

Kelly Cristina Nascimento Alves

Contribuições ao Estudo da Não-Idealidade de Soluções Proteicas

São Paulo
2013

Kelly Cristina Nascimento Alves

Contribuições ao Estudo da Não-Idealidade de Soluções Proteicas

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

São Paulo
2013

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, de maio de 2013.

Assinatura do autor _____

Assinatura do orientador _____

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Kelly Cristina Nascimento
Contribuições ao estudo da não-idealidade de soluções
protéicas / K.C.N. Alves. – versão corr. -- São Paulo, 2013.
180 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de
São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1. Termodinâmica (Modelagem) 2. Membranas de separação
3. Soluções protéicas 4. Não-idealidade 5. Osmometria de mem-
brana I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departa-
mento de Engenharia Química II. t.

Kelly Cristina Nascimento Alves

Contribuições ao Estudo da Não-Idealidade de Soluções Proteicas

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

Área de concentração:
Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Alcântara
Pessôa Filho

São Paulo
2013

Dedicatória

***Dedico este trabalho à minha
família.***

Agradecimentos

Neste momento único não poderia deixar de expressar minha imensa gratidão e apreço pelas pessoas especiais que contribuíram para essa importante etapa.

A toda minha família, em especial minha avó e minha mãe, que sempre acreditaram no meu potencial, pela confiança, apoio e carinho sempre presentes.

Ao meu marido pelo amor e companheirismo inestimáveis.

Ao meu filho João Pedro, pelo seu amor, carinho e sorrisos constantes... Por simplesmente existir em minha vida!

Ao orientador Prof. Dr. Pedro Pessoa pela orientação, ensinamentos, incentivo e apoio constante; sobretudo pela confiança em mim depositada ao longo do trabalho.

À Prof^a. Dr^a, Bibiana Nerli pela amizade, dedicação, por contribuir e agregar seus conhecimentos neste trabalho.

Aos meus amigos e professores que contribuíram de maneira direta ou indiretamente colaboraram na concretização deste projeto.

Ao CNPQ, CAPES e FAPESP pelo incentivo financeiro concedido.

"O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a veemência e perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá os obstáculos, e, se não atingir o alvo fará, pelo menos, coisas admiráveis".

(Dale Carnegie)

Resumo

O estudo de soluções proteicas visando à modelagem e à simulação de processos de recuperação e purificação de bioprodutos passa necessariamente pelo estudo da não idealidade, em sentido termodinâmico, destas soluções. Para sistemas em que a concentração de proteína seja baixa, situação comumente presente nestes processos, a principal maneira de avaliar experimentalmente a não idealidade é por meio da determinação da pressão osmótica gerada pela proteína. Deste modo, os objetivos deste trabalho foram: estudar a influência de co-solventes na pressão osmótica de soluções proteicas, verificar a integridade das estruturas secundária e terciária das proteínas nessas soluções, e modelar termodinamicamente os dados de pressão osmótica obtidos. A pressão osmótica foi determinada diretamente por osmometria de membrana, usando soluções de referência com mesma concentração de co-solvente e pH, mas isentas de proteínas. Obtiveram-se dados de pressão osmótica, em função da concentração proteica, de cinco diferentes proteínas (albumina de soro bovino, imunoglobulina G humana, ovalbumina, β -lactoglobulina e lisozima) em soluções contendo co-solventes como o polietileno glicol (de diversos tamanhos de cadeia) e sais (sulfato de amônio, sulfato de sódio e cloreto de sódio). Cada conjunto de dados foi obtido em pH e concentração de co-solvente constantes. Observou-se que a presença de co-solventes altera a pressão osmótica, mas este efeito é dependente da proteína, do co-solvente e sua concentração, e do pH da solução. Medidas de fluorescência e de dicróismo circular das mesmas proteínas permitiram confirmar que elas mantêm sua integridade estrutural nesses meios, o que justifica o uso de equações volumétricas de estado com parâmetros constantes. Os dados de pressão osmótica em função da concentração proteica foram correlacionados por meio de uma equação volumétrica de estado, que combina um termo de esferas rígidas adesivas e um termo de perturbação de ordem zero (aproximação aleatória). O modelo proposto, embora simples, foi suficiente para correlacionar adequadamente o comportamento experimental.

Palavras-chave: Modelagem termodinâmica, soluções proteicas, não-idealidade, osmometria de membrana.

Abstract

The study of protein solutions aiming at the modeling and simulation of downstream processes entails the study of non-ideality (in thermodynamic sense) of these solutions. For systems wherein the protein concentration is low – a situation often encountered in these processes – the most important technique to experimentally evaluate this non-ideality is the determination of the osmotic pressure generated by the protein in solution. Thus, the objectives of this work were: to study the influence of co-solvents on the osmotic pressure of protein solutions, to verify the absence of change in the secondary and tertiary structure of proteins in these solutions, and to thermodynamically model the obtained osmotic pressure data. The osmotic pressure was directly measured through membrane osmometry, using protein-free reference solutions with the same pH and co-solvent concentration. The data of osmotic pressure were obtained as a function of protein concentration for five different proteins (bovine serum albumin, human immunoglobulin G, ovalbumin, β -lactoglobulin and lysozyme) in solution with co-solvents such as polyethylene glycol (of various chain sizes) and salts (ammonium sulfate, sodium sulfate and sodium chloride). Each data set was obtained at constant pH and co-solvent concentration. It was observed that the presence of co-solvents do shift the osmotic pressure, but this effect is dependent on the protein, the co-solvent and its concentration, and the solution pH. Measurements of fluorescence and circular dichroism of these proteins confirmed that they maintain their structure unchanged in the media, which corroborates the use of volumetric equations of state with constant parameters. The osmotic pressure data as a function of protein concentration were correlated using an osmotic equation of state comprising a repulsive term of adhesive hard spheres and a zero-order perturbation term (random approximation). The proposed model, though simple, was sufficient to properly correlate the experimental behavior.

Keywords: thermodynamic modeling, protein solutions, non-ideality, membrane osmometry.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Eletroforese em gel da BSA. a – proteína BSA dessalinizada e b – proteína BSA em forma comercial.....42
- Figura 2.** Pressão osmótica para sistemas contendo BSA dessalinizada variando a concentração de PEG 2000 em pH = 4,0 a 298,15 K. \diamond - 0,5%, \square - 1,0%, Δ - 2,0%, \circ - 4,0%, \times -6,0% em massa de PEG 2000.....52
- Figura 3.** Pressão osmótica para sistemas contendo BSA dessalinizada variando a concentração de PEG 2000 em pH = 5,0 a 298,15 K. \diamond - 0,5%, \square - 1,0%, Δ - 2,0%, \circ - 4,0%, \times -6,0% em massa de PEG 2000.....52
- Figura 4.** Pressão osmótica para sistemas contendo BSA dessalinizada variando a concentração de PEG 2000 em pH = 6,0 a 298,15 K. \diamond - 0,5%, \square - 1,0%, Δ - 2,0%, \circ - 4,0%, \times -6,0% em massa de PEG 2000.....53
- Figura 5.** Pressão osmótica para sistemas contendo BSA dessalinizada variando a concentração de Na₂SO₄ em pH = 5,0 a 298,15 K. \blacksquare – solução tamponada, \diamond - 1,0%, \square - 5,0%, Δ - 10,0%, \times - 15,0% em massa de sulfato de sódio.....53
- Figura 6.** Função ψ para cálculo do segundo coeficiente virial osmótico da BSA em soluções de PEG 2000 em pH = 4,0. \diamond – 0,5% de PEG; \square – 1,0% de PEG; Δ – 2,0 % de PEG, \circ – 4,0% de PEG, \blacklozenge – 6,0% de PEG.....56
- Figura 7.** Espectro de fluorescência pra diferentes valores de pH para o sistema contendo BSA em soluções tamponadas a 20mM acetato a 298,15K. Linha tracejada – pH = 4,0; linha contínua - pH =5,0; linha pontilhada - pH = 6,0.....59
- Figura 8.** Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta – buffer pH = 4,0; linha amarela –

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

