar prever tendências para o parâmetro a em concentrações

proteicas mais altas. Como exemplo da obtenção do valor do parâmetro atrativo, considerem-se os dados experimentais da pressão osmótica de soluções de lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000). Como pode ser observado na Figura 3, para o sulfato de amônio a 1M, os valores estimados de a para soluções em pH 4 e 7 ficaram bem próximos em concentrações acima de 10 g/L. Em baixas concentrações os valores estimados podem ser desprezados, pois o erro experimental nessas condições é considerável, e o termo atrativo tem pouca influência na pressão osmótica nessa situação.

Figura 3: Valores de a para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1M. ◇ valores de a estimados para soluções em pH 4 e □ para soluções em pH 7.

Em cada sistema (isto é, para cada proteína, em cada temperatura, para cada valor de pH e para cada tipo e concentração de co-solvente) estudou-se a tendência dos valores de a estimados. Partindo-se deste valor, minimizou-se a função objetivo FO definida na equação seguinte:

$$FO = \sqrt{\sum \left(1 - \frac{\Pi_i}{\Pi_i^{\text{exp}}} \right)^2} \quad (28)$$

em que Π^{exp} representa a pressão osmótica experimental obtida por diversos autores, cujos dados foram utilizados neste trabalho. Na Figura 4 observa-se o

comportamento da função objetivo com respeito à variação no termo atrativo para um caso particular.

Figura 4: Valores de FO para dados experimentais da lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1M, pH 4.

Como pode ser observado nesta figura, próximo ao valor mínimo a função objetivo varia muito pouco em relação ao termo ajustado. Por esta razão, optou-se por arredondar (em alguns casos) o valor definido para a e, em outros, obteve-se um mesmo valor para o parâmetro atrativo em diferentes condições. Assim, no caso específico do sistema considerado nesta figura (dados de soluções de lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000), para o sulfato de amônio a 1M e pH 4 e 7) o valor considerado para a em ambas as condições foi $220 \text{ Pa} \cdot \text{m}^6 \cdot \text{mol}^{-2}$.

4.1 EQUAÇÃO VIRIAL

Também foi utilizada neste trabalho, a equação virial truncada no segundo termo partindo, para finalidade de comparação com o modelo proposto. Foi escolhida esta equação tanto por ela ser largamente utilizada, quando pelo fato de seu coeficiente ter um significado preciso. A forma utilizada da equação foi a seguinte:

$$\Pi^V = RT\rho + B_{22}RT\rho^2 \quad (29)$$

em que Π^V é o valor da pressão osmótica a partir da equação virial.

De maneira análoga ao parâmetro atrativo, estimou-se o valor do segundo coeficiente virial por meio da equação:

$$B_{22} = \left(\frac{\Pi^{\text{exp}}}{RT\rho} - 1 \right) \frac{1}{\rho} \quad (30)$$

O valor estimado do segundo coeficiente virial foi limitado pela condição de estabilidade:

$$\left(\frac{\partial \Pi}{\partial \rho} \right)_T \geq 0 \quad (31)$$

uma vez que uma equação quadrática, sozinha, não deve predizer a separação de fases em altas concentrações de proteínas.

4.2 DIMERIZAÇÃO

Em alguns casos, proteínas em solução formam dímeros; entre as proteínas avaliadas, isso ocorre no caso da α -quimotripsina estudada por Haynes *et al.* (1992).

No caso em que uma proteína dimeriza-se em solução, monômero e dímero são considerados substâncias distintas. O termo de esferas rígidas deve ser alterado; assim, foi considerada a equação do fator de compressibilidade para misturas segundo Mansoori *et al.* (1971):

$$Z^{hs} = \frac{6}{\pi N_A \rho} \left[\frac{\xi_0}{1 - \xi_3} + \frac{3\xi_1\xi_2}{(1 - \xi_3)^2} + \frac{(3 - \xi_3)\xi_2^3}{(1 - \xi_3)^3} \right] \quad (32)$$

em que:

$$\xi_k = \frac{\pi N_A \rho_c}{6} \sum_{i=1}^m y_i r_i (d_i)^k, \text{ com } k = 0, 1, 2, 3.$$

Na equação anterior, y_i é a fração molar do componente, r_i é o número de segmentos da proteína, que neste caso é igual a 1 para o monômero e 2 para o dímero e d_i que é o diâmetro do segmento da proteína em função da temperatura, que é o mesmo tanto para o monômero quanto para o dímero. A fração molar do monômero foi obtida pela equação a seguir:

$$y_m = \frac{2M_w - \overline{M}_w}{M_w} \quad (33)$$

em que o valor de $\overline{M}_w$ é o valor aparente, obtido experimentalmente a partir do limite:

$$\frac{1}{\overline{M}_w} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\Pi}{cRT} \quad (34)$$

A forma final da equação para a pressão osmótica, então, torna-se:

$$\Pi = Z^{hs}(RT\rho) - a\rho^2 \quad (35)$$

Nesta equação, o valor da densidade molar é o valor *efetivo*, ou seja, o valor calculado considerando-se a ocorrência de dimerização. Especificamente no que diz respeito ao parâmetro atrativo, há duas abordagens possíveis. A primeira é considerar que o valor de a é independente da ocorrência ou não de dimerização, ou seja, que seu valor é único para monômeros ou dímeros. Outra possibilidade é considerar que, na verdade, o valor de a seja um valor de mistura, e que os valores para monômero e dímero sejam diferentes. Nesse último caso, aplicando-se a regra clássica para parâmetros de mistura, ter-se-ia:

$$a = y_m^2 a_m + y_m y_d \sqrt{a_m a_d} + y_d^2 a_d \quad (36)$$

em que a_m é o termo atrativo do monômero, a_d é o termo atrativo do dímero e y_i são as respectivas frações molares. Como o parâmetro a refere-se à interação entre pares, pode-se considerar que o valor do parâmetro para um multímero qualquer seja dado por $a_j = j^2 a_1$, sendo j o número de unidades monoméricas. Esta proporcionalidade é comumente utilizada em trabalhos que consideram a associação química por meio de equações de estado (Pessôa Filho e Mohamed (1999)) Desse modo, tem-se, para $j = 2$ (dímero) $a_d = 4a_m$. Dessa forma, a equação anterior pode ser escrita como:

$$a = y_m^2 a_m + 2y_m y_d (2a_m) + y_d^2 4a_m \quad (37)$$

que se reduz a:

$$a = (y_m + 2y_d)^2 a_m \quad (38)$$

A densidade molar efetiva da proteína, ou seja, considerando a mistura, dímero e monômero, pode ser escrita conforme da equação seguinte.

$$\rho = \frac{(n_m + n_d)}{V} = \frac{(n_m + n_d)}{(n_m + 2n_d)} \frac{(n_m + 2n_d)}{V} = \frac{1}{(y_m + 2y_d)} \rho_{ap} \quad (39)$$

em que ρ_{ap} é a densidade *aparente*, ou seja, aquela calculada sem considerar a ocorrência de dimerização; é a densidade que pode ser experimentalmente obtida, simplesmente dividindo-se a concentração pela massa molar da proteína (unidade monomérica):

$$\rho_{ap} = \frac{m_p}{M_{W_{mon}}} \frac{1}{V} = \frac{c}{M_{W_{mon}}} \quad (40)$$

em que $M_{W_{mon}}$ é a massa molar do monômero.

Assim, tem-se, acoplando-se as equações anteriores:

$$\Pi = \Pi^{hs} - a_m \rho_{ap}^2 \quad (41)$$

Deve-se notar, desse modo, que a ocorrência de dimerização altera apenas o termo de esferas rígidas; do ponto de vista de parâmetros a determinar, a equação (41) é idêntica à equação (35). Para finalidade de comparação, utilizaram-se neste trabalho as duas abordagens no que diz respeito ao termo de esferas rígidas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LISOZIMA

Os dados de pressão osmótica de lisozima, enzima com ação antimicrobiana, foram obtidos de Moon *et al.* (2000), que estudou o comportamento desta proteína em soluções de sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, oxalato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ e fosfato de amônio dibásico, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, em valores de pH 4,0, 7,0 e 8,0 e força iônica 1,0 M e 3,0 M à 25°C. Recorde-se que esta proteína possui massa molar de $14.400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, raio de van der Waals de $1,72\cdot 10^{-9} \text{ m}$ e ponto isoelétrico (pI) igual a 11,0.

Os valores obtidos para o parâmetro atrativo nas diversas condições estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Termo atrativo calculado para a lisozima. Dados experimentais obtidos a 25°C por Moon *et al.* (2000).

Sal	Força iônica	pH	a ($\text{Pa}\cdot\text{m}^6\cdot\text{mol}^{-2}$)	FO $a=0$	FO $a=\text{calc}$	FO EV
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 M	4,0	220	0,5951	0,0407	0,0405
		7,0	220	0,5871	0,0548	0,0521
		8,0	340	0,9401	0,0403	0,0407
	3,0 M	4,0	425	1,2616	0,0370	0,2554
		7,0	425	1,2892	0,0669	0,0685
		8,0	425	1,4268	0,0541	0,0536
$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$	1,0 M	4,0	240	0,6443	0,0488	0,0480
		7,0	355	0,9100	0,0417	0,0422
		8,0	355	0,9971	0,0550	0,0561
	3,0 M	4,0	270	0,6797	0,0338	0,0336
		7,0	270	0,8004	0,0335	0,0332
		8,0	270	0,8004	0,0335	0,0332
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1,0 M	7,0	270	0,8004	0,0335	0,0332
		8,0	270	0,8004	0,0335	0,0332
	3,0 M	7,0	410	1,1166	0,0509	0,0512
		8,0	410	1,2658	0,0687	0,0694

Uma análise mais detalhada pode ser feita comparando-se graficamente o comportamento da equação proposta e os dados experimentais. Para avaliar o desvio da idealidade, apresenta-se também o comportamento observado considerando-se $a=0$, ou seja, considerando-se somente a componente repulsiva da

equação de estado. Nas Figuras 5 e 6 apresentam-se os dados para as forças iônicas 1,0 M e 3,0 M, respectivamente, para soluções de lisozima contendo sulfato de amônio.

Observando-se a Figura 5, nota-se que nesta força iônica, apenas em pH 8,0 o termo atrativo é ligeiramente maior, o que é condizente com uma pressão osmótica menor. Este aumento é relacionado ao fato de que este pH está mais próximo do ponto isoelétrico desta proteína. Na medida em que diminui a carga média das moléculas proteicas (no ponto isoelétrico, recorde-se, a carga média é nula), a componente repulsiva diminui, o que se reflete no aumento do parâmetro atrativo. Na Figura 6, observa-se que, em um valor mais alto de força iônica, a variação de pressão osmótica é menor, o que se reflete em no fato do parâmetro atrativo ser constante; ademais, o valor do parâmetro atrativo é maior para essa condição. Essa observação é condizente com o fato de que uma maior concentração salina tem um efeito de blindagem (na expressão inglesa, “screening”), que faz com que a repulsão eletrostática sentida pelas moléculas proteicas seja menor.

Em ambos os casos, entretanto, ao se confrontar os resultados obtidos por meio da equação proposta com a consideração de termo atrativo nulo ($a=0$), observa-se que não é possível desconsiderar a atração intermolecular na modelagem dos dados. Mesmo em concentrações relativamente baixas, corroborando os comentários relativos à Figura 2, o papel da atração intermolecular é grande na pressão osmótica: as curvas com o valor do parâmetro a ajustado representam adequadamente os dados experimentais, o que não ocorre quando se ignora este parâmetro.

Figura 5: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,0, (.....) Π calculada para pH 4,0, $\square$ valores experimentais para pH 7,0, (-----) Π calculada para pH 7,0, $\circ$ valores experimentais para pH 8,0, (.....) Π calculada para pH 8,0 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$

Figura 6: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,0, (.....) Π calculada para pH 4,0, $\square$ valores experimentais para pH 7,0, (-----) Π calculada para pH 7,0, $\circ$ valores experimentais para pH 8,0, (.....) Π calculada para pH 8,0 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

As Figuras 7 a 9 mostram o comportamento da pressão osmótica da lisozima em solução de sulfato de amônio mantendo-se o pH constante e variando-se a força iônica. O que se pode notar é que, para uma mesma concentração proteica, a pressão osmótica tende a cair, afastando-se da condição $a=0$, na medida em que a força iônica aumenta. Como dito anteriormente, este é um resultado esperado. Além do efeito de blindagem, este comportamento está ligado ao fato de as forças atrativas se tornarem maiores, uma vez que o sal considerado é cosmotrópico: as moléculas de água que constituem a camada de solvatação (ou hidratação) desprendem-se da mesma para reagir com o sal que está em maior concentração. Para os sistemas em pH 4,0 e 7,0 a diferença entre a pressão osmótica para as forças iônicas de 1,0 M e de 3,0 M é pequena, mas para sistemas em pH 8,0 as pressões são muito próximas, o que está relacionado à proximidade maior do ponto isoelétrico (situação em que, idealmente, o termo atrativo teria seu maior valor e seria mais insensível à força iônica).

Do ponto de vista específico da modelagem, observando a Tabela 1, apresentada anteriormente, nota-se que o valor do parâmetro atrativo, considerando a força iônica de 1,0 M, aumenta quando o valor de pH aproxima-se de ponto isoelétrico. O mesmo não acontece para força iônica de 3,0 M, para a qual o valor proposto para o parâmetro atrativo mantém-se constante para os três valores de pH estudados. Nesse caso, a estabilidade do termo atrativo pode ser devido à alta força iônica, que causa o efeito de blindagem anteriormente mencionado.

A Figura 10 mostra a pressão osmótica para a lisozima em solução de oxalato de amônio em diferentes condições de pH. Para este sal estão disponíveis dados apenas em força iônica 1,0 M. Assim como para os sistemas contendo sulfato de amônio, também para os sistemas contendo oxalato de amônio a equação proposta representou muito bem os pontos experimentais nos diversos valores de pH. Do mesmo modo, e pelas mesmas razões, o termo atrativo aumentou conforme o valor do pH tendia ao ponto isoelétrico; nesse caso, entretanto, o efeito já foi sensível em pH 7,0, como pode ser observado na Tabela 1.

Figura 7: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 4 e diferentes forças iônicas. $\diamond$ valores experimentais para 1M, (.....) Π calculada para 1M, $\circ$ valores experimentais para 3M, (-----) Π calculada para 3M, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 8: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 7 e diferentes forças iônicas. $\diamond$ valores experimentais para 1M, (.....) Π calculada para 1M, $\circ$ valores experimentais para 3M, (-----) Π calculada para 3M, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 9: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 8 e diferentes forças iônicas. $\diamond$ valores experimentais para 1M, (.....) Π calculada para 1M, $\circ$ valores experimentais para 3M, (-----) Π calculada para 3M, e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 10: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ 1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4, (.....) Π calculada para pH 4, $\square$ valores experimentais para pH 7, (-----) Π calculada para pH 7, $\circ$ valores experimentais para pH 8, (-----) Π calculada para pH 8 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Também foi obtido o valor do parâmetro atrativo para soluções contendo fosfato de amônio dibásico em forças iônicas 1,0 M e 3,0 M. A 1,0 M, nas duas condições estudadas, o valor estimado do parâmetro atrativo em pH 7,0 e 8,0 é igual a $270 \text{ Pa}\cdot\text{m}^6\cdot\text{mol}^{-2}$. Situação análoga ocorreu em força iônica 3,0 M, para a qual o valor estimado do parâmetro atrativo é igual a $410 \text{ Pa}\cdot\text{m}^6\cdot\text{mol}^{-2}$. O comportamento pode ser visto nas Figuras 11 e 12. A constância do parâmetro atrativo para as duas condições de pH estudadas pode ser resultante da proximidade dos dados experimentais nas duas condições.

Figura 11: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em 1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 7, (.....) Π calculada para pH 7, $\circ$ valores experimentais para pH 8, (-----) Π calculada para pH 8, e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 12: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em 3M. ◇ valores experimentais para pH 7, (·····) Π calculada para pH 7, ○ valores experimentais para pH 8, (-----) Π calculada para pH 8, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Ao se comparar o comportamento da pressão osmótica da lisozima em solução de fosfato de amônio dibásico 1,0 M e a 3,0 M para um mesmo valor de pH, nas Figuras 13 e 14, observa-se um comportamento semelhante àquele de sistemas contendo outros sais: à medida que a força iônica aumenta, a pressão osmótica tende a diminuir, para uma mesma concentração proteica.

Figura 13: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em pH 7. $\diamond$ valores experimentais para 1M, (.....) Π calculada para 1M, $\circ$ valores experimentais para 3M, (-----) Π calculada para 3M, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

O comportamento da pressão osmótica para um mesmo pH e mesma concentração, mas diferentes forças iônicas, também pode ser analisado. Para o valor de pH 4,0 e concentração 1,0 M, observa-se na Figura 15 que a pressão osmótica praticamente não varia para diferentes forças iônicas. Este comportamento deve ser relacionado ao fato de a força iônica ser baixa, o que faz com que prevaleçam as interações polares da proteína com água. A mesma análise foi feita considerando pH 7,0 e concentração 1,0 M. Nestas condições, observa-se na Figura 16 que o parâmetro atrativo para o oxalato de amônio é ligeiramente maior que para os demais sais. De modo geral, é possível notar que a pressão osmótica varia muito pouco para as diferentes forças iônicas analisadas.

Figura 14: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em pH 8. $\diamond$ valores experimentais para 1M, (.....) Π calculada para 1M, $\circ$ valores experimentais para 3M, (-----) Π calculada para 3M, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 15: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em soluções de diferentes força iônica, a 1M em pH 4. $\diamond$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (.....) Π calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\circ$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, (-----) Π calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 16: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em soluções de diferentes força iônica, a 1M em pH 7. $\diamond$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (.....) Π calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\square$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, (-----) Π calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, $\circ$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, (.....) Π calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Também na Figura 17 pode ser avaliada a condição de pH 8 e força iônica 1,0 M, situação em que é possível observar que a pressão osmótica é praticamente a mesma independente do sal considerado. Para estas soluções os valores da pressão osmótica, bem como os valores estimados do parâmetro atrativo, apresentam apenas uma pequena variação, uma vez que o pH está próximo ao ponto isoelétrico.

A mesma análise pode ser feita para as condições de força iônica 3,0 M e pH 7,0 (Figura 18), e força iônica 3,0 M e pH 8,0 (Figura 19). Nestas condições, a variação na pressão osmótica do fosfato de amônio é praticamente nula, em razão da proximidade dos valores do termo atrativo (para a solução de fosfato de amônio, 410, e para a solução de sulfato de amônio, 425).

Figura 17: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em soluções de diferentes força iônica, a 1M em pH 8. $\diamond$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (.....) Π calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\square$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, (-----) Π calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, $\circ$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, (·-·-·-·-·-) Π calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 18: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em soluções de 3M e pH 7. $\diamond$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (.....) Π calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\circ$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, (-----) Π calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 19: Pressão osmótica para dados da Lisozima obtidos por Moon *et al.* (2000) em soluções de 3M e pH 8. $\diamond$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (.....) Π calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\circ$ valores experimentais para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, (-----) Π calculada para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, e (——) calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Em conclusão, observa-se que a equação proposta foi capaz de ajustar adequadamente os dados de pressão osmótica de lisozima. O comportamento do parâmetro atrativo é condizente, nesse caso, com o que ocorre fisicamente nesses sistemas. Para essa proteína, não é possível desconsiderar o parâmetro atrativo na modelagem termodinâmica, ou seja, não se pode considerar, para a lisozima, que a atividade seja igual a sua fração molar.

5.2 α -QUIMOTRIPSINA

Haynes *et al.* (1992) estudaram o comportamento da α -quimotripsina, enzima proteolítica, em soluções de sulfato de potássio, K_2SO_4 , e fosfato monobásico de sódio, NaH_2PO_4 . Esta enzima é uma protease, com massa molar de 25.000 g/mol e com tendência a dimerizar-se em solução. A molécula de α -quimotripsina (monômero) possui raio de $2,17 \cdot 10^{-9}$ m e ponto isoelétrico 8,1.

Pode-se observar, por meio da equação (10), que o valor da massa molar pode ser inferido a partir de dados de pressão osmótica. Para verificar a ocorrência

de dimerização, Haynes *et al.* (1992) obtiveram o peso molecular médio (aparente) para cada condição estudada. Todos os valores obtidos pelos pesquisadores foram maiores que a massa molar do monômero (25000 g/mol), chegando a 37700 g/mol, confirmando a ocorrência de dimerização nessas condições.

A partir da massa molar aparente, é possível obter o grau de dimerização q , isto é, a fração de moléculas de proteína que estará na forma de monômeros e de dímeros, por um balanço de massa simples e pela equação (33).

$$q = \frac{\overline{M}_w - M_w}{\overline{M}_w} \quad (42)$$

em que o valor de $\overline{M}_w$ é o valor aparente, obtido experimentalmente a partir do limite dado pela equação (34)

$$\frac{1}{\overline{M}_w} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\Pi}{cRT} \quad (34)$$

Para considerar a dimerização, utilizou-se a equação (32) para o termo repulsivo e a equação (35) para a pressão osmótica. As condições estudadas pelos autores, os valores de $\overline{M}_w$ e o valor ajustado do parâmetro atrativo são apresentados na Tabela 2. No caso específico, o valor de a_m é calculado a partir do valor ajustado de a por meio de:

$$a = a_m \left(\frac{M_w}{\overline{M}_w} \right)^2 \quad (43)$$

Tabela 2: Condições e termo atrativo para a α -quimotripsina. Dados experimentais obtidos a 25°C por Haynes *et al.* (1992).

Condição	pH	$\bar{M}_w$ (g/mol)	a (Pa·m ⁶ ·mol ⁻²)	a_m (Pa·m ⁶ ·mol ⁻²)	FO a=0	FO a calc	FO EV
K ₂ SO ₄ 0,1M	4,0	30000	1800	1250	0,1223	0,0079	0,0082
	5,0	32200	1400	844	0,0813	0,0058	0,0057
	6,0	32500	1200	710	0,0655	0,0035	0,0033
	8,0	37700	950	418	0,0461	0,0087	0,0080
	8,25	35300	1000	502	0,0485	0,0056	0,0057
	10,0	31600	1700	1064	0,1122	0,0272	0,0275
	11,0	30400	2300	1555	0,1672	0,0093	0,0090
	12,0	30900	4800	3142	0,4832	0,0115	0,0115
NaH ₂ PO ₄ 0,1M	4,5	27900	1275	1024	0,1251	0,0054	0,0055
	5,0	30000	1350	938	0,9641	0,0029	0,0028
	6,0	35900	1575	764	0,0919	0,0047	0,0045
	7,0	36900	1100	505	0,0677	0,0040	0,0046
	8,25	31400	1650	1046	0,1132	0,0082	0,0084
	9,0	31600	2000	1252	0,1505	0,0039	0,0041

A Figura 20 apresenta a pressão calculada por meio da equação proposta para a proteína em solução de sulfato de potássio 0,1M, para os valores de pH entre 4 e 8, e a Figura 21, a pressão osmótica para os valores de pH entre 8,25 e 12. Como esperado, as figuras mostram que a pressão osmótica, considerando o termo atrativo, representa melhor os resultados do que a equação de van der Waals considerando o termo atrativo nulo. Pelas Figuras observa-se uma pequena variação no comportamento das curvas de pressão osmótica, e consequentemente no termo atrativo, para condições de pH mais distante do ponto isoelétrico.

Considerando a Figura 20, observa-se que a pressão osmótica e o termo atrativo variam muito pouco com relação ao pH da solução. Apenas quando o pH aproxima-se do ponto isoelétrico, o termo atrativo aumenta consideravelmente, fazendo com que a pressão osmótica se reduza, conforme esperado.

Assim como na Figura 20, na Figura 21 observa-se uma pequena variação na pressão osmótica para soluções cujo pH está acima do ponto isoelétrico. Nesse caso específico, para o pH 12,0 observa-se um aumento acentuado nas forças atrativas, o que resulta em uma redução na pressão osmótica. Esse efeito não está relacionado à dimerização (que é maior, como se poderia esperar, em pH próximo ao ponto isoelétrico). Nesse caso específico, este efeito pode estar associado à condensação (ou seja, à formação de ligações iônicas) de cátions K⁺ como

contraíons em uma cadeia proteica carregada negativamente. Esse efeito é conhecido em polieletrólitos sintéticos e também proteínas.

Assim como para o sulfato de potássio, a Figura 22 mostra a pressão osmótica obtida através da equação proposta considerando os valores estimados do termo atrativo para a α -quimotripsina em solução de fosfato monobásico de sódio para os valores de pH entre 4,5 e 6,0. Nesta Figura, observa-se que a pressão osmótica, à medida que o pH se aproxima do ponto isoelétrico, tende a diminuir, conforme o esperado, apesar do termo atrativo diminuir, ao contrário do que se esperava. Isso está relacionado ao fato de que uma parcela da diminuição da pressão osmótica está relacionada a um aumento da fração dimerizada, ou seja, ao aumento do valor da massa molar aparente.

A Figura 23 mostra os resultados obtidos para a mesma condição anterior variando apenas os valores de pH, entre 7,0 e 9,0. Assim como para soluções de sulfato de potássio (Figura 21), a pressão osmótica pouco varia para soluções cujo pH está acima do ponto isoelétrico. Nesse caso, por limitações experimentais não há dados em valores mais elevados de pH, que possibilitassem a verificação de uma eventual condensação do íon Na^+ como contraíon na cadeia proteica carregada negativamente.

Figura 20: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992), em soluções de K_2SO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4, (.....) Π calculada para pH 4, $\square$ valores experimentais para pH 5, (-----) Π calculada para pH 5, $\circ$ valores experimentais para pH 6, (-.-.-.-) Π calculada para pH 6, * valores experimentais para pH 8, (.....) Π calculada para pH 8 e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 21: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992), em soluções de K_2SO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 8,25, (.....) Π calculada para pH 8,25, $\square$ valores experimentais para pH 10, (-----) Π calculada para pH 10, $\circ$ valores experimentais para pH 11, (-.-.-.-) Π calculada para pH 11, * valores experimentais para pH 12, (.....) Π calculada para pH 12 e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 22: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992), em soluções de NaH_2PO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,5, (.....) Π calculada para pH 4,5, $\square$ valores experimentais para pH 5, (-----) Π calculada para pH 5, $\circ$ valores experimentais para pH 6, (-.-.-.-) Π calculada para pH 6 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 23: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992), em soluções de NaH_2PO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 7, (.....) Π calculada para pH 7, $\square$ valores experimentais para pH 8,25, (-----) Π calculada para pH 8,25, $\circ$ valores experimentais para pH 9, (-.-.-.-) Π calculada para pH 9 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Comparando a pressão osmótica em condições semelhantes, mesmo valor de pH, mesma concentração de sal, porém sais diferentes, observa-se na Figuras 24 que, para solução contendo fosfato monobásico de sódio, a pressão osmótica obtida é um pouco maior que para a soluções contendo sulfato de potássio. Seria possível que essa diferença fosse devido ao caráter cosmotrópico do íon sulfato, cuja maior camada de hidratação (ou solvatação) pode justamente diminuir a camada de hidratação das moléculas proteicas, aumentando a atração entre elas. Entretanto, isso não justifica a inversão da tendência para o pH 6,0, observada na Figura 25. A diferença da pressão osmótica para diferentes forças iônicas e mesmo pH, tende a diminuir quando o pH da solução está próximo ao ponto isoelétrico, 8,1, conforme observado Figura 26. Os valores do parâmetro atrativo, nesses casos, não refletem diretamente esse fato, por levarem em conta indiretamente o valor da fração dimerizada; nesse caso, a inversão de tendências observada ilustra justamente a dificuldade em se definir tendências para o parâmetro atrativo.

Figura 24: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992) em soluções de 0,1M e pH 5. $\diamond$ valores experimentais para K_2SO_4 , (.....) Π calculada para K_2SO_4 , $\circ$ valores experimentais para NaH_2PO_4 , (-----) Π calculada para NaH_2PO_4 , e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 25: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992) em soluções de 0,1M e pH 6. $\diamond$ valores experimentais para NaH_2PO_4 , (.....) Π calculada para NaH_2PO_4 , $\circ$ valores experimentais para K_2SO_4 , (-----) Π calculada para K_2SO_4 , e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 26: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992) em soluções de 0,1M e pH 8,25. $\diamond$ valores experimentais para NaH_2PO_4 , (.....) Π calculada para NaH_2PO_4 , $\circ$ valores experimentais para K_2SO_4 , (-----) Π calculada para K_2SO_4 , e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

No segundo caso, para comparação e entendimento da importância de se considerar a dimerização nos cálculos, optou-se por considerar apenas as propriedades aparentes, ou seja, considerar que toda α -quimotripsina estaria na forma monomérica. Nesse caso, consideram-se as equações (24) e (25) anteriormente utilizadas no ajuste de dados da lisozima.

Tabela 3: Condições e termo atrativo para a α -quimotripsina desconsiderando-se a ocorrência de dimerização. Dados experimentais obtidos a 25°C por Haynes *et al.* (1992).

Condição	pH	a ($\text{Pa}\cdot\text{m}^6\cdot\text{mol}^{-2}$)	FO a=0	FO a calc	FO EV
K ₂ SO ₄ 0,1M	4,0	2450	0,3281	0,0931	0,0932
	5,0	2750	0,3663	0,1280	0,1281
	6,0	2550	0,3572	0,1296	0,1298
	8,0	2950	0,5254	0,2122	0,2124
	8,25	2750	0,4412	0,1777	0,1778
	10,0	2550	0,3817	0,1503	0,1505
	11,0	2800	0,0397	0,0984	0,0986
	12,0	4650	0,7997	0,1279	0,1281
NaH ₂ PO ₄ 0,1M	4,5	1700	0,2413	0,0460	0,0461
	5,0	2200	0,2946	0,0712	0,0713
	6,0	3250	0,5221	0,1927	0,1928
	7,0	3250	0,5234	0,1696	0,1698
	8,25	2600	0,3726	0,1155	0,1156
	9,0	2950	0,04243	0,1045	0,1047

As curvas para a pressão osmótica desconsiderando a dimerização da proteína estão apresentadas nas figuras seguintes. A Figura 27 mostra a pressão osmótica obtida através da equação proposta para a proteína em solução de sulfato de potássio 0,1M, para os valores de pH entre 4,0 e 8,0, e a Figura 28 para os valores de pH entre 8,25 e 12,0. Nesses casos, é fácil observar que o ajuste dos dados é inferior àquele obtido quando a dimerização é considerada nos cálculos.

Figura 27: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992), em soluções de K_2SO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4, (.....) Π calculada para pH 4, $\square$ valores experimentais para pH 5, (-----) Π calculada para pH 5, $\circ$ valores experimentais para pH 6, (-.-.-.-) Π calculada para pH 6, * valores experimentais para pH 8, (-.-.-.-.-) Π calculada para pH 8 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 28: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992), em soluções de K_2SO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 8,25, (.....) Π calculada para pH 8,25, $\square$ valores experimentais para pH 10, (-----) Π calculada para pH 10, $\circ$ valores experimentais para pH 11, (-.-.-.-) Π calculada para pH 11, * valores experimentais para pH 12, (-.-.-.-.-) Π calculada para pH 12 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Nas Figuras 29 e 30 apresentam-se os resultados para aplicação da mesma equação para a α -quimotripsina em soluções de fosfato dibásico de sódio 0,1 M, para os valores de pH entre 4,5 e 6,0 (Figura 29) e para os valores de pH entre 7,0 e 9,0 (Figura 30). As observações são semelhantes àsquelas do ajuste de dados de soluções contendo sulfato de potássio; também nesse caso, o ajuste é inferior àquele realizado com a consideração da dimerização.

Figura 29: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992), em soluções de NaH_2PO_4 a 0,1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,5, (.....) Π calculada para pH 4,5, $\circ$ valores experimentais para pH 5, (-----) Π calculada para pH 5, $\square$ valores experimentais para pH 6, (-.-.-) Π calculada para pH 6, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

As Figuras 31 a 33 seguintes apresentam os resultados individuais, conforme realizado anteriormente ao se considerar a ocorrência de dimerização. Tais resultados apenas comprovam que, em qualquer condição, o ajuste é claramente inferior quando se desconsidera a dimerização. Como exemplo pode-se citar o resultado da minimização da função objetivo para 0,1M de NaH_2PO_4 em pH 5, que no primeiro estudo foi 0,0029 e no segundo 0,0712, como pode ser visto nas Tabelas 2 e 3. Observa-se também que os valores do parâmetro atrativo não são diretamente correlacionáveis. Em uma análise geral, nota-se, que o comportamento da equação, ao se desconsiderar a dimerização, é inadequado mesmo em

concentrações proteicas mais baixas, nas quais a influência do termo atrativo é menor: nesses casos, a própria inclinação das curvas considerando-se o parâmetro atrativo nulo desvia-se da tendência experimentalmente observada. Desse modo, fica patente a necessidade de se considerar a dimerização (ou oligomerização) de proteínas na modelagem quando dados experimentais assim indicarem.

Figura 30: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992), em soluções de NaH_2PO_4 a 0,1M. $\square$ valores experimentais para pH 7, (.....) Π calculada para pH 7, $\diamond$ valores experimentais para pH 8,25, (-----) Π calculada para pH 8,25, $\circ$ valores experimentais para pH 9, (-.-.-.-.-) Π calculada para pH 9, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 31: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992) em soluções de 0,1M e pH 5. $\diamond$ valores experimentais para NaH_2PO_4 , (.....) Π calculada para NaH_2PO_4 , $\circ$ valores experimentais para K_2SO_4 , (-----) Π calculada para K_2SO_4 , e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 32: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992) em soluções de 0,1M e pH 6. $\diamond$ valores experimentais para NaH_2PO_4 , (.....) Π calculada para NaH_2PO_4 , $\circ$ valores experimentais para K_2SO_4 , (-----) Π calculada para K_2SO_4 , e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 33: Pressão osmótica para α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992) em soluções de 0,1M e pH 8,25. $\diamond$ valores experimentais para NaH_2PO_4 , (.....) Π calculada para NaH_2PO_4 , $\circ$ valores experimentais para K_2SO_4 , (-----) Π calculada para K_2SO_4 , e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

5.3 ALBUMINA DE SORO BOVINO

Dados de pressão osmótica gerada pela albumina de soro bovino (BSA), proteína de transporte e de regulação da pressão oncótica, foram considerados, nesse trabalho, em duas situações: em soluções poliméricas e em soluções salinas. Esta proteína possui peso molecular 66.000 g/mol e ponto isoelétrico 4,7.

Alves *et al.* (2010) estudaram o comportamento da pressão osmótica da albumina do soro bovino, BSA, em solução aquosa contendo como co-solvente o polímero polietileno glicol de massa 2.000 g/mol, PEG 2.000.

As condições experimentais e os valores calculados para o parâmetro atrativo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Condições e termo atrativo para a BSA em soluções poliméricas. Dados experimentais obtidos a 25°C por Alves *et al.* (2010).

Fração mássica de polímero	pH	a (Pa·m ⁶ ·mol ⁻²)	FO a=0	FO a calc	FO EV
0,5%	4	1685	1,4853	0,3004	0,3156
	5	758	0,6063	0,1904	0,1969
	6	900	0,4770	0,2145	0,2257
1,0%	4	1302	1,1695	0,1624	0,1702
	5	738	0,5546	0,1823	0,1817
	6	1350	3,9030	2,2577	2,2809
2,0%	4	2750	4,8453	1,8465	1,8694
	5	2400	2,9185	0,7982	0,8138
	6	2400	4,1616	1,5416	1,5676

Conforme pode ser observado nas Figuras 34 a 36 seguintes, também nesse caso, mesmo em concentrações baixas de proteína é necessário considerar o valor do parâmetro atrativo para uma correlação adequada dos dados experimentais.

Nas Figuras a seguir, observa-se que o aumento da concentração de PEG na solução dificulta a modelagem dos dados experimentais. Para a concentração 0,5% de PEG, observa-se que para as faixas de pH analisadas o modelo representou bem os resultados. Para concentração de 1%, apenas para o pH 6, o modelo não representou muito bem os dados experimentais; já para a condição concentração de 2%, o modelo se aproximou mais dos dados experimentais do que a condição em que o termo atrativo é desprezado, porém a curva do modelo não se aproxima muito dos dados experimentais. Aparentemente, pela diferença de tendências quando a concentração de proteína tende a zero, é possível suspeitar que ocorra dimerização também nesse caso; entretanto, não existe descrição na literatura desse fenômeno com a BSA.

Figura 34: Pressão osmótica para a BSA obtida por Alves *et al.* (2010), em soluções contendo 0,5% de PEG 2000. $\diamond$ valores experimentais para pH 4, ($\cdots$) Π calculada para pH 4, $\circ$ valores experimentais para pH 5, ($---$) Π calculada para pH 5, $\square$ valores experimentais para pH 6, ($-.-.-$) Π calculada para pH 6, e ($—$) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 35: Pressão osmótica para a BSA obtida por Alves *et al.* (2010), em soluções contendo 1% de PEG 2000. $\diamond$ valores experimentais para pH 4, ($\cdots$) Π calculada para pH 4, $\circ$ valores experimentais para pH 5, ($---$) Π calculada para pH 5, $\square$ valores experimentais para pH 6, ($-.-.-$) Π calculada para pH 6, e ($—$) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 36: Pressão osmótica para a BSA obtida por Alves *et al.* (2010), em soluções contendo 2% de PEG 2000. $\diamond$ valores experimentais para pH 4, (.....) Π calculada para pH 4, $\circ$ valores experimentais para pH 5, (-----) Π calculada para pH 5, $\square$ valores experimentais para pH 6, (-.-.-.-) Π calculada para pH 6, e (————) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Também se analisaram as tendências do modelo variando as concentrações de polímero para um mesmo pH, conforme as Figuras 37 a 39.

Observa-se que o comportamento mostrado na Figura 38 é diferente daquele das Figuras 37 e 39. Fundamentalmente, na Figura 38 observa-se que em pH 5,0 o modelo se aproxima mais dos dados experimentais do que nos outros valores de pH. Nesse pH a proteína está mais próxima do ponto isoelétrico, o que faz com que a carga média líquida de suas moléculas seja próxima de zero. Como a molécula de PEG tem também grupos ionizáveis (os átomos de oxigênio tem pares de elétrons desemparelhados que podem agir como aceptores de prótons), não é improvável que um mecanismo de repulsão/atração eletrostática ocorra em outros valores de pH. Nesse caso, o modelo não correlaciona adequadamente o comportamento experimental. Se experimentalmente as razões do comportamento não estão elucidadas, menos ainda pode-se resolver a modelagem desses sistemas.

Figura 37: Pressão osmótica para a BSA obtida por Alves *et al.* (2010), em soluções contendo PEG 2000 e pH 4. $\diamond$ valores experimentais para 0,5%, (.....) Π calculada para pH 0,5%, $\circ$ valores experimentais para 1%, (-----) Π calculada para 1%, $\square$ valores experimentais para 2%, (-.-.-.-) Π calculada para 2%, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 38: Pressão osmótica para a BSA obtida por Alves *et al.* (2010), em soluções contendo PEG 2000 e pH 5. $\diamond$ valores experimentais para 0,5%, (.....) Π calculada para pH 0,5%, $\circ$ valores experimentais para 1%, (-----) Π calculada para 1%, $\square$ valores experimentais para 2%, (-.-.-.-) Π calculada para 2%, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 39: Pressão osmótica para a BSA obtida por Alves *et al.* (2010), em soluções contendo PEG 2000 e pH 6. $\diamond$ valores experimentais para 0,5%, (.....) Π calculada para pH 0,5%, $\circ$ valores experimentais para 1%, (-----) Π calculada para 1%, $\square$ valores experimentais para 2%, (-.-.-.-.-) Π calculada para 2%, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Também para a BSA, foi ajustado o parâmetro atrativo para os dados obtidos por Lu *et al.* (2009); nesse caso, o co-solvente é o sulfato de amônio. As situações estudadas pelos autores e os valores para o parâmetro ajustado são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Condições e termo atrativo para a BSA em soluções contendo sulfato de amônio. Dados experimentais obtidos a 25°C por Lu *et al.* (2009).

(NH ₄) ₂ SO ₄	pH	a (Pa·m ⁶ ·mol ⁻²)	FO a=0	FO a calc	FO EV	B ₂₂ ·10 ⁴ (mL·mol·g ²)
0,15 M	4,5	1260	1,6107	0,1688	0,1965	-0,2596
	4,8	1200	1,3261	0,1766	0,1445	-0,2631
	5,4	1000	1,1821	0,1986	0,1783	-0,0948
	7,4	1000	1,2731	0,1534	0,1542	-0,0310
0,50 M	4,5	995	1,0919	0,1560	0,1773	-0,0363
	4,8	1110	1,3645	0,0629	0,0773	-0,1985
	5,4	910	1,0126	1,082	0,0846	-0,1065
	7,4	720	0,9690	0,1161	0,1602	0,1723
1,00 M	4,5	1200	1,6494	0,2472	0,2837	-0,2386
	4,8	1728	2,6020	0,2850	0,3155	-0,7791
	5,4	1050	1,4163	0,1477	0,1752	-0,1009
	7,4	895	1,1308	0,2678	0,2598	0,0105
1,50 M	4,5	1735	2,3597	0,1278	0,1509	-0,7654
	4,8	2150	2,1839	0,0976	0,1117	-1,1589
	5,4	1270	1,0044	0,1350	0,1411	-0,3470
	7,4	1220	1,5478	0,2743	0,2792	-0,0270

Conforme os dados apresentados na Tabela 5, o valor do parâmetro ajustado para cada concentração de sal é maior quando o pH está próximo do ponto isoelétrico. Isso não ocorre apenas para a situação de 0,15M de sal, mas, nesse caso, a diferença é pequena, e pode ser creditada à incerteza experimental dos próprios dados. Com relação à força iônica, de maneira geral um aumento da força iônica ocasiona um aumento no parâmetro atrativo. Sabe-se que o sulfato de amônio é um bom agente precipitante, ou seja, que um aumento em sua concentração tem o efeito de aumentar a atração intermolecular. Isso é observado nos valores ajustados de a . Para a força iônica menor, entretanto, esse comportamento não é notado; em baixas forças iônicas, mesmo bons agentes precipitantes podem ocasionar um aumento na solubilidade. Essa mudança de comportamento no valor de a pode estar associada a esse fenômeno.

Os valores do segundo coeficiente virial foram obtidos a partir dos dados experimentais pelos próprios autores. Assim como o parâmetro atrativo o segundo coeficiente virial, B_{22} , não apresenta tendência inequívoca ao se relacionar com a força iônica; espera-se, entretanto, que B_{22} tenha valor mínimo perto do ponto

isoelétrico, e sigam, aproximadamente, o comportamento do parâmetro atrativo a . Os valores apresentados na Tabela 5 apresentam o comportamento esperado.

As Figuras 40 a 43 mostram que o modelo proposto representa bem os dados experimentais para todas as condições avaliadas por Lu *et al.* (2009).

Figura 40: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu *et al.* (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,15M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,5, (.....) Π calculada para pH 4,5, $\circ$ valores experimentais para pH 4,8, (-----) Π calculada para pH 4,8, $\square$ valores experimentais para pH 5,4, (.....) Π calculada para pH 5,4, * valores experimentais para pH 7,4, (.....) Π calculada para pH 7,4 e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 41: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu *et al.* (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,5M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,5, (.....) Π calculada para pH 4,5, $\circ$ valores experimentais para pH 4,8, (-----) Π calculada para pH 4,8, $\square$ valores experimentais para pH 5,4, (-·-·-·-) Π calculada para pH 5,4, * valores experimentais para pH 7,4, (-·-·-·-) Π calculada para pH 7,4 e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 42: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu *et al.* (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,5, (.....) Π calculada para pH 4,5, $\circ$ valores experimentais para pH 4,8, (-----) Π calculada para pH 4,8, $\square$ valores experimentais para pH 5,4, (-·-·-·-) Π calculada para pH 5,4, * valores experimentais para pH 7,4, (-·-·-·-) Π calculada para pH 7,4 e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 43: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu *et al.* (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1,5M. $\diamond$ valores experimentais para pH 4,5, (.....) Π calculada para pH 4,5, $\circ$ valores experimentais para pH 4,8, (-----) Π calculada para pH 4,8, $\square$ valores experimentais para pH 5,4, (-----) Π calculada para pH 5,4, * valores experimentais para pH 7,4, (-----) Π calculada para pH 7,4 e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

As análises feitas anteriormente, fixando o valor do pH e variando a força iônica, também podem ser feitas para os dados estudados por Lu *et al.*, conforme as Figuras 44 a 47. Para quase todos os casos, os maiores valores para a pressão osmótica (para uma mesma concentração proteica) foram observados em concentração de 0,5M, e os menores, para a concentração de 1,5M. Na Figura 45, assim como a análoga Figura 38, para as menores concentrações as pressões osmóticas ficaram bem próximas, pelo fato do pH analisado estar próximo ao ponto isoelétrico. Para a concentração de 0,5M e 1,0M, as pressões osmóticas sempre estão bem próximas, exceto para o pH 4,8, próximo ao ponto isoelétrico.

Os parâmetros ajustados representam bem os dados experimentais, conforme pode ser observado nas Figuras 40 a 43. Em todos os casos (embora menos nitidamente para a curva em força iônica 0,15 M), os menores valores de pressão osmótica foram apresentados para o pH mais próximo ao ponto isoelétrico.

Figura 44: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu *et al.* (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH 4,5. $\diamond$ valores experimentais para 0,15M, (.....) Π calculada para 0,15M, $\circ$ valores experimentais para 0,5M, (-----) Π calculada para 0,5M, $\square$ valores experimentais para 1,0M, (-·-·-·-) Π calculada para 1,0M, * valores experimentais para 1,5M, (-·-·-·-) Π calculada para 1,5M e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 45: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu *et al.* (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH 4,8. $\diamond$ valores experimentais para 0,15M, (.....) Π calculada para 0,15M, $\circ$ valores experimentais para 0,5M, (-----) Π calculada para 0,5M, $\square$ valores experimentais para 1,0M, (-·-·-·-) Π calculada para 1,0M, * valores experimentais para 1,5M, (-·-·-·-) Π calculada para 1,5M e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 46: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu *et al.* (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH 5,4. $\diamond$ valores experimentais para 0,15M, (.....) Π calculada para 0,15M, $\circ$ valores experimentais para 0,5M, (-----) Π calculada para 0,5M, $\square$ valores experimentais para 1,0M, (- - - - -) Π calculada para 1,0M, * valores experimentais para 1,5M, (- · - · - · -) Π calculada para 1,5M e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 47: Pressão osmótica para a BSA obtida por Lu *et al.* (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH 7,4. $\diamond$ valores experimentais para 0,15M, (.....) Π calculada para 0,15M, $\circ$ valores experimentais para 0,5M, (-----) Π calculada para 0,5M, $\square$ valores experimentais para 1,0M, (- - - - -) Π calculada para 1,0M, * valores experimentais para 1,5M, (- · - · - · -) Π calculada para 1,5M e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Através dos valores obtidos para o termo atrativo, foi possível verificar a dependência dos mesmos com o pH e com a concentração da força iônica, através da Figura 48 e 49. Porém, observa-se que o termo atrativo para a BSA não apresenta nenhuma tendência evidente com relação à variação de concentração de sal e à variação do valor do pH.

Comparando os resultados com aqueles da modelagem de soluções de BSA contendo polímeros como co-solventes, Figuras 34 a 36, observa-se que a equação proposta representa melhor os valores experimentais obtidos por Lu *et al.* (2009) que por Alves *et al.*, (2010).

Figura 48: Termo atrativo em função do pH para os dados obtidos por Lu *et al.* (2009) em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. ◇ valores experimentais para 0,15M, ○ valores experimentais para 0,50M, □ valores experimentais para 1,00M e * valores experimentais para 1,50M.

Figura 49: Termo atrativo em função do pH para os dados obtidos por Lu *et al.* (2009) em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. ◇ valores experimentais para pH 4,5, ○ valores experimentais para pH 4,8, □ valores experimentais para pH 5,4 e * valores experimentais para pH 7,4

Wu *et al.* (1999) também obtiveram resultados experimentais para a BSA em soluções de cloreto de sódio, considerando altas concentrações de sal. Nesse caso, os valores do termo atrativo estão representados na Tabela 6.

Tabela 6: Condições e termo atrativo para a BSA em soluções contendo cloreto de sódio. Dados experimentais obtidos a 25°C por Wu *et al.* (1999).

NaCl	pH	a (Pa·m ⁶ ·mol ⁻²)	FO a=0	FO a calc	FO EV
1 M	4,5	1250	2,6849	1,3385	1,3831
	7,4	-233	0,2712	0,1463	0,1514
3 M	5,4	800	2,6437	0,8847	1,0633
	7,4	730	1,1476	0,3234	0,3676
5 M	5,4	1600	4,5869	1,5595	1,7010
	7,4	813	1,9470	0,2080	0,3133

De maneira geral, observa-se a mesma tendência que na análise dos dados de Lu *et al.* (2009): o valor de a aumenta à medida que o valor do pH se aproxima do ponto isoelétrico.

O comportamento da pressão osmótica calculada usando a equação proposta está apresentado nas Figuras 50 a 52. Como observado, o modelo representou muito

bem os dados experimentais, nas diferentes forças iônicas e nos diferentes valores de pH. Apenas na situação de pH 5,4 e concentração salina de 5M o modelo não se aproximou muito dos dados experimentais. Especificamente, observa-se na Figura 50 que o parâmetro atrativo negativo está ligado ao fato de os dados experimentais mostrarem uma pressão osmótica maior do que aquela calculada pelo termo repulsivo somente.

Figura 50: Pressão osmótica para a BSA obtida por Wu *et al.* (1999) em soluções de NaCl a 1M. $\diamond$ valores experimentais para pH 7,4, (.....) Π calculada para pH 7,4, $\circ$ valores experimentais para pH 4,5, (-----) Π calculada para pH 4,5, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 51: Pressão osmótica para a BSA obtida por Wu *et al.* (1999) em soluções de NaCl a 3M. $\diamond$ valores experimentais para pH 7,4, (.....) Π calculada para pH 7,4, $\circ$ valores experimentais para pH 5,4, (-----) Π calculada para pH 5,4, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 52: Pressão osmótica para a BSA obtida por Wu *et al.* (1999) em soluções de NaCl a 5M. $\diamond$ valores experimentais para pH 7,4, (.....) Π calculada para pH 7,4, $\circ$ valores experimentais para pH 5,4, (-----) Π calculada para pH 5,4, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

A visualização do comportamento da pressão osmótica fixando-se o pH e variando-se a força iônica pode ser feita nas Figura 53 a 54. A análise, nesse caso, é bastante direta.

O modelo representou muito bem os dados experimentais, melhor que os resultados obtidos por Alves *et. al.* (2010) e até mesmo melhor que os obtidos por Lu *et al.* (2009). Em conjunto, os resultados mostram que o comportamento observado em soluções poliméricas não está relacionado à proteína em si, mas é resultante, claramente, do co-solvente utilizado. A consideração da mistura solvente + polímero como um meio contínuo indiferenciado, hipótese subjacente a todas as equações osmóticas de estado, talvez seja excessivamente forte no caso de soluções poliméricas: como interações polímero-proteína podem ter de ser levada em conta, a adoção de uma equação volumétrica de estado que não contemple o polímero como um segundo soluto pode ser inadequada.

Nota-se que os valores do parâmetro atrativo para a BSA para todos os co-solventes são altos em pH próximo ao ponto isoelétrico. Entretanto, considerando-se os valores obtidos, não é possível definir uma única correlação para o parâmetro atrativo em função de pH e força iônica ou concentração polimérica.

Figura 53: Pressão osmótica para a BSA obtida por Wu *et al.* (1999) em soluções de NaCl e pH 5,4. $\diamond$ valores experimentais para 3M, ($\cdots$) Π calculada para 3M, $\circ$ valores experimentais para 5M, ($---$) Π calculada para 5M, e ($—$) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 54: Pressão osmótica para a BSA obtida por Wu *et al.* (1999), em soluções contendo PEG 2000 e pH 7,4. $\diamond$ valores experimentais para 1M, (.....) Π calculada para 1M, $\circ$ valores experimentais para 3M, (-----) Π calculada para 3M, $\square$ valores experimentais para 5M, (-.-.-.-.-) Π calculada para 5M, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

5.4 IMUNOGLOBULINA G

Alves *et al.* (2011) estudou também o comportamento da pressão osmótica em soluções de imunoglobulina G humana, IgG, em soluções aquosas contendo como co-solvente o sal cloreto de sódio, NaCl. A amostra estudada é na verdade uma mistura farmacêutica de Imunoglobulinas G, pois não se tratava de anticorpo monoclonal. De maneira geral, considera-se que a IgG possua massa molar próxima a 150.000 g/mol. Não é possível definir um ponto isoelétrico: considera-se que haja uma faixa em que os pontos isoelétricos se localizem, geralmente entre 5,8 e 8,5.

As condições experimentais e os resultados obtidos para o cálculo do parâmetro atrativo estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Condições e termo atrativo para a IgG humana em soluções poliméricas contendo NaCl. Dados experimentais obtidos a 25°C por Alves *et al.* (2010).

Fração mássica de NaCl	pH	a (Pa·m ⁶ ·mol ⁻²)	a min	FO $a=0$	FO a calc	FO EV
0,9%	6	825	890	2,1785	0,7669	0,8412
	7	1600	1590	5,8435	1,3177	1,4445
	8	1000	1195	2,9215	0,9275	1,0073
5,0%	6	660	730	1,1846	0,2731	0,3080
	7	1345	1390	3,0887	0,8685	0,9255
	8	885	895	1,6373	0,3344	0,3725
10,0%	6	1400	1430	2,338	0,7615	0,7892
	7	2000	2050	3,0090	0,6961	0,7214
	8	2150	2055	3,3701	0,9194	0,9510
15,0%	7	3200	3680	2,5366	0,4893	0,4986

Conforme pode ser observado nas Figuras 55 a 57, o modelo foi capaz de representar adequadamente os dados experimentais que pressão osmótica na maioria das condições estudadas. Observa-se que à medida que a concentração de cloreto de sódio aumenta, reduzem-se os valores de pressão osmótica, o que traz como consequência um aumento no parâmetro atrativo. Em concentrações salinas mais baixas, o efeito do pH no parâmetro atrativo é maior; a presença de sal em altas concentrações gera um efeito de blindagem, diminuindo a importância relativa da repulsão eletrostática. Sabe-se que o NaCl pode agir como agente precipitante, especialmente nos casos de proteínas para uso farmacêutico; dessa maneira, espera-se que o valor de a aumente com o aumento de sua concentração, o que efetivamente ocorre. O fato de o valor do parâmetro atrativo ser maior em pH próximos a 7,0 indica que, em média, nessas circunstâncias o número de moléculas carregadas deve tender a ser menor. Entretanto, como visto, não se pode falar de um ponto isoelétrico nesse caso.

Figura 55: Pressão osmótica para IgG obtida por Alves *et al.* (2011), em soluções contendo 0,9% de NaCl. $\diamond$ valores experimentais para pH 6, (·····) Π calculada para pH 6, $\square$ valores experimentais para pH 7, (-----) Π calculada para pH 7, $\circ$ valores experimentais para pH 8, (-·-·-·-) Π calculada para pH 8, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 56: Pressão osmótica para IgG obtida por Alves *et al.* (2011), em soluções contendo 5% de NaCl. $\diamond$ valores experimentais para pH 6, (·····) Π calculada para pH 6, $\square$ valores experimentais para pH 7, (-----) Π calculada para pH 7, $\circ$ valores experimentais para pH 8, (-·-·-·-) Π calculada para pH 8, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 57: Pressão osmótica para IgG obtida por Alves *et al.* (2011), em soluções contendo 10% de NaCl. $\diamond$ valores experimentais para pH 6, (.....) Π calculada para pH 6, $\square$ valores experimentais para pH 7, (-----) Π calculada para pH 7, $\circ$ valores experimentais para pH 8, (-.-.-.-) Π calculada para pH 8, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Também podem ser analisados os resultados considerando-se as diversas concentrações salinas em um mesmo pH, conforme as Figuras 58 a 60. Nestas figuras observa-se mais claramente que, de modo geral, o modelo é mais adequado para concentrações menores de proteína.

De modo geral, os resultados mostram que, para a modelagem da pressão osmótica em função da concentração, é possível considerar a imunoglobulina como um único pseudo-componente – mesmo considerando, nesse caso, a impossibilidade de se definir um ponto isoelétrico único, por exemplo.

Figura 58: Pressão osmótica para IgG obtida por Alves *et al.* (2011), em soluções contendo NaCl e pH 6. $\diamond$ valores experimentais para 0,9%, (.....) Π calculada para pH 0,9%, $\circ$ valores experimentais para 5%, (-----) Π calculada para 5%, $\square$ valores experimentais para 10%, (-·-·-·-·-) Π calculada para 10%, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 59: Pressão osmótica para IgG obtida por Alves *et al.* (2011), em soluções contendo NaCl e pH 7. $\diamond$ valores experimentais para 0,9%, (.....) Π calculada para pH 0,9%, $\square$ valores experimentais para 5%, (-----) Π calculada para 5%, $\circ$ valores experimentais para 10%, (-·-·-·-·-) Π calculada para 10%, * valores experimentais para 15%, (-·-·-·-·-) Π calculada para 15% e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 60: Pressão osmótica para IgG obtida por Alves *et al.* (2011), em soluções contendo NaCl e pH 8. $\diamond$ valores experimentais para 0,9%, (.....) Π calculada para pH 0,9%, $\circ$ valores experimentais para 5%, (-----) Π calculada para 5%, $\square$ valores experimentais para 10%, (-·-·-·-·-) Π calculada para 10%, e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

5.5 COMPARAÇÃO DO MODELO COM A EQUAÇÃO VIRIAL

A equação virial constitui a equação mais utilizada na interpretação de dados experimentais de pressão osmótica de soluções proteicas. Com a finalidade de confrontar a equação proposta com a equação virial, as figuras seguintes apresentam resultados para alguns sistemas.

Na utilização da equação virial, o valor do coeficiente B_{22} foi limitado pela impossibilidade desta equação em prever, por si só, a separação de fases – ou seja, na situação em que a equação (31) é satisfeita.

Figura 61: Pressão osmótica para Lisozima obtida por Moon *et al.* (2000) em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 1M e pH 8. $\diamond$ dados experimentais, (.....) Π calculada pela equação proposta, (-----) Π calculada para equação Virial e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 62: Pressão osmótica para a α -quimotripsina obtida por Haynes *et al.* (1992), em soluções de NaH_2PO_4 em 0,1M e pH 9. $\diamond$ valores experimentais, (.....) Π calculada pela equação proposta, (-----) Π calculada para equação Virial e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 63: Pressão osmótica a BSA obtida por Alves *et al.* (2010), em soluções contendo 2% de PEG 2000 e pH 5. $\diamond$ valores experimentais, (.....) Π calculada pela equação proposta, (-----) Π calculada para equação Virial e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 64: Pressão osmótica a BSA obtida por Lu *et al.* (2009), em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 0,5M e pH 7,4. $\diamond$ valores experimentais, (.....) Π calculada pela equação proposta, (-----) Π calculada para equação Virial e (——) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 65: Pressão osmótica a BSA obtida por Wu *et al.* (1999) em soluções de NaCl em 3M e pH 5,4. $\diamond$ valores experimentais, (.....) Π calculada pela equação proposta, (-----) Π calculada para equação Virial e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Figura 66: Pressão osmótica a IgG obtida por Cruvinel *et al.* (2011) em soluções de NaCl em 5% e pH 7. $\diamond$ valores experimentais, (.....) Π calculada pela equação proposta, (-----) Π calculada para equação Virial e (—) Π calculada desconsiderando o termo atrativo, com $a = 0$.

Observa-se que, em todos os casos, a equação proposta representa mais adequadamente a pressão osmótica do que a equação virial. Do ponto de vista de

parâmetros a determinar, a principal diferença entre as duas equações é o termo de esferas rígidas – a equação virial usa o termo ideal, enquanto a equação proposta usa o termo de Carnahan-Starling, mais correto. É interessante observar que a inclinação das curvas, quando a concentração de proteína tende a zero, é a mesma, tanto para a equação proposta (com os valores de parâmetro atrativo ajustado ou com $a=0$) quanto para a equação virial. É claro que, nesse limite, todas as equações tenderão ao mesmo resultado (solução ideal). O fato de as equações desviarem para concentrações relativamente baixas de proteína é um resultado inesperado, e faz com que se possa questionar o uso corrente da equação virial mesmo em concentrações relativamente altas de proteína.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho apresentou-se o desenvolvimento de uma equação volumétrica de estado para a modelagem da pressão osmótica de dados experimentais de soluções proteicas contendo co-solventes. De maneira geral, o uso de um termo repulsivo (esferas rígidas) de Carnahan-Starling em conjunto com um termo atrativo de van der Waals permitiu uma correlação adequada de dados experimentais de proteínas como a lisozima, a α -quimotripsina, a albumina de soro bovino e a imunoglobulina G.

Os resultados apresentados mostraram que o tipo e a concentração do co-solvente considerado têm influência considerável sobre o valor do parâmetro atrativo. O valor do parâmetro atrativo da equação está também relacionado ao pH da solução, e o efeito da variação do pH no parâmetro atrativo é também dependente do tipo e da concentração de co-solvente.

Entretanto, apesar dos resultados mostrarem uma dependência entre os fatores avaliados, as tendências apresentadas pelo parâmetro atrativo para os dados experimentais estudados não permitiram o desenvolvimento de um modelo completamente preditivo. Foi possível observar que, para uma mesma proteína, os valores do parâmetro atrativo são próximos e se situam em uma mesma faixa, quando considerados diferentes co-solventes (como no caso da albumina de soro bovino), mas não foi possível desenvolver equações gerais para o parâmetro atrativo em função de pH e da concentração de co-solventes.

A eventual ocorrência de dimerização precisa ser levada em conta no modelo para a pressão osmótica – a desconsideração desse fenômeno na modelagem de dados de α -quimotripsina levou a resultados totalmente inadequados.

Finalmente, a comparação com a equação virial mostrou que a equação proposta é superior à equação do virial. Considerando-se a faixa de concentrações proteicas estudadas, e o fato de que ambas as equações são equivalentes do ponto de vista de parâmetros a determinar, isso mostra que os desvios do comportamento ideal devidos simplesmente ao tamanho das moléculas proteicas são relevante mesmo em concentrações mais baixas.

Finalmente, a principal conclusão é que, na faixa de concentrações em que dados experimentais de pressão osmótica podem ser experimentalmente obtidos, uma equação relativamente simples, composta por um termo de esferas rígidas e um termo atrativo de fase randômica, pode ser suficiente para ajustar corretamente os dados experimentais e, portanto, ser utilizada em aplicações de Engenharia Química nas quais este cálculo seja necessário.

6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A principal limitação no desenvolvimento de modelos para soluções proteicas está na escassez relativa de dados experimentais. Desse modo, sugere-se para trabalhos futuros a obtenção de dados experimentais de pressão osmótica de soluções proteicas em condições diversas (co-solventes e pH), tanto para as proteínas estudadas nesse trabalho como para outras proteínas de uso comercial importante. Também se sugere que, em conjunto com a obtenção desses dados, haja uma caracterização adequada das proteínas estudadas, por meio da obtenção de curvas de carga em função do pH, avaliação de pureza por eletroforese, entre outras técnicas. No que diz respeito à modelagem, a comparação com outras formas de termos atrativos pode ser também uma abordagem interessante a ser tentada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, K. C. N., Comunicação pessoal, 2011.

CARNAHAN, N. F., STARLING, K. E. *Equation of State for Nonattracting Rigid Spheres*. Journal of Chemical Physics., v 51, p 635, 1969

FORNASIERO, F., ULRICH, J., PRAUSNITZ, J. M. *Molecular thermodynamics of precipitation*. Chemical Engineering and Processing, v. 38, p. 463-475, 1999.

FU, D., LI, Y., WU, J. *Effect of the range of attractive on crystallization, metastable phase transition, and percolation in colloidal dispersions*. Physical Review, v. 68, p. 1244-1260, 2001.

GEORGE, A., WILSON, W. W. *Predicting protein crystallization from a dilute solution property*. Acta Crystallographica Section D, v.50, p 361-365, 1994.

HAMAKER, H.C. *The London-van der Waals attraction between spherical particles*. Physica, v 4, p 1058-1072, 1937.

HAYNES, C. A., TAMURA, K., KÖRFER, H. R., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M. *Thermodynamic properties of aqueous α -quimotripisina solutions from membrane osmometry measurements*. Journal Physical Chemistry., v. 96, p 905-912, 1992.

LU, Y., CHEN, D. J., WANG, G. K., YAN, C. L. *Study of Interactions of Bovine Serum Albumin in Aqueous (NH₄)₂SO₄ Solution at 25 °C by Osmotic Pressure Measurements*. Journal of Chemical and Engineering, v. 54, p 1975–1980, 2009.

LIMA, E. R. A., BISCAIA Jr., E. C., BOSTRÖM, M., TAVARES, F. W., PRAUSNITZ, J. M. *Osmotic Second Virial Coefficients and Phase Diagrams for Aqueous Proteins from a Much-Improved Poisson-Boltzmann Equation*. Journal Physical. Chemistry, v. 111, p 16055-16059, 2007.

MANSOORI, G. A., CARNAHAN, N. F., STARLING, K. E., LELAND, T. W. *Equilibrium Thermodynamic Properties of the Mixture of Hard Spheres*. Journal of Chemical Physics., v 54, p 1523, 1971.

McMILLAN, W. G., MAYER, J. E., *Journal of Chemical Physics.*, v 13, n 7, p 276–305, 1945.

MIRELES, I. H., BENAVIDES, J. E. RITO-PALOMARES, M. *Practical Approach to Protein Recovery by Countercurrent Distribution in Aqueous Two-Phase Systems.* *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, p. 163-166, 2008.

MOON, Y. U., Anderson, C. O., Blanch, H. W., PRAUSNITZ, J. M. *Osmotic pressures and second virial coefficients for aqueous saline solutions of lysozyme.* *Fluid Phase Equilibria*, v. 168, p 229-39, 2000.

MOORE, W. J. *Physical Chemistry*, 4^o Edição, Nova Jersey: Prentice Hall, 1972.

PRAUSNITZ, J. M., LICHTENTHALER, R. N., AZEVEDO, E. G. *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria.* Editora Upper Saddle River, Prentice Hall, 3^a Edição, 1998.

PRAUSNITZ, J. M. *Molecular thermodynamics for some applications in biotechnology.* *Pure and Applied Chemistry*, v. 75, p. 859-873, 2003.

PESSÔA FILHO, P. A., MOHAMED, R. S. *A chemical theory based equation of state for self-associating compounds.* *Thermochimica Acta*, v. 328, p. 65-71, 1999.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C. e ABBOTT, M. M. *Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química.* Editora LTC, 5^a Edição, 2000.

TAVARES, F. W., PRAUSNITZ, J. M. *Analytic calculation of phase diagrams for solutions containing colloids on globular proteins.* *Colloid and Polymer Science*, v. 282, p. 620-632, 2004.

VILKER, V. L., COLTON, C. K., SMITH, K. A. *The osmotic pressure of concentrated protein-solutions: effect of concentration and pH in saline solutions of bovine serum albumin.* *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 79, p 548-566, 1981.

YOUSEF, M. A., DATTA, R., RODGERS, V. G. J. *Free-Solvent Model os Osmotic Pressure Revisited: Application to Concentrated IgG Solution under Physiological Conditions.* *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 199, p 108-118, 1998a.

YOUSSEF, M. A., DATTA, R., RODGERS, V. G. J. *Understanding Nonidealities of the Osmotic Pressure of Concentrated Bovine Serum Albumin*. Journal of Colloid and Interface Science, v. 207, 273-282, 1998b.

YOKOZEKI, A. *Osmotic pressure studied using a simple equation-of-state and its applications*. Applied Energy, v.83,p.15-41, 2006.

WU, J., Prausnitz, J. M. *Osmotic pressure of aqueous serum albumin solutions at high ionic strength*. Fluid Phase Equilibria, v. 155, p 139-54, 1999.