

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA COM MIOGLOBINA PARA A
PERMEAÇÃO SELETIVA DE OXIGÊNIO

Kátia Cecília de Souza Figueiredo

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:

Prof. Cristiano Piacsek Borges, D. Sc.

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof. Alberto Cláudio Habert, Ph.D.

Profa. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.

Profa. Maria Eugênia Ribeiro de Sena Piacsek Borges, D.Sc.

Prof. Rodrigo Lambert Oréfice, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MAIO DE 2008

FIGUEIREDO, KATIA CECILIA DE SOUZA

Desenvolvimento de Membrana com
Mioglobina para a Permeação Seletiva de
Oxigênio [Rio de Janeiro] 2008

X, 202 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc.,
Engenharia Química, 2008)

Tese – Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Membranas de transporte facilitado
2. Biotransportadores de oxigênio
3. Poli(álcool vinílico)
4. Imobilização

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

Aos meus queridos pais,
Almir e Maria José.

Motivo

Eu canto porque o instante existe
e a minha vida está completa.
Não sou alegre nem sou triste:
sou poeta.

Irmão das coisas fugidias,
não sinto gozo nem tormento.
Atravesso noites e dias
no vento.

Se desmorono ou se edifico,
se permaneço ou me desfaço,
— não sei, não sei. Não sei se fico
ou passo.

Sei que canto. E a canção é tudo.
Tem sangue eterno a asa ritmada.
E um dia sei que estarei mudo:
— mais nada.

Cecília Meireles

Agradecimentos

A Deus, por ter me guiado durante toda esta jornada. Nada seria possível sem Ti.

Aos meus pais, Maria José e Almir, pela força constante e por acreditarem em mim sempre e incondicionalmente. Vocês são um exemplo que tento seguir em todos os aspectos da minha vida.

Ao Carlos, meu querido irmão de sangue e de coração, pela amizade, carinho e companheirismo.

A toda a minha família. O apoio de vocês foi, é e será sempre fundamental para mim. Wandinha e Maninho, obrigada pela acolhida e pelo incentivo.

Aos amigos do peito, Cláudio Pessoa, Tia Lu, Cristina, Pat, Nandinha e Dri. Obrigada pela força, paciência, companhia e amizade.

Ao Programa de Engenharia Química, professores, colaboradores, pesquisadores, pessoal de apoio técnico e administrativo, pela disponibilização de infra-estrutura de alto nível para a realização dos meus ensaios.

À Beth e ao Roberto Bastos, pela atenção e disposição em contribuir para a realização do trabalho. À Márcia, do IMA, pelas análises de FTIR. Ao Orlean e ao Walmir, pela solicitude.

Aos colegas do PAM e do Laboratório de Bioprocessos, pelo companheirismo e atenção.

À Jane, pelo auxílio e pela amizade.

Ao Grupo de Tecnologia de Membranas, pelos ensinamentos e pela acolhida carinhosa durante o período de estágio sanduíche na Holanda. Em especial, ao Prof. Matthias Wessling, Prof. Dimitrios Stamatialis, Wilbert, Jens e Greet.

À Eef e ao Ramon, pela hospitalidade e companheirismo.

Ao Tito, pela orientação e pelos ensinamentos. Pelo zelo na condução dos trabalhos, pela disponibilidade em ajudar, pela provocação de discussões sobre a tese e também por estar sempre aberto a novas interpretações e análises.

Ao Cristiano, meu eterno orientador, pelo apoio, dedicação, capacidade de ouvir, ponderar e ressaltar os aspectos positivos. Pela praticidade na condução da orientação e proposição de ensaios. Definitivamente, você é um bom pastor. Obrigada pela classe e serenidade em todos os momentos. Obrigada pelas inúmeras oportunidades concedidas a mim para mostrar meu trabalho. Aprendi muito com você e tenho certeza que continuarei aprendendo.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA COM MIOGLOBINA PARA A
PERMEAÇÃO SELETIVA DE OXIGÊNIO

Kátia Cecília de Souza Figueiredo

Maio/2008

Orientadores: Cristiano Piacsek Borges
Tito Lívio Moitinho Alves

Programa: Engenharia Química

A síntese de membranas de transporte facilitado de oxigênio foi estudada neste trabalho através da imobilização de biotransportadores em matrizes poliméricas. A adição da mioglobina a filmes de poli(álcool vinílico) e de alginato de sódio mostrou que a conformação nativa da proteína é mantida, mas a baixa permeabilidade dos polímeros aos gases atmosféricos motivou a investigação do transporte de oxigênio em fase aquosa. O método utilizado para incorporar a mioglobina e a hemoglobina no poli(álcool vinílico) baseou-se na reação química do polímero e das proteínas com o glutaraldeído em condições mais amenas do que as relatadas na literatura, ou seja, utilizando temperatura de 40°C e pH igual a 6,2. Durante o preparo das membranas, observou-se que a mioglobina foi reduzida para sua forma fisiologicamente ativa, com manutenção de sua estrutura secundária. Testes de inchamento em água e análise térmica revelaram que a biomolécula aumentou a densidade de reticulação do polímero, tornando possível sua utilização em fase aquosa. Por outro lado, os testes de desempenho indicaram que a reação aumentou a afinidade da mioglobina pelo oxigênio, o que inviabilizou a etapa de descomplexação do soluto.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D. Sc.)

DEVELOPMENT OF MEMBRANE WITH MYOGLOBIN FOR THE SELECTIVE
PERMEATION OF OXYGEN

Kátia Cecília de Souza Figueiredo

May/2008

Advisors: Cristiano Piacsek Borges
Tito Lívio Moitinho Alves

Department: Chemical Engineering

The synthesis of oxygen facilitated transport membranes was evaluated in this work by means of the immobilization of biocarriers in polymeric matrices. The addition of myoglobin to membranes of poly(vinyl alcohol) and sodium alginate showed that the native folding was maintained. However, the low permeability of these hydrophilic films led to the investigation of oxygen transport in aqueous phase. The incorporation of myoglobin and hemoglobin in PVA matrix was based on the reaction of the polymer and the protein with glutaraldehyde in operational condition milder than the literature, which means 40°C and pH of 6.2. During membrane preparation, myoglobin was reduced to its physiological active form while the secondary structure was preserved. Water swelling and thermal analysis tests revealed that the biomolecule increased the polymer's crosslinking density, which made possible the use in aqueous medium. On the other hand, performance tests indicated that the reaction with glutaraldehyde increased the affinity between myoglobin and oxygen so that the decouple stage was not viable.

Índice

Capítulo 1: Introdução	1
1.1. Contextualização e justificativa	1
1.2. As membranas de transporte facilitado	1
1.3. Histórico	2
1.4. Objetivo da tese	3
1.5. Estratégia experimental	3
1.6. Estrutura da tese	4
1.7. Originalidade	5
1.8. Referências bibliográficas	6
Capítulo 2: Revisão da literatura	7
2.1. A produção industrial de oxigênio	7
2.2. Os processos de separação através de membranas	8
2.2.1. Fundamentos da separação por membranas	8
2.2.2. A separação de gases	11
2.2.2.1. Membranas aplicadas à separação do oxigênio	13
2.2.3. Membranas de transporte facilitado	16
2.2.3.1. Configuração das membranas e mecanismo de transporte facilitado	18
2.2.3.2. Propriedades que afetam o transporte	24
2.2.3.3. Aplicação das membranas de transporte facilitado para a separação O ₂ /N ₂	27
2.3. Transportadores de oxigênio	32
2.3.1. Transportadores naturais	33
2.3.2. Transportadores sintéticos	38
2.3.3. Interesse renovado nos transportadores naturais	40
2.4. Polímeros hidrofílicos	41
2.4.1. O alginato de sódio	41
2.4.2. O poli(álcool vinílico)	43
2.5. Biomoléculas retidas em polímeros: aplicações	46
2.6. Referências bibliográficas	48
Capítulo 3: Estabilidade estrutural da mioglobina em fase orgânica	54
3.1. Introdução	54
3.2. Objetivo	58
3.3. Materiais e métodos	59
3.3.1. Materiais	59
3.3.2. Caracterização da mioglobina	60
3.3.3. Estabilidade da mioglobina em solventes orgânicos	60
3.3.4. Inversão da polaridade da mioglobina com dodecil sulfato de sódio	62
3.4. Resultados e discussão	63
3.4.1. Caracterização da mioglobina	63
3.4.2. Efeitos dos solventes orgânicos na estrutura da metamioglobina	65
3.4.2.1. Análise preliminar	67
3.4.2.2. Transições conformacionais	68
3.4.3. Inversão da polaridade da mioglobina com SDS	82
3.5. Conclusão	84
3.6. Referências bibliográficas	85

Capítulo 4: Membranas compostas de alginato de sódio contendo mioglobina	87
4.1. Introdução	87
4.2. Objetivo	90
4.3. Materiais e métodos	90
4.3.1. Materiais	91
4.3.2. Ativação da metamioglobina	91
4.3.3. Membranas densas integrais	92
4.3.3.1. Preparo das membranas integrais	92
4.3.3.2. Caracterização das membranas integrais	93
4.3.4. Membranas densas compostas	94
4.3.4.1. Escolha e caracterização do suporte	94
4.3.4.2. Preparo das membranas compostas	94
4.3.4.3. Caracterização das membranas compostas	95
4.3.5. Testes de desempenho	96
4.3.5.1. Permeação de gases	96
4.3.5.2. Permeação em fase líquida	96
4.4. Resultados e discussão	98
4.4.1. Membranas densas integrais	98
4.4.2. Membranas compostas de alginato de sódio reticuladas com cálcio	100
4.4.3. Membranas compostas de alginato de sódio contendo mioglobina	105
4.4.4. Testes de desempenho	108
4.5. Conclusão	109
4.6. Referências bibliográficas	109
Capítulo 5: Estabilização do poli(álcool vinílico) através da reticulação	111
5.1. Introdução	111
5.2. Objetivo	116
5.3. Materiais e métodos	116
5.3.1. Materiais	116
5.3.2. Preparo das membranas	116
5.3.3. Caracterização das membranas	117
5.3.4. Testes de desempenho	118
5.4. Resultados e discussão	119
5.4.1. Reticulação com ácido maleico	119
5.4.2. Reticulação com glutaraldeído catalisada pelo ácido clorídrico	122
5.4.3. Reticulação com glutaraldeído sem ácidos minerais	126
5.5. Conclusão	136
5.6. Referências bibliográficas	137
Capítulo 6: Imobilização da mioglobina e da hemoglobina em poli(álcool vinílico) através da reticulação com glutaraldeído	140
6.1. Introdução	140
6.2. Objetivo	146
6.3. Materiais e métodos	146
6.3.1. Materiais	146
6.3.2. Preparo das membranas	147
6.3.3. Caracterização das membranas	147
6.3.4. Testes de desempenho	147
6.3.5. Testes de afinidade pelo oxigênio	148

6.4. Resultados e discussão	148
6.5. Conclusão	161
6.6. Referências bibliográficas	161
Capítulo 7: Conclusões e sugestões para trabalhos futuros	163
7.1. Conclusão	163
7.2. Sugestões para trabalhos futuros	166
Anexo 1: Características dos compostos orgânicos investigados como solventes da mioglobina	167
Anexo 2: Estudo da plastificação do poli(álcool vinílico)	170
A.2.1. Introdução	170
A.2.2. Objetivo	171
A.2.3. Materiais e métodos	172
A.2.3.1. Materiais	172
A.2.3.2. Preparo das membranas	172
A.2.3.3. Caracterização das membranas	173
A.2.3.4. Testes de permeação gasosa	173
A.2.4. Resultados e discussão	177
A.2.4.1. A água como plastificante do PVA	177
A.2.4.2. Os glicóis como plastificantes do PVA	180
A.2.5. Conclusão	192
A.2.6. Referências bibliográficas	192
Anexo 3: Propriedades do poli(álcool vinílico)	195
Anexo 4: FTIR como ferramenta para determinação da estrutura secundária de proteínas	200

Capítulo 1: Introdução

1.1. Contextualização e justificativa

O emprego do oxigênio molecular como acceptor final de elétrons nos processos respiratórios permitiu uma utilização mais eficiente da energia armazenada em substâncias como a glicose, por exemplo, e significou uma etapa importante na evolução dos seres vivos. Os desenvolvimentos de um sistema circulatório interligando as regiões do organismo e de moléculas específicas para o transporte de oxigênio viabilizaram a existência de diversas estruturas biológicas e permitiram que o tamanho das espécies ultrapassasse alguns milímetros de comprimento (VOET *et al.*, 2000). De modo análogo, a utilização de oxigênio de elevada pureza nos processos industriais, sobretudo nos que envolvem a combustão, permitiria a utilização da energia de modo mais racional. Entretanto, o elevado custo de produção e transporte deste insumo faz com que seja utilizado ar ao invés de oxigênio.

O oxigênio é a terceira maior *commodity* química mundial, com mercado anual superior a 2 bilhões de dólares (DRIOLI e ROMANO, 2001). O processo utilizado para obtenção de oxigênio de elevada pureza baseia-se na destilação criogênica do ar atmosférico. Este método já está bastante amadurecido do ponto de vista tecnológico e as usinas são bastante eficientes, termicamente isoladas e compactas (SHREVE e BRINK JR, 1997). Entretanto, o gasto energético associado à separação é bastante elevado, pois o processamento envolve o emprego de compressores, bombas e outros equipamentos que aumentam os custos e inviabilizam a utilização de oxigênio puro em muitas aplicações.

Desta forma, o desenvolvimento de um processo alternativo para separar o oxigênio proveniente do ar atmosférico é uma área de pesquisa estratégica, considerando o tamanho do mercado e a versatilidade do produto (BAKER, 2002).

1.2. As membranas de transporte facilitado

Os processos de separação através de membranas são energeticamente menos intensivos que a destilação convencional, além de serem modulares. Entretanto, o uso da separação

de gases para promover o fracionamento do ar atmosférico é limitado, considerando a relação inversa observada entre o fluxo permeado e a seletividade.

Membranas de transporte facilitado vêm sendo investigadas com o objetivo de viabilizar a aplicação industrial desta tecnologia. Nestes sistemas, um transportador é adicionado à membrana visando aumentar a especificidade e a taxa de transporte da espécie de interesse, no caso, o oxigênio molecular, da alimentação até o permeado. A ligação entre o transportador e o soluto deve ser reversível, de modo que o primeiro seja regenerado ao final do processo (WAY e NOBLE, 1992).

A elevada seletividade observada para este tipo de membrana vem mantendo o interesse dos pesquisadores no assunto a fim de utilizar esta tecnologia para substituir a destilação criogênica usada convencionalmente.

1.3. Histórico

SCHOLANDER (1960) foi pioneiro a investigar o transporte facilitado de oxigênio através de membranas líquidas suportadas contendo hemoglobina humana como transportador. Os testes revelaram que o fluxo de oxigênio foi aumentado em 8 vezes, mas a desativação da proteína indicou a necessidade de conhecimento da dinâmica da ligação com o oxigênio.

Em seguida, a substituição destes transportadores naturais de oxigênio pelos sintéticos foi investigada, culminando com a publicação de uma patente por pesquisadores norte-americanos (ROMAN e BAKER, 1985). Estes trabalhos foram fundamentais para esclarecer melhor o funcionamento das membranas e evidenciaram que as maiores permeabilidades obtidas via difusão facilitada eram alcançadas em baixas pressões parciais do componente de interesse (NOBLE *et al.*, 1989). Entretanto, o avanço tecnológico esbarrou novamente na instabilidade das membranas.

Membranas poliméricas com transportadores fixos vêm sendo investigadas desde a década de 90, com destaque para os trabalhos de Nishide e colaboradores (NISHIDE *et al.*, 1998), visando ligar quimicamente os transportadores sintéticos à matriz polimérica.

Embora seletividades maiores que 100 tenham sido relatadas, o tempo de vida útil das membranas foi limitado a 3 meses.

A investigação do efeito da porção globina na estabilização dos transportadores naturais de oxigênio e o desenvolvimento de ferramentas da biologia molecular têm justificado a retomada de interesse dos pesquisadores no uso de proteínas nas membranas de transporte facilitado. Assim, a estabilização destes biotransportadores em matrizes poliméricas com o intuito de produzir membranas seletivas ao oxigênio consiste em um desafio atual, já que a limitação para o emprego desta tecnologia depende na melhoria de desempenho das membranas.

1.4. Objetivo da tese

A partir do que foi exposto anteriormente, o objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de membranas poliméricas de transporte facilitado contendo biotransportadores para a permeação seletiva de oxigênio. Para alcançar estes objetivos, os principais aspectos a serem investigados são:

- a) A estabilização das proteínas mioglobina e hemoglobina em matrizes poliméricas hidrofílicas sem perda de sua atividade biológica. O desenvolvimento de um método de preparo de membranas adequado à incorporação das proteínas é fundamental para garantir um sistema estável e com propriedades de permeação reproduzíveis.
- b) O estudo da influência das variáveis do processo no desempenho das membranas. A afinidade entre o transportador e o soluto pode ser alterada em função de parâmetros como o pH do meio e a temperatura do sistema. O conhecimento do efeito destas variáveis pode determinar o sucesso da aplicação destas membranas.

1.5. Estratégia experimental

Este trabalho reúne as competências do Laboratório de Bioprocessos, na estabilização e caracterização da atividade de biomoléculas, em especial, da mioglobina, e do Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros, na síntese, caracterização e avaliação das propriedades de transporte de membranas poliméricas densas visando o transporte facilitado do oxigênio. Neste aspecto, cumpre destacar que

esta tese é a continuação do trabalho iniciado por FERRAZ (2003), que investigou a estabilização da mioglobina através do uso de ferramentas da biologia molecular e iniciou os estudos de síntese das membranas de transporte facilitado, inaugurando esta linha de pesquisa no Programa de Engenharia Química.

Neste estudo, a estabilização da mioglobina e da hemoglobina foi investigada através da imobilização destas proteínas em matrizes poliméricas de poli(álcool vinílico) e alginato de sódio. A escolha destes polímeros para a síntese das membranas foi baseada na hidrossolubilidade, biocompatibilidade e habilidade destes materiais para a formação de filmes.

A incorporação dos biotransportadores nos filmes poliméricos foi realizada através de métodos químicos e físicos, observando sempre a manutenção da conformação nativa das proteínas. Membranas densas simétricas e assimétricas foram preparadas e o transporte de oxigênio através dos filmes foi medido tanto em fase gasosa como em fase líquida, devido à pequena permeabilidade dos filmes hidrofílicos aos gases oxigênio e nitrogênio.

Os efeitos do pH, da temperatura e da concentração de oxigênio na afinidade das proteínas imobilizadas foram estudados através de técnicas espectrofotométricas e testes de permeação.

1.6. Estrutura da tese

Esta tese está estruturada da seguinte forma:

- No Capítulo 2, é feita uma revisão dos trabalhos publicados na literatura tendo como tópicos principais a produção do oxigênio pelos processos tradicionais, o uso dos processos de separação por membranas para o fracionamento do ar, o desenvolvimento e a evolução dos transportadores de oxigênio, as propriedades dos polímeros hidrossolúveis investigados neste trabalho e a imobilização de biomoléculas em matrizes poliméricas.
- No Capítulo 3, o efeito da adição de solventes orgânicos na estrutura da mioglobina é investigado por meio de técnicas espectroscópicas visando a descoberta de um sistema adequado para a síntese de membranas poliméricas.

- No Capítulo 4, são apresentados os resultados obtidos durante o doutorado sanduíche na Universidade de Twente, na Holanda, em que foram preparadas membranas compostas de alginato de sódio contendo mioglobina para o transporte seletivo de oxigênio.
- A reticulação do poli(álcool vinílico) pelo glutaraldeído em condições operacionais amenas, ou seja, capazes de manter a estrutura nativa da mioglobina e da hemoglobina é apresentada no Capítulo 5.
- A imobilização da mioglobina e da hemoglobina em filmes de poli(álcool vinílico) é descrita no Capítulo 6, com ênfase no estudo das variáveis operacionais no desempenho das membranas produzidas.
- No Capítulo 7, apresentam-se a conclusão e as sugestões para trabalhos futuros.
- No Anexo 1, as características dos compostos orgânicos investigados como solventes da mioglobina no Capítulo 3 são apresentadas.
- O estudo da plastificação das membranas de poli(álcool vinílico) pelos glicóis é descrito no Anexo 2, tendo em vista as flutuações experimentais observadas.
- Um maior detalhamento das propriedades do poli(álcool vinílico) é mostrado no Anexo 3, com ênfase nos efeitos do grau de hidrólise e do tamanho da cadeia na solubilidade em água e viscosidade das soluções poliméricas.
- O Anexo 4 consiste em um resumo da literatura em relação ao uso da técnica de FTIR para determinação da estrutura secundária de proteínas.

1.7. Originalidade

A originalidade deste trabalho reside na utilização dos biotransportadores, hemoglobina e mioglobina, imobilizados em uma matriz polimérica para promover o transporte facilitado de oxigênio. Embora estas proteínas tenham servido de inspiração para o desenvolvimento dos transportadores sintéticos, a instabilidade das mesmas em aplicações *ex-vivo* desmotivou a continuidade dos trabalhos no passado. Com o desenvolvimento de técnicas de manipulação genética, a síntese de membranas com estes biotransportadores torna a ser interessante, já que a porção globina possui um efeito primordial na proteção do sítio ativo contra a autoxidação.

1.8. Referências bibliográficas

- BAKER, R. W., 2002, “Future directions of membrane gas separation technology”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 41, n. 6 (Mar), pp. 1393-1411.
- DRIOLI, E., ROMANO, M., 2001, “Progress and new perspectives on integrated membrane operations for sustainable industrial growth”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 40, n. 5 (Mar), pp. 1277-1300.
- FERRAZ, H. C., 2003, *Membranas de transporte facilitado para separação de oxigênio utilizando biotransportadores*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- NOBLE, R. D., KOVAL, C. A., PELLEGRINO, J. J., 1989, “Facilitated transport membrane systems”, *Chemical Engineering Progress*, v. 11, n. 3 (Mar), pp. 58-70.
- NISHIDE, H., TSUKAHARA, Y., TSUCHIDA, E., 1998, “Highly selective oxygen permeation through a poly(vinylidene dichloride)-cobalt porphyrin membrane: hopping transport of oxygen via the fixed cobalt porphyrin carrier, *Journal of Physical Chemistry B*, v. 102, n. 44 (Oct), pp. 8766-8770.
- ROMAN, I. C., BAKER, R. W., 1985, “Method and apparatus for producing oxygen and nitrogen and membrane therefor”, *U. S. Patent*, 4542010.
- SCHOLANDER, P.F., 1960, “Oxygen transport through hemoglobin solutions”, *Science*, v. 131, n. 3400 (Feb), pp. 585-590.
- SHREVE, R. N., BRINK JR., J. A., 1997, *Indústrias de processos químicos*. 4 ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S. A.
- VOET, D., VOET, J. G., PRATT, C. W., 2000, “Função das Proteínas”. In: *Fundamentos de Bioquímica*, capítulo 4, Brasil, Artmed Editora.
- WAY, J. D., NOBLE, R. D., 1992, “Facilitated transport”, In: HO, W. S W., SIRKAR, K. K. (Eds.), *Membrane Handbook*, United States, Van Nostrand Reinhold.

Capítulo 2:

Revisão da literatura

Neste capítulo, são apresentados os principais fundamentos para a compreensão do presente trabalho. Inicialmente, os métodos utilizados para a obtenção de oxigênio são expostos, seguidos por uma descrição de membranas para promover o fracionamento do ar, com ênfase na investigação das membranas de transporte facilitado para este fim. Os transportadores de oxigênio e polímeros empregados para a imobilização dos mesmos são mostrados em seguida, bem como o potencial de utilização de biomoléculas fixadas em matrizes sólidas em outras áreas de pesquisa.

2.1. A produção industrial de oxigênio

O oxigênio é uma das maiores *commodities* químicas mundiais, com aplicação em diversas áreas, como na fabricação do aço e em indústrias químicas, na produção do óxido de acetileno, etileno, amônia e metanol. Outros usos em processos metalúrgicos não ferrosos também merecem destaque. Aplicações mais nobres como na área hospitalar e mesmo na engenharia aeroespacial, para o lançamento de foguetes, ilustram a versatilidade e importância do oxigênio. Produzido através do fracionamento do ar atmosférico, que possui a composição apresentada na Tabela 2. 1, o oxigênio com pureza maior que 90% é obtido em fábricas usualmente localizadas nas vizinhanças do ponto de consumo, devido ao acréscimo no preço do produto provocado pelo transporte (SHREVE e BRINK JR., 1997).

Tabela 2. 1: Composição química média do ar atmosférico (SHREVE e BRINK JR., 1997).

Componente	Quantidade (% volume)
Nitrogênio	78,084
Oxigênio	20,946
Argônio	0,934
Hidrogênio	0,00005
Neônio	0,001818
Hélio	0,0005239
Criptônio	0,0001139
Xenônio	0,0000086
Dióxido de Carbono	0,02-0,04

Em uma usina típica de produção de oxigênio de elevada pureza através da destilação criogênica, cerca de 33% do custo total de produção é proveniente do consumo de energia (SHREVE e BRINK JR., 1997), indicando que outros processos menos intensivos energeticamente precisam ser desenvolvidos para competir com a tecnologia convencional. A utilização mais racional da energia pode viabilizar o emprego de oxigênio de pureza elevada ou ar enriquecido em oxigênio em outras áreas, como na aeração de efluentes líquidos e nos diversos processos de combustão. Esta redução dos custos de produção deve provocar um impacto em diversos outros processos, já que o nitrogênio utilizado nas correntes de combustão consome muita energia durante o processo de aquecimento do ar e somente contribui para a diluição do oxigênio a ser usado na reação.

2.2. Os processos de separação através de membranas

A utilização de membranas sintéticas para promover a separação de misturas é uma alternativa relativamente recente. A observação das propriedades seletivas de alguns materiais tem sido relatada desde o século XVIII, mas o estudo sistemático destes dispositivos só ganhou notoriedade industrial com o desenvolvimento de membranas para dessalinização de água preparadas pela técnica de inversão de fases por Loeb e Sourirajan, na década de 60. Inspiradas nas membranas biológicas, estas barreiras permitem a permeação seletiva de certas substâncias em detrimento de outras, que têm seu transporte restrito através do material. As vantagens da tecnologia residem na economia de energia, pois não há necessidade de mudança de fase para que haja a separação, a seletividade do processo, usualmente mais elevada que os métodos tradicionais, a simplicidade de operação e escalonamento, uma vez que os sistemas são modulares, além de serem especialmente interessantes para a separação de substâncias termolábeis porque não requerem o emprego de temperatura elevada (HABERT *et al.*, 2006). A seguir, são apresentados os principais fundamentos associados aos processos de separação através de membranas.

2.2.1. Fundamentos da separação por membranas

Segundo MULDER (1996), existem diversos processos com membranas, baseados em diferentes princípios ou mecanismos para alcançar a separação e, portanto, uma vasta

gama de partículas e moléculas pode ser fracionada. Apesar desta elevada variabilidade, todos os processos têm uma coisa em comum: a membrana.

A membrana é o cerne de todos os processos e pode ser considerada como uma barreira seletiva entre duas fases, conforme ilustrado na Figura 2. 1. A fase 1 consiste na alimentação e a fase 2 é o permeado. A separação é alcançada porque a membrana possui a habilidade de transportar um componente da mistura alimentada preferencialmente aos demais, como resultado de uma ou mais forças motrizes, como será descrito adiante.

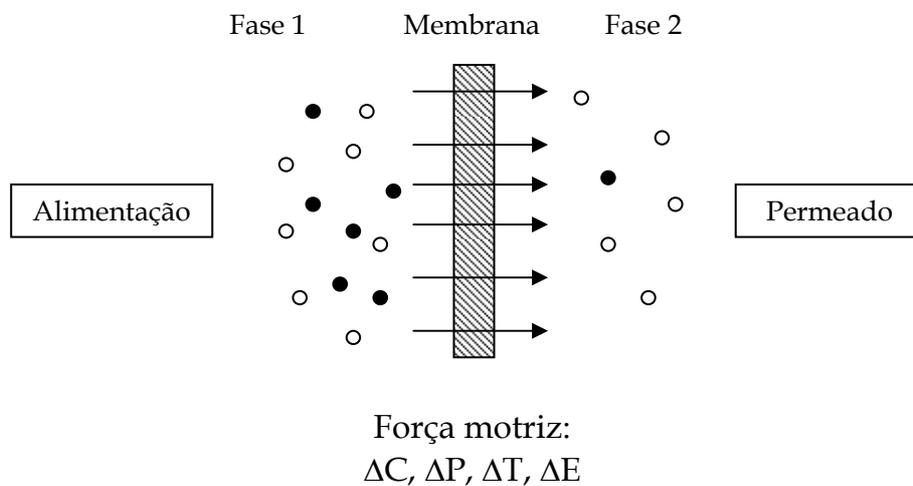


Figura 2. 1: Desenho esquemático ilustrando um processo de separação de misturas usando membrana (MULDER, 1996).

O desempenho do processo é freqüentemente descrito por dois parâmetros, o fluxo e a capacidade seletiva. O fluxo é definido pelo volume que escoou pela membrana por unidade de área e por tempo. A seletividade da membrana em relação à mistura é expressa por dois parâmetros, o coeficiente de rejeição (R) ou o fator de separação (α).

Para soluções aquosas diluídas, quando a água é o componente mais permeável, é mais conveniente expressar a seletividade em termos da retenção de soluto, conforme apresentado na Equação 2. 1, onde c_a e c_p são as concentrações do soluto na alimentação e no permeado, respectivamente.

$$R = \frac{c_a - c_p}{c_a} \qquad \text{Equação 2. 1}$$

Já a seletividade de misturas gasosas ou líquidas é expressa através do fator de separação, descrito na Equação 2. 2, em que as frações dos componentes A e B no permeado, referido como y, e na alimentação, x, são relacionados (MULDER, 1996).

$$\alpha = \frac{\frac{y_A}{y_B}}{\frac{x_A}{x_B}} \quad \text{Equação 2. 2}$$

Os processos de separação através de membranas são classificados de acordo com a força motriz usada para promover a permeação. Osmose inversa, ultra, micro e nanofiltração são mais desenvolvidas técnica e comercialmente e baseiam-se na diferença de pressão entre a alimentação e o permeado. A diálise utiliza o gradiente de concentração como força motriz, enquanto na pervaporação, na permeação de vapor e na separação de gases, a diferença de pressão parcial do componente de interesse na alimentação e no permeado governa o transporte. A eletrodiálise apresenta uma diferença de potencial elétrico como força motriz. Outros processos como destilação osmótica, contactores à membrana e processos combinados com rotas tradicionais de separação estão em desenvolvimento (STRATHMANN, 2001).

Em função de seu uso nos processos, as membranas usadas podem ser densas ou porosas, produzidas a partir de polímeros, materiais cerâmicos ou filmes metálicos, com estrutura simétrica ou assimétrica, soluções líquidas contendo transportadores específicos que são mantidas em poros por capilaridade ou barreiras eletricamente carregadas (STRATHMANN, 2001). Um esquema ilustrando as principais morfologias de membranas sintéticas é apresentado na Figura 2. 2.

As membranas podem ser preparadas em geometrias diferentes, como filmes planos ou cilíndricos, que podem ser do tipo tubular, capilar ou fibra oca. As membranas planas podem ser condicionadas em módulos do tipo placa-e-quadro ou espiral, com densidade de empacotamento variando de 400 a 600 m²/m³ e de 800 a 1.000 m²/m³, respectivamente. Membranas tubulares apresentam uma densidade de empacotamento de 20 a 30 m²/m³, enquanto para os capilares, este valor sobe para 1.000 m²/m³. Entretanto, o grande interesse comercial reside nas membranas de fibra oca, já que razão entre a área de membrana e o volume do módulo é muito superior às demais

geometrias, cerca de $10.000 \text{ m}^2/\text{m}^3$, representando uma melhor utilização do espaço e redução conseqüente no custo do equipamento (HABERT *et al.*, 2006).

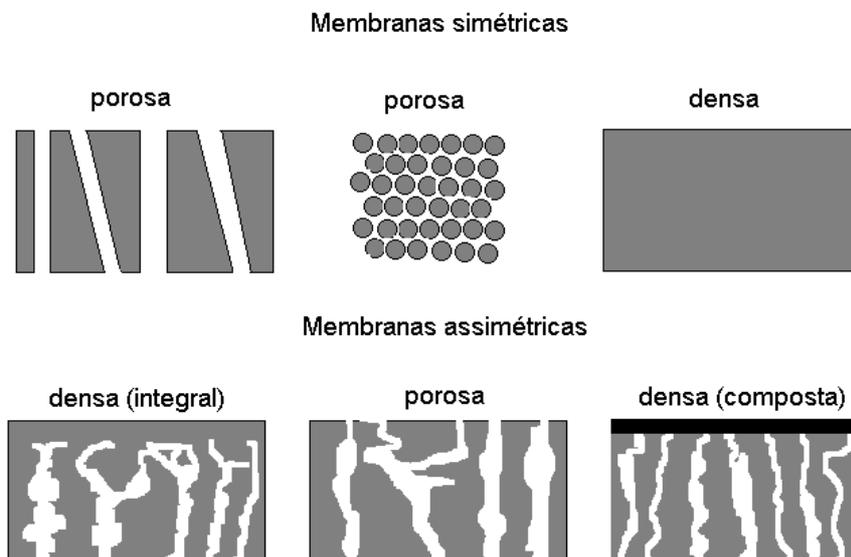


Figura 2. 2: Esquema ilustrativo das principais morfologias das membranas sintéticas usadas atualmente (HABERT *et al.*, 2006).

2.2.2. A separação de gases

A primeira aplicação industrial significativa de membranas para a separação de gases ocorreu em 1980, quando a Permea lançou um processo para recuperação de hidrogênio da corrente de purga das plantas de produção de amônia. As fibras ocas de poli(sulfona) recobertas com silicone (polidimetilsiloxano) foram um sucesso imediato e incentivaram o desenvolvimento da tecnologia, como a utilização de acetato de celulose para remoção de CO_2 do gás natural e do poli(4-metil-1-penteno) para purificação do nitrogênio proveniente do ar. Outras aplicações envolvem a desidratação do ar comprimido e a separação de hidrocarbonetos do nitrogênio ou do ar (BAKER, 2002).

Segundo DRIOLI e ROMANO (2001), a tecnologia de separação de gases encontra-se bem consolidada atualmente e está apta para substituir os processos tradicionais. Membranas planas ou fibras ocas são comercializadas em módulos por diversas companhias no mundo. Embora o tipo de módulo usado seja divulgado, o polímero ainda é protegido como segredo industrial (DRIOLI e ROMANO, 2001).

De fato, estima-se que apenas 8 ou 9 polímeros sejam utilizados em pelo menos 90% do total das plantas de separação de gases instaladas. Isto se justifica pelo fato de que, além de elevada permeabilidade e seletividade, os materiais devem possuir habilidade para a formação de membranas finas, estáveis, de baixo custo, que possam ser dispostas em módulos com elevada densidade de empacotamento (BAKER, 2002).

Uma alternativa interessante tem sido o desenvolvimento de membranas compostas assimétricas inspiradas nas membranas produzidas por Loeb e Sourirajan na década de 60. Nestes novos sistemas, o suporte é produzido através da técnica de inversão de fases, com poros de diâmetro na faixa de 100 a 200 Å. Esta camada deve ser mecanicamente resistente e quimicamente estável, podendo ser produzida por polímeros de baixo custo. A camada seletiva, por sua vez, pode ser depositada diretamente sobre o suporte poroso, ou sobre uma camada intermediária, usada como cola, contendo um polímero bastante permeável. A espessura da camada seletiva deve ser inferior a 0,5 µm. Por último, uma outra camada protetora pode ser adicionada sobre o polímero seletivo, evitando o ataque químico pela corrente de alimentação ou abrasão mecânica (BAKER, 2002). Uma ilustração da morfologia da membrana é apresentada na Figura 2. 3.

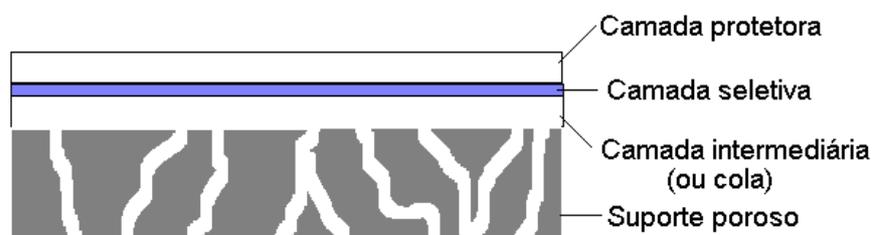


Figura 2. 3: Desenho esquemático da estrutura das membranas densas compostas utilizadas na separação de gases.

No caso das membranas densas, a permeação de gases é bem descrita pelo modelo da sorção/difusão. Em outras palavras, inicialmente ocorre a sorção do permeante na matriz polimérica, seguida pela difusão da espécie através da membrana e dessorção no lado do permeado. Esta última etapa geralmente não oferece resistência ao transporte de massa. Durante a sorção, a afinidade termodinâmica entre o par permeante/polímero é que determina a efetividade da segregação. Já para a difusão, a mobilidade cinética da espécie de interesse no material da membrana é que governa o processo (BAKER,

2004). Fatores como a temperatura, a pressão, concentração, massa molar, tamanho e forma da molécula do permeante, a compatibilidade entre o soluto e o polímero, bem como a reticulação e cristalinidade deste último influenciam diretamente no transporte (HABERT *et al.*, 2006).

2.2.2.1. Membranas aplicadas à separação do oxigênio

A utilização de membranas para separação de O₂ do ar atmosférico é promissora porque esta tecnologia é energeticamente menos intensiva. Os mecanismos pelos quais a separação se processa são variados. A adsorção de oxigênio em membranas de fibra de carbono compostas é uma linha de pesquisa investigada por BURCHELL *et al.* (2005), por exemplo. Outra abordagem envolve membranas supercondutoras (GORDON e CUSSLER, 1999). Porém, os trabalhos publicados na literatura apresentam, em sua maioria, membranas poliméricas para a obtenção de oxigênio a partir do ar. O princípio da separação pode ser a difusão simples (WANG *et al.*, 2005) ou facilitada, com a adição de um transportador (YANG e HUANG, 2000a e b).

Em sua revisão sobre as tendências da tecnologia de membranas aplicada à separação de gases, BAKER (2002) ressalta que a separação de oxigênio do ar é uma tarefa difícil. Isso porque, embora o oxigênio permeie preferencialmente, ele representa apenas 20% da mistura gasosa. Ou seja, sempre há permeação de nitrogênio, dada sua maior concentração na alimentação. Esta limitação entre permeabilidade e seletividade é descrita através do diagrama de Robeson, apresentado na Figura 2. 4. O limite superior, correspondente aos materiais mais permeáveis e seletivos, tem sido pouco alterado nos últimos anos.

DRIOLI e ROMANO (2001) ressaltam que o uso de membranas para produção de oxigênio com pureza superior a 90% geralmente requer a compressão da alimentação ou o uso de vácuo na corrente do permeado, o que torna o desempenho deste tipo de processo inferior à adsorção do ar atmosférico em zeólitas. BAKER (2002) afirma que os módulos de fibra oca respondem por mais de 80% das aplicações industriais na separação de gases, principalmente devido aos baixos custos comparados às membranas em espiral.

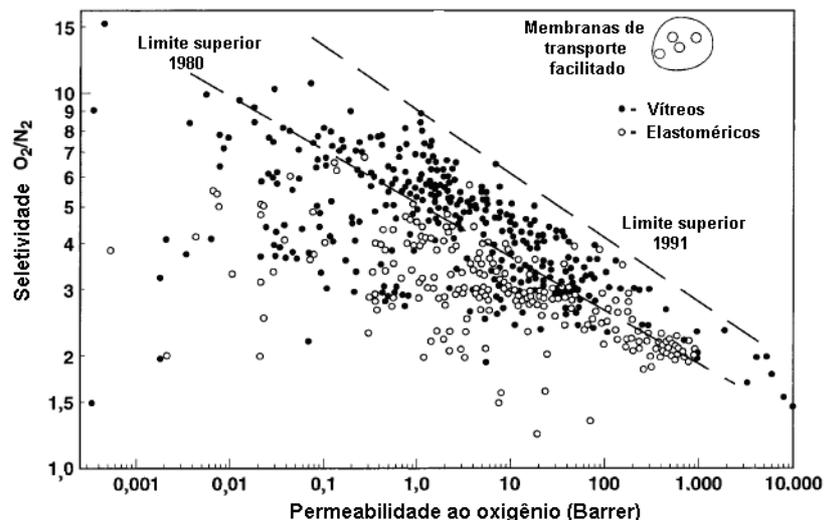


Figura 2. 4: Diagrama de Robeson (BAKER, 2002), mostrando o comportamento inverso entre a seletividade O_2/N_2 e a permeabilidade ao oxigênio de materiais poliméricos.

Neste sentido, NIJDAM *et al.* (2005) investigaram uma nova geometria para membranas de fibra oca, visando aumentar a área superficial. As membranas preparadas consistiram em uma mistura poli(éter sulfona)/poliimida (20/80, em massa). As permeabilidades ao N_2 e ao O_2 foram de 0,81 e 5,26 GPU (*gas permeation unit*, equivalente a $10^{-6} \text{ cm}^3(\text{CNTP}) \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cmHg}^{-1}$), respectivamente, com seletividade praticamente inalterada. Os resultados revelaram um aumento de 19% na área superficial devido à mudança da geometria das fibras, conforme apresentado na Figura 2. 5. A espessura da “pele” nas membranas micro-estruturadas (0,17 μm) foi semelhante à das membranas circulares (0,18 μm).

O sucesso da produção de oxigênio por meio de processos com membranas depende, portanto, das melhorias no desempenho destas últimas. O desenvolvimento comercial foi iniciado nos anos 80, utilizando membranas de silicone/poli(sulfona) e celulose. Entretanto, os resultados não foram suficientemente bons para competir com a tecnologia criogênica (BAKER, 2002). Desde então, novos materiais vêm sendo investigados.

Os trabalhos publicados nos últimos anos para separação O_2/N_2 por difusão simples são baseados no controle da densidade de empacotamento das cadeias poliméricas ou alteração na química superficial dos polímeros. O empacotamento das cadeias poliméricas tem sido modificado através da incorporação de grupos volumosos, tais

como anéis aromáticos ou haletos de alquila (WANG *et al.*, 2005 e LI *et al.*, 1996) ou de complexos metálicos nano-estruturados (KURDI e TREMBLAY, 2003). Já a mudança na química de superfície dos polímeros é alcançada, na maior parte das vezes, através da tecnologia de plasma (CHEN *et al.*, 1997a e RUAAN *et al.*, 1998). Os valores de permeabilidade e seletividade encontrados nestes artigos são apresentados na Tabela 2. 2.

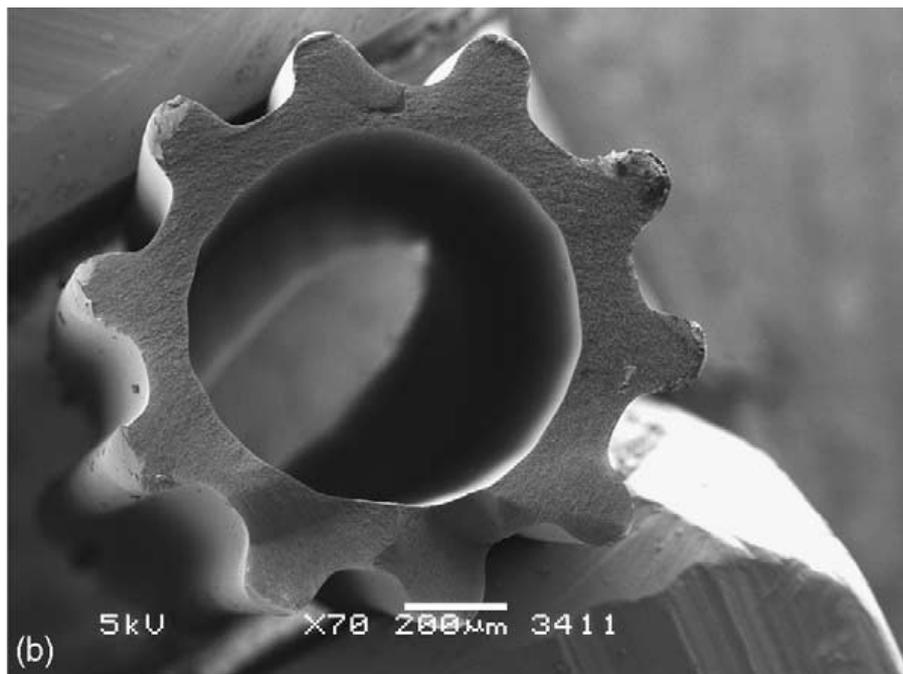


Figura 2. 5: Membranas micro-estruturadas visando o aumento da área superficial para permeação (NIJDAM *et al.*, 2005).

Com o objetivo de melhorar as propriedades de permeação, membranas de transporte facilitado têm sido investigadas (SHENTU e NISHIDE, 2003, CHEN *et al.*, 1997b). Este processo combina uma reação química com a difusão. O soluto reage inicialmente com o transportador para formar um complexo, que se difunde até liberar a espécie de interesse no permeado. As membranas podem ser líquidas, com o transportador dissolvido em um solvente que é posteriormente impregnado nos poros de um suporte; ou poliméricas, com o transportador ligado física ou quimicamente na matriz sólida. A vantagem das membranas de transporte facilitado reside na melhoria da seletividade e aumento no fluxo permeado, especialmente para pressão parcial pequena do componente a ser separado (FIGOLI *et al.*, 2001).

Tabela 2. 2: Trabalhos que contemplam a separação oxigênio/nitrogênio por difusão simples.

Polímero base	Tratamento	P _{alimentação} (kPa)	Permeabilidade (GPU)	α (O ₂ /N ₂)	Referência
Poli(imida) aromática	Adição de grupos volumosos	0,09	0,5*	10,1	WANG <i>et al.</i> (2005)
			5,2*	6,8	
Poli(éter imida)	Adição de complexos metálicos	1280	0,1	5,5	KURDI e TREMBLAY (2003)
Celulose	Esterificação	410	2,2	3,2	LI <i>et al.</i> (1996)
Composta polibutadieno/ policarbonato	Adição de N por plasma	-	0,07	10,5	RUAAN <i>et al.</i> (1998)
Polibutadieno/ policarbonato	Adição de Cl por plasma	-	0,3	7,5	CHEN <i>et al.</i> (1997a)

* Considerando uma membrana com espessura de 0,1 μm .

2.2.3. Membranas de transporte facilitado

O mecanismo mais aceito para o transporte de substâncias através de membranas poliméricas densas é a sorção/difusão. O soluto se dissolve na membrana e se difunde devido a um gradiente de potencial químico. As membranas de transporte facilitado apresentam, além do mecanismo de sorção/difusão ordinário, uma reação de complexação reversível (WAY e NOBLE, 1992), conforme apresentado na Equação 2. 3, que auxilia o transporte. A é o soluto de interesse, B é o transportador, AB é o complexo transportador/soluto e k_1 e k_2 são as constantes da reação direta e inversa, respectivamente.



Apresenta-se, na Figura 2. 6, um esquema ilustrando os dois mecanismos de transporte nas membranas de transporte facilitado.

A taxa global de transferência de massa do soluto é a soma do fluxo do complexo transportador/soluto com o fluxo do soluto não complexado. No limite em que a reação é rápida, a taxa de difusão do complexo controla a taxa de transferência de massa (WAY e NOBLE, 1992).

O processo global pode ser considerado como um transporte passivo, já que a molécula do soluto é transportada de uma região onde o potencial químico é elevado para outra, onde ele é mais baixo. As vantagens das membranas de transporte facilitado residem em sua seletividade, dada a especificidade da reação entre o transportador e o soluto, e fluxo aumentado, especialmente para pressões parciais pequenas da espécie de interesse, que favorecem o mecanismo reativo (FIGOLI *et al.*, 2001).

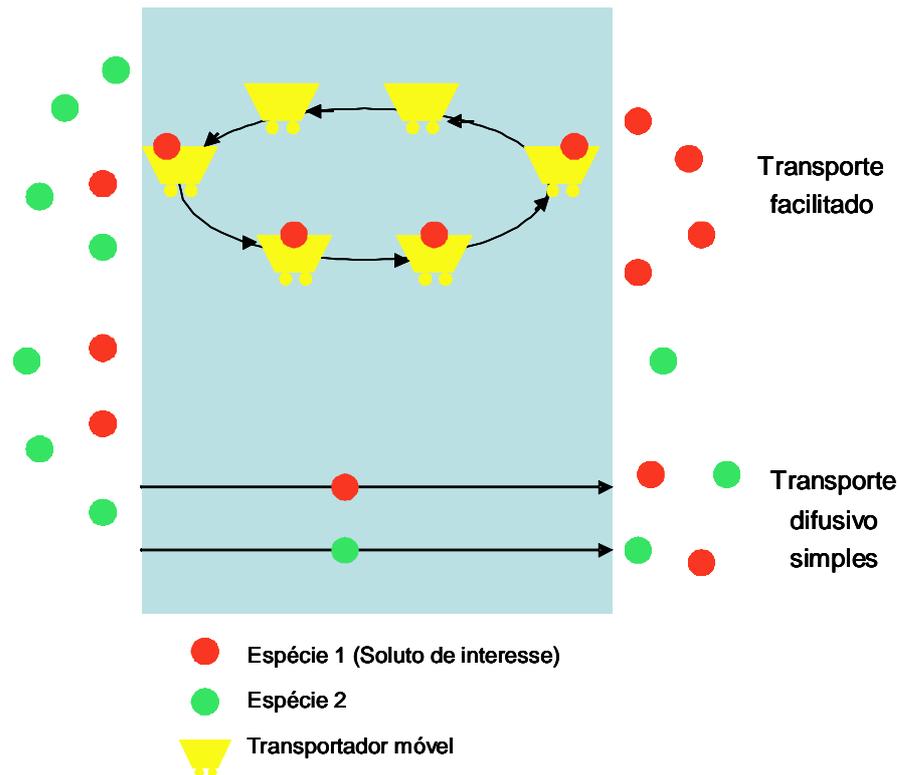


Figura 2. 6: Esquema do transporte facilitado em membranas líquidas.

O mecanismo reativo é a razão de o fluxo das membranas de transporte facilitado não ser sempre proporcional à diferença de concentração através da membrana. Para concentrações muito elevadas, todas as espécies do transportador estão ligadas às moléculas do soluto e um aumento na concentração deste na alimentação não resultará em um aumento do fluxo através do mecanismo reativo. Nestas condições, conhecidas como saturação do transportador, este último está no máximo de sua capacidade de ligação ao soluto. Para forças motrizes menores, o fluxo proveniente do mecanismo de sorção/difusão é pequeno e a maioria da difusão se deve ao complexo transportador/soluto. À medida que a força motriz se reduz ainda mais, o fluxo das

moléculas de soluto não complexadas diminui muito mais rápido que o do complexo (WAY e NOBLE, 1992).

O equilíbrio da reação de complexação entre o transportador e o soluto deve obedecer a um balanço adequado. A taxa de complexação deve ser suficientemente grande para se obter grandes quantidades do complexo e, portanto, um efeito de facilitação elevado. Por outro lado, a taxa inversa deve ser grande o suficiente para que o soluto seja recuperado no permeado e o transportador se regenere, sem grande consumo energético (NOBLE *et al.*, 1989). Ilustra-se, na Figura 2. 7, a faixa energética adequada para a reação de complexação.

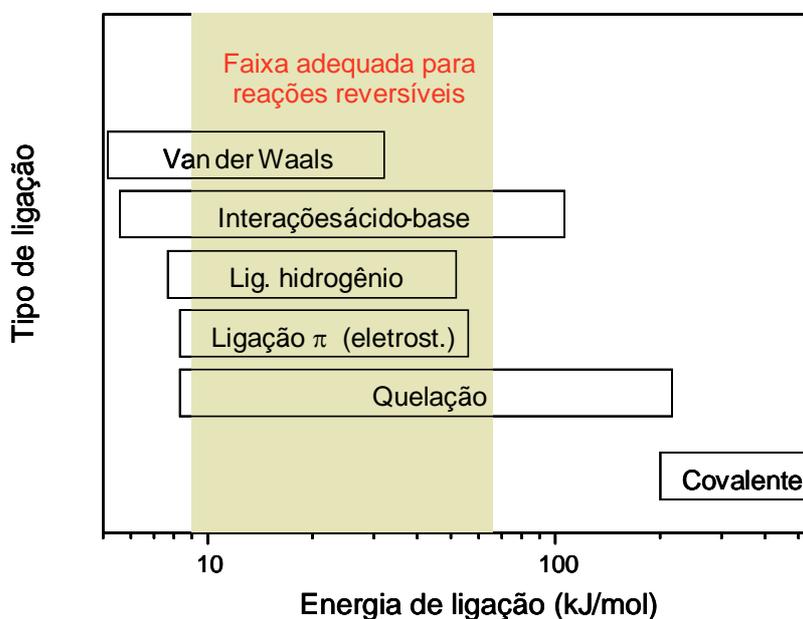


Figura 2. 7: Tipos de ligação e energias mais adequadas para reações de complexação empregadas em processos de separação (NOBLE *et al.*, 1989).

Conforme apresentado na figura, a faixa adequada para as energias de ligação é de 10 a 50 kJ/mol. Energias inferiores a 10 kJ/mol são semelhantes a interações do tipo van der Waals, enquanto as maiores que 50 kJ/mol são difíceis de reverter (NOBLE *et al.*, 1989).

2.2.3.1. Configuração das membranas e mecanismo de transporte facilitado

As principais configurações para as membranas de transporte facilitado são filme líquido suportado, polímero inchado em solvente e filme sólido polimérico contendo

grupos funcionais reativos, também denominadas membranas com transportadores fixos (FIGOLI *et al.*, 2001).

Uma membrana líquida suportada é preparada impregnando os poros de um suporte microporoso bastante fino com a solução do transportador ou com ele puro, caso seja líquido. A solução do transportador é mantida nos poros por forças capilares. Portanto, as condições operacionais devem ser cuidadosamente controladas para evitar evaporação da solução do transportador ou condensação do solvente da alimentação na superfície da membrana (WAY e NOBLE, 1992). Um esquema deste tipo de membrana é apresentado na Figura 2. 8.



Figura 2. 8: Esquema de uma membrana líquida suportada.

As espessuras típicas encontradas para estas membranas são de 5 a 25 μm , que é uma ou duas ordens de grandeza maior que a pele densa de membranas assimétricas poliméricas. Entretanto, os coeficientes de difusão são da ordem de 10^{-6} a 10^{-5} cm^2/s , muito maiores que dos polímeros vítreos, que raramente ultrapassam 10^{-8} cm^2/s . Assim, os fluxos entre as membranas líquidas imobilizadas e as poliméricas assimétricas são comparáveis (WAY e NOBLE, 1992).

Na permeação através de uma membrana líquida contendo um transportador específico para o soluto de interesse, o transporte reativo é mediado pelo transportador móvel. O transportador se liga especificamente ao soluto de interesse na interface alimentação/membrana, formando um complexo. O permeado é mantido em uma pressão suficientemente baixa do soluto para favorecer a descomplexação na interface membrana/permeado. Assim, o transportador atua como um veículo em resposta aos gradientes de concentração das formas complexada e descomplexada, ligando-se ao

oxigênio na alimentação, difundindo através da membrana e liberando o soluto na interface membrana/permeado para recomençar o processo. Como o transportador é específico para o soluto, sua taxa de transporte é aumentada sem alteração para as demais espécies, resultando em uma permeabilidade consideravelmente maior e maior seletividade (CHEN *et al.*, 1997b).

A partir da expressão da constante de equilíbrio para a reação de ligação do transportador ao soluto, a concentração do complexo AB, C_{AB} , na membrana líquida é apresentada na Equação 2. 4:

$$C_{AB} = \frac{C_{B,0}K_A p_A}{1 + K_A p_A} \quad \text{Equação 2. 4}$$

onde $C_{B,0}$ é a concentração do transportador na membrana líquida, p_A é a pressão parcial de A na alimentação e K_A é a constante de equilíbrio da reação de complexação.

A permeabilidade da espécie A, P_A ($\text{cm}^3(\text{CNTP}).\text{cm}.\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{cmHg}^{-1}$), é definida como o produto da difusividade pela solubilidade na membrana líquida, que é freqüentemente representado para o transporte facilitado como um modelo de dupla sorção (CHEN *et al.*, 1997b), conforme a Equação 2. 5:

$$P_A = k_H D_A + \frac{C_{B,0}K_A}{1 + K_A p_A} D_{AB} \quad \text{Equação 2. 5}$$

em que k_H é a constante de Henry, D_A e D_{AB} são os coeficientes de difusão da espécie A livre e do complexo AB na solução da membrana, respectivamente. Como estes valores são constantes para uma dada temperatura e concentração do transportador, a permeabilidade aumenta com a diminuição da pressão parcial de A (CHEN *et al.*, 1997b), conforme apresentado na Figura 2. 9.

Para pequenas pressões parciais de A, o termo correspondente ao transporte facilitado contribui com uma parcela maior para a permeabilidade e os valores obtidos são elevados. Porém, quando a pressão parcial de A é elevada, todos os sítios do transportador estão ocupados e a permeabilidade tende assintoticamente ao valor da permeabilidade do soluto na ausência do transportador (FERRAZ, 2003).

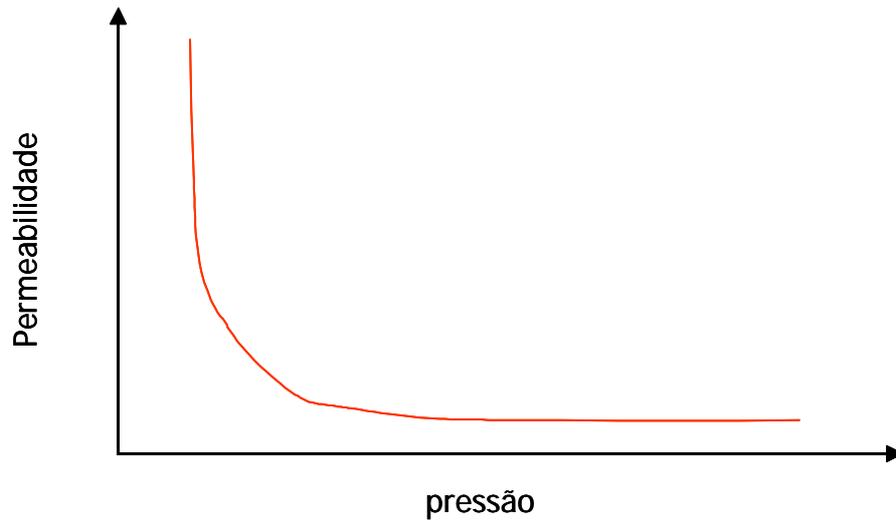


Figura 2. 9: Comportamento entre permeabilidade e pressão parcial de A em membranas líquidas suportadas.

Um resultado típico para o fluxo do soluto através de uma membrana líquida de transporte facilitado é apresentado Figura 2. 10. A linha inferior corresponde ao fluxo para a membrana líquida contendo o transportador inativo, ou seja, o fluxo correspondente à permeação física pelo mecanismo de sorção/difusão, proporcional à diferença de pressão parcial de A através das membranas. A curva com pontos representa o fluxo total de soluto (considerando o fluxo facilitado) através das membranas contendo o transportador na forma ativa (CHEN *et al.*, 1997b). O fluxo parcial acima da linha inferior (a área sombreada na figura) é atribuído ao fluxo facilitado da espécie de interesse. Ele aumenta mais rapidamente para pressões parciais mais baixas de oxigênio, onde o transporte facilitado é o termo predominante, e apresenta aumento constante para pressões mais elevadas do soluto.

O fluxo total de oxigênio é, portanto, a soma da parcela proveniente do mecanismo sorção/difusão com a do mecanismo reativo (JOHNSON *et al.*, 1987), conforme apresentado na Equação 2. 6:

$$J_A = \frac{D_A \Delta C_A}{\Delta x} + \frac{D_{AB} \Delta C_{AB}}{\Delta x} \quad \text{Equação 2. 6}$$

Onde ΔC_A e ΔC_{AB} são as variações de concentração do soluto e do complexo transportador/soluto na membrana, respectivamente, e Δx é a espessura da membrana.

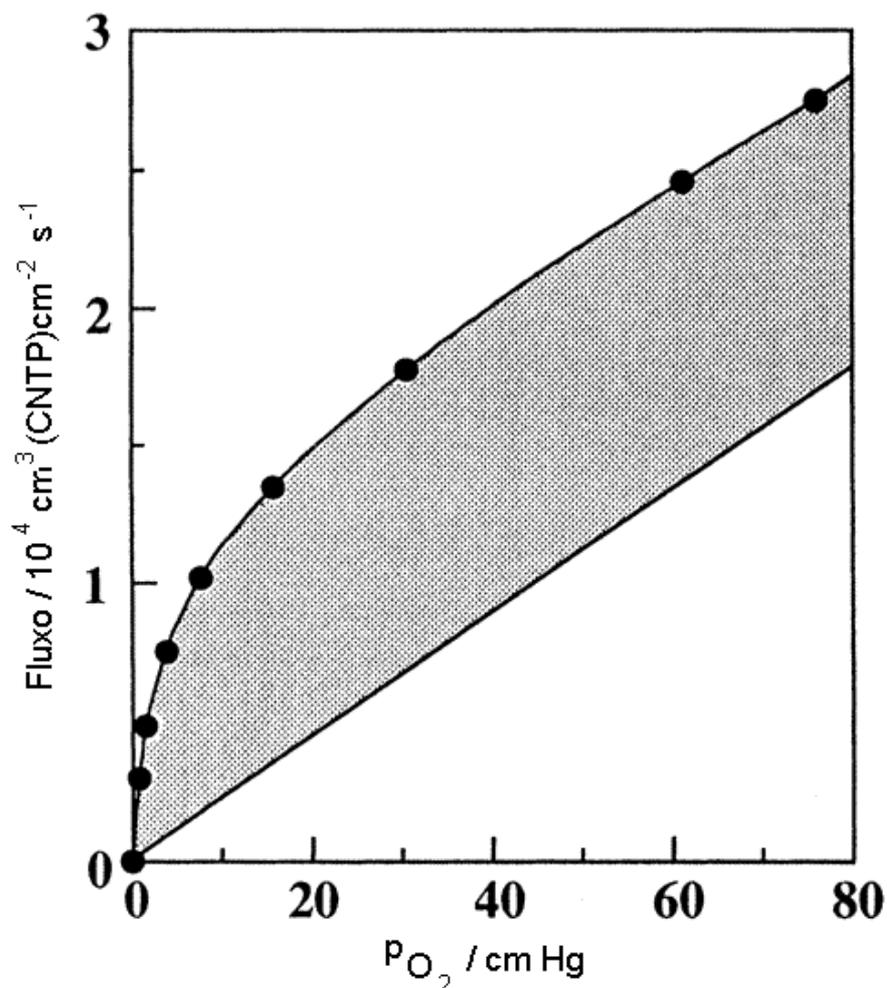


Figura 2. 10: Comportamento do fluxo com a pressão parcial do oxigênio nas membranas de transporte facilitado (CHEN *et al.*, 1997b).

Reescrevendo a equação acima considerando a sorção do tipo Henry para o transporte simples e do tipo Langmuir para o transporte facilitado, tem-se a Equação 2. 7.

$$J_A = \frac{k_H p_A D_A}{l} + \frac{C_{B,0} K_A p_A D_{AB}}{1 + K_A p_A} \quad \text{Equação 2. 7}$$

Onde l é a espessura da membrana (CHEN *et al.*, 1997b).

A principal vantagem das membranas líquidas suportadas é a simplicidade de operação. Embora estas membranas sejam pouco estáveis, o desenvolvimento da tecnologia de membranas de transporte facilitado, especialmente no que tange ao mecanismo de transporte, ocorreu graças a esta configuração (JOHNSON *et al.*, 1987, BAKER *et al.*, 1987, MATSON e LONSDALE, 1987).

Membranas de transporte facilitado de estrutura intermediária entre as fases líquida e sólida podem ser preparadas pelo inchamento de um filme polimérico com um solvente e introdução do transportador por difusão ou por troca iônica. Este tipo de membrana é mais empregado para a separação de íons, já que o transportador é retido por forças eletrostáticas na membrana polimérica de troca iônica, evitando perdas. A principal desvantagem desta configuração é a baixa permeabilidade, dada a espessura da membrana (NOBLE *et al.*, 1989).

Com o objetivo de melhorar a estabilidade das membranas de transporte facilitado, agentes complexantes foram ligados às cadeias poliméricas e as membranas têm sido preparadas a partir destes polímeros reativos. Esta configuração, conhecida como transportador fixo, é muito estável e seletiva (WAY e NOBLE, 1992). O mecanismo do transporte nestas membranas ainda é objeto de estudo pelos pesquisadores. Entretanto, acredita-se que a espécie de interesse “salte” entre os sítios do transportador (CUSSLER *et al.*, 1989), conforme apresentado na Figura 2. 11.

A maioria dos trabalhos publicados na literatura aborda a permeação seletiva de O₂ utilizando complexos metálicos que obedecem ao modelo da isoterma de Langmuir. As relações entre permeabilidade e força motriz exibem o comportamento de saturação esperado para o transporte mediado por reação química, conforme apresentado na Figura 2. 10 (WAY e NOBLE, 1992).

Cussler e colaboradores (CUSSLER *et al.*, 1989) propuseram uma teoria para o transporte facilitado em membranas com transportadores fixos baseada no mecanismo de saltos do soluto entre os sítios de ligação. Para eles, há um limite de percolação, ou seja, abaixo de uma determinada concentração do transportador, a distância entre os sítios de complexação aumenta de modo a inviabilizar o transporte da espécie de interesse. Entretanto, as equações apresentadas para o fenômeno, com restrições na etapa de difusão e de reação química foram semelhantes à forma da Equação 2. 7. Por outro lado, NOBLE (1990) propôs uma teoria em que não há existência do limite de percolação. As moléculas do soluto poderiam migrar entre os sítios do transportador através da difusão pelas cadeias poliméricas. O modelo obtido, ainda assim, é análogo ao apresentado anteriormente, quando da descrição do mecanismo da dupla sorção.

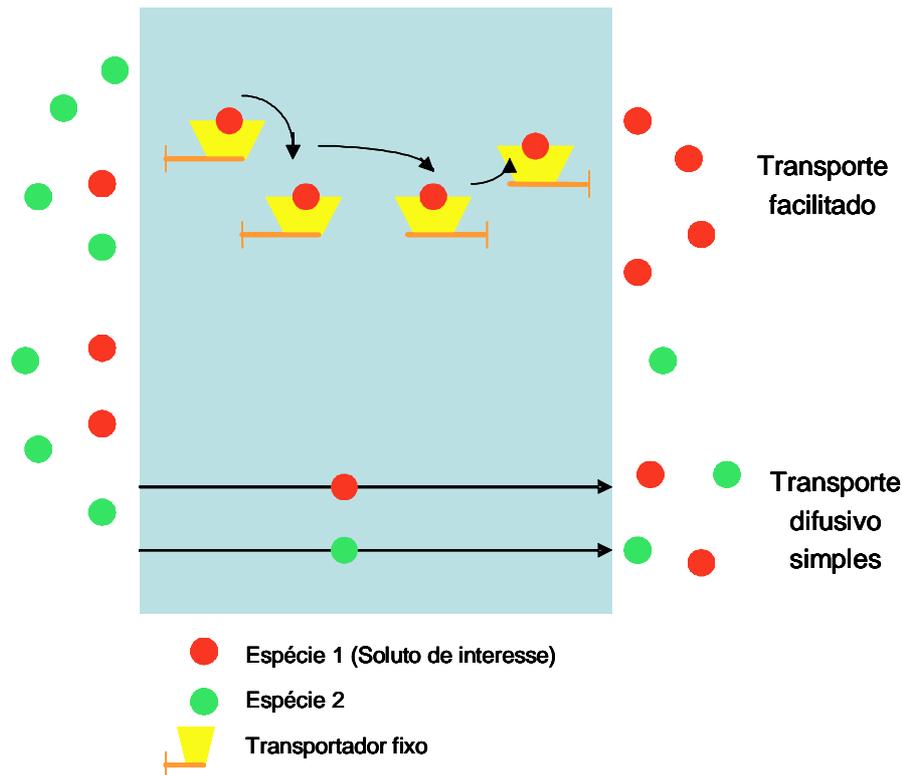


Figura 2. 11: Esquema de membranas de transporte facilitado com transportador fixo (FIGOLI *et al.*, 2001).

Em relação à configuração das membranas, FIGOLI *et al.* (2001) apresentam uma alternativa para estabilizar o transportador disperso na matriz polimérica. A estratégia consiste no micro-encapsulamento do transportador em células fechadas (semelhantes aos eritrócitos nos sistemas biológicos), que são dispersas em uma camada superficial seletiva e fina (0,1 a 0,5 μm) de polímero. Porém, a tecnologia ainda é incipiente.

2.2.3.2. Propriedades que afetam o transporte

O desempenho de membranas de transporte facilitado é dependente de várias propriedades do sistema que determinam a taxa de transferência de massa através da membrana para o soluto de interesse. As variáveis importantes são listadas na Tabela 2. 3.

Estas propriedades físicas do sistema podem ser agrupadas em números adimensionais que permitem uma avaliação simplificada do desempenho esperado de um par soluto/transportador especial. Estas variáveis adimensionais possuem significado físico e são apresentadas na Tabela 2. 4. Elas podem ser medidas experimentalmente ou estimadas independentemente. Desta forma, é possível diminuir o empirismo e oferecer

bases para determinação de algumas relações entre as propriedades do sistema e seu desempenho (WAY e NOBLE, 1992).

Tabela 2. 3: Variáveis importantes no desempenho dos sistemas de transporte facilitado.

k	Coefficiente de transferência de massa baseado na força motriz concentração.
D_A	Coefficiente de difusão do soluto na membrana.
D_{AB}	Coefficiente de difusão do complexo soluto/transportador na membrana.
k_1	Taxa de reação de complexação.
k_2	Taxa da reação de descomplexação.
$C_{A,0}$	Concentração do soluto na interface membrana/alimentação.
$C_{B,T}$	Concentração total do transportador na membrana.
l	Espessura da membrana.

Tabela 2. 4: Números adimensionais importantes no transporte facilitado.

F	Razão entre o fluxo do soluto permeado via difusão facilitada e difusão simples.
α	Razão de mobilidade, que é a razão da mobilidade do transportador pela mobilidade do soluto = $D_{AB}C_{B,T}/(D_A C_{A,0})$
ε	Inverso do número de Damköhler ($D_{AB}/k_2 l^2$), razão entre os tempos característicos da reação inversa e da difusão.
K_A	Constante de equilíbrio adimensional da reação ($k_1 C_{A,0}/k_2$).
Sh	Número de Sherwood para a transferência de massa do soluto (kl/D_A).

SMITH e QUINN (1979) derivaram uma expressão para descrever o fluxo de um soluto entre os sítios de um transportador fixo. Considerou-se que a concentração de sítios que não reagem com o soluto é fixa (C_B), o que significa fisicamente que há grande excesso de transportador na matriz polimérica. Para um sistema que opera em regime permanente, a solução do problema é apresentada na Equação 2. 8.

$$F = \frac{1 + \frac{\alpha K_A}{1 + K}}{1 + \frac{\alpha K_A}{1 + K} \left(\frac{\tanh \lambda}{\lambda} \right)} \quad \text{Equação 2. 8}$$

onde

$$\lambda = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{1 + (\alpha + 1)K_A}{\varepsilon(1 + K_A)}} \quad \text{Equação 2. 9}$$

Esta solução apresenta comportamento adequado tanto para regimes limitados por difusão quanto por reação química. Obviamente, já que o excesso de transportador foi considerado para o desenvolvimento do modelo, a solução não representa o desempenho do sistema quando o transportador está saturado (WAY e NOBLE, 1992).

No limite em que o termo $\tanh\lambda/\lambda$ tende a zero, ou seja, a facilitação é máxima, a Equação 2. 8 adquire a forma da Equação 2. 10:

$$F = 1 + \frac{\alpha K_A}{1 + K_A} \quad \text{Equação 2. 10}$$

Esta equação foi derivada pela primeira vez por WARD (1970). Para a obtenção deste modelo, foi considerado que o sistema é limitado por difusão, que os coeficientes do transportador e do complexo são iguais – o que é razoável quando a molécula do transportador é muito maior que a do soluto – e que a concentração do soluto na interface membrana/permeado é igual a zero.

Visando incorporar os efeitos de resistência à transferência de massa adjacentes à membrana, NOBLE *et al.* (1986) estenderam o modelo apresentado na Equação 2. 8, incluindo o número de Sherwood, conforme apresentado na Equação 2. 11:

$$F = \frac{\left(1 + \frac{\alpha K_A}{1 + K_A}\right) \left(1 + \frac{2}{Sh}\right)}{\left[1 + \left(\frac{\alpha K_A}{1 + K_A}\right) \frac{\tanh \lambda}{\lambda}\right] + \left(1 + \frac{\alpha K_A}{1 + K_A}\right) \left(\frac{2}{Sh}\right)} \quad \text{Equação 2. 11}$$

Uma outra abordagem, apresentada em uma série de trabalhos de Kang e colaboradores (KANG *et al.*, 1996, HONG *et al.*, 1996 e HONG *et al.*, 1999), baseia-se na flutuação local instantânea da concentração (ou pressão parcial) do soluto ao longo da membrana devido à reação com o transportador. Os autores estabeleceram uma analogia do transporte facilitado com transportadores fixos com a transferência de elétrons em um circuito RC. O modelo derivado é apresentado na Equação 2. 12:

$$\frac{P_f}{P} = 1 + \left(\frac{P_d}{P_0} \right) \sqrt{n^2 + \left(\frac{2\pi k_2 l^2 C_{B,0}}{P} \frac{\ln(1 + K_A P_0)}{P_0} \right)} \quad \text{Equação 2. 12}$$

O significado de cada uma das variáveis é apresentado na Tabela 2. 5.

Tabela 2. 5: Variáveis para o modelo de transporte facilitado com transportador fixo desenvolvido em analogia com o circuito elétrico.

P_f	Permeabilidade do soluto na membrana de transporte facilitado.
P	Permeabilidade do soluto devido à difusão na matriz polimérica.
p_d e p_0	Variações da pressão na superfície da membrana.
n	Número de camadas hipotéticas, representando o número de moléculas do transportador que o soluto deve encontrar em seu caminho difusivo.
k_2	Taxa da reação de descomplexação.
K_A	Constante de equilíbrio da reação de complexação.
l	Espessura da membrana.
$C_{B,0}$	Concentração inicial do transportador na membrana.

Embora apresentem diferentes enfoques em relação ao transporte facilitado, ambos os modelos indicam a dependência do fenômeno com a razão entre o tempo característico de difusão e reação química e a concentração total do transportador, conforme esperado (HONG *et al.*, 1999).

2.2.3.3. Aplicação das membranas de transporte facilitado para a separação O_2/N_2

A separação dos componentes do ar é a aplicação potencialmente mais importante do transporte facilitado com membranas por causa do enorme tamanho do mercado, já que N_2 e O_2 são *commodities* químicas expressivas. A produção de oxigênio utilizando processos com membranas não é comercialmente competitiva com a tecnologia criogênica devido ao comprometimento existente entre permeabilidade e seletividade. A Equação 2. 13 apresenta a fração molar máxima no permeado, y_{max} , em função da seletividade, α_{O_2/N_2} , e a fração molar do gás de alimentação, x_0 , que para o oxigênio é de aproximadamente 0,21 (WAY e NOBLE, 1992):

$$y_{\max} = \frac{\alpha_{O_2/N_2} x_0}{\alpha_{O_2/N_2} x_0 + 1 - x_0} \quad \text{Equação 2. 13}$$

Utilizando a equação acima, a seletividade mínima requerida para a produção de um permeado com 95% de oxigênio, como obtido pelos métodos criogênicos, é de 70. Este valor é cerca de uma ordem de grandeza maior que os obtidos com materiais desenvolvidos recentemente para permeação por difusão simples, conforme apresentado na Tabela 2. 2.

As membranas de transporte facilitado surgem, então, como alternativa promissora para a separação, desde que seletividades elevadas sejam alcançadas. O estado-da-arte na utilização de membranas que exibem transporte facilitado, líquidas suportadas ou com transportadores fixos, é apresentado a seguir.

As membranas líquidas suportadas consistem em uma solução orgânica do transportador impregnada em um suporte microporoso, que pode ser uma membrana polimérica de ultra ou microfiltração. Na Tabela 2. 6, destacam-se alguns trabalhos nesta linha de pesquisa.

O principal avanço das membranas líquidas suportadas contendo transportadores sintéticos para permeação seletiva de oxigênio é proveniente dos trabalhos de ROMAN e BAKER (1985) e JOHNSON *et al.* (1987). Estas membranas apresentaram elevados valores de seletividade e permeabilidade, jamais encontrados anteriormente. Entretanto, a despeito da seletividade elevada, este tipo de membrana esbarrou na limitação imposta pelas perdas do solvente e do transportador devido à evaporação ou desativação química. Os transportadores apresentaram atividade por apenas 30 dias.

Trabalhos posteriores investigando membranas líquidas suportadas são escassos na literatura, devido à instabilidade desta configuração. Entretanto, estudos preliminares que visam caracterizar um dado transportador para a separação O_2/N_2 encontram maior entendimento dos mecanismos de transporte utilizando este tipo de membrana. Desta forma, CHEN *et al.* (1997b) estudaram o uso de cobalto-porfirinas modificadas para a permeação seletiva de O_2 , assim como FERRAZ (2003) investigou o uso de cobalto-

mioglobina e hemoglobina como transportadores. BERNAL *et al.* (2002) avaliaram o emprego de uma solução de irídio em m-xileno suportada em zeólita. Porém, a seletividade obtida foi muito pequena, igual a 2,8.

Tabela 2. 6: Principais trabalhos que abordam a separação O₂/N₂ através de membranas líquidas suportadas.

α O ₂ /N ₂	P O ₂ (Barrer*)	T (°C)	Referência
30	1500	25	ROMAN e BAKER (1985)
20	260	-10	JOHNSON <i>et al.</i> (1987)
40	1000	10	CHEN <i>et al.</i> (1997b)
2,8	361	27	BERNAL <i>et al.</i> (2002)
21	1600	10	FERRAZ (2003)

*1 Barrer corresponde a 10^{-10} cm³(CNTP).cm.cm⁻².s⁻¹.cmHg⁻¹.

Visando estabilizar este sistema, membranas poliméricas contendo transportadores fixos têm sido intensamente investigadas na literatura. Muitos trabalhos são realizados em laboratórios industriais e figuram como patentes, confirmando o potencial da técnica. O desempenho das membranas produzidas nos últimos anos pode ser acompanhado na Tabela 2. 7.

De um modo geral, os transportadores investigados são CoP (cobalto-porfirinas) ou Co-Sch (cobalto-base de Schiff). Polímeros elastoméricos e vítreos são empregados. A geometria das membranas ainda é plana, com espessura cerca de 2 ordens de grandeza maior que o desejável, constituindo um obstáculo à transferência de massa. Além disso, poucos trabalhos apresentam o tempo de meia-vida do transportador, uma das limitações da tecnologia, considerando a autooxidação a que estão sujeitos.

Apresenta-se, na Figura 2. 12, uma comparação entre a curva correspondente aos materiais mais permeáveis e seletivos em 1991, de acordo com o diagrama de Robeson,

com os resultados obtidos através das membranas poliméricas, com transportadores fixos, apresentados na Tabela 2. 7.

Tabela 2. 7: Trabalhos envolvendo membranas de transporte facilitado com transportador fixo.

Trans- portador	Polímero	C _t (%massa)	α O ₂ /N ₂	P O ₂ (Barrer)	l (μm)	T (°C)	P _{alim} (mmHg)	t _{meia-vida} (dias)	Trabalho
CoP	Poli(alquil metacrilato) sobre PDMS	-	3,5	-	-	25	50	-	NISHIDE <i>et al.</i> (1987)
Co-Salphen	Copolímero do estireno	-	12,2	3,99	-	-	2830	10	DELANEY <i>et al.</i> (1990)
CoP	Poli(alquil metacrilato)	25	8,3	6	60	45	25	-	NISHIDE <i>et al.</i> (1991a)
CoMPP	Poli(alquil metacrilato)	1,3	17,7	62	60	45	5	-	NISHIDE <i>et al.</i> (1991b)
Co-Sch	PVA/PAAm	13	8,5	0,0282	-	-	-	-	CHOI <i>et al.</i> (1995)
CoP	Poli(alquil metacrilato)	20	14	70	30	25	5	-	SUZUKI <i>et al.</i> (1996)
CoSalen	Policarbonato	3	15	0,33	-	5	-	-	CHEN e LAI (1996)
CoSalPr	Policarbonato	-	6,92	1,65	-	35	-	-	RUAAN <i>et al.</i> (1997)
Co-Sch	PVA/PAAm	-	8,5	0,0282	-	-	9,75	-	PARK <i>et al.</i> (1997)
CoP	Poli(alquil metacrilato-co-dicloreto de vinila)	20	118	2,6	10	30	5	90	NISHIDE <i>et al.</i> (1998)
Co	Poliuretano	-	4,4	2 x 10 ^{-5*}	-	-	-	-	CHEN <i>et al.</i> (1998)
Co-Sch	Celulose	4	4,1	14,2	60	30	758	-	HE <i>et al.</i> (1998)
CoP	Celulose	1	4,44	12,39	55	30	60	-	YANG e HUANG (2000a)
CoP	Celulose	10	3,8	-	55	30	1500	-	YANG e HUANG (2000b)
Sal de Co	-	12,3	10,3	11,2	-	30	380	-	WANG <i>et al.</i> (2002)
CoP	Poli(alquil metacrilato)	10	- **	1	30	25	5	-	SHENTU e NISHIDE (2003)

Nomenclatura: C_t – concentração do transportador; CoP: cobalto-porfirina; Co-Sch – Cobalto complexado com base de Schiff; CoMPP: derivados da CoP; CoSalPr, CoSalen e CoSalphen: cobalto complexado com diferentes bases de Schiff; poli(alquil metacrilato): butil, octil ou lauril; PAAm – poli(alil amina).

(-): Dados não disponíveis.

* Considerando membrana com espessura de 0,1 μm.

** Fator de facilitação do oxigênio igual a 18.

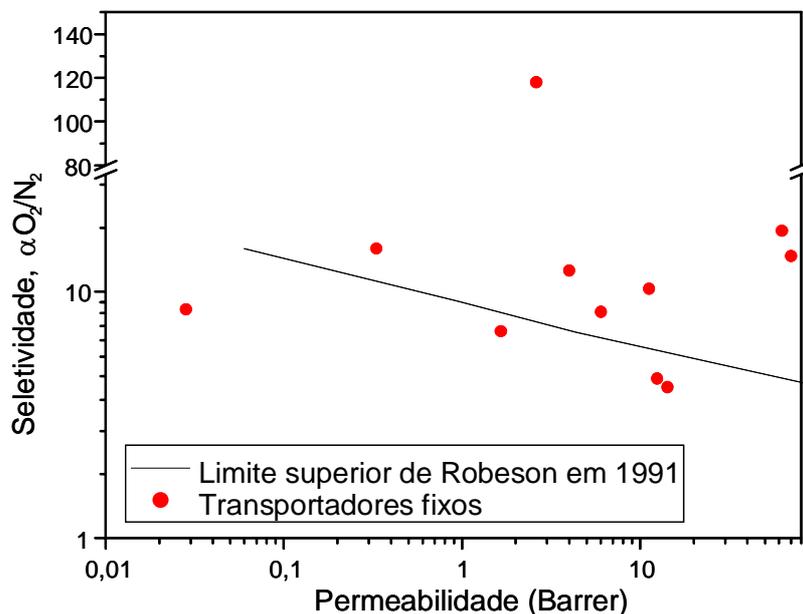


Figura 2. 12: Comparação entre os materiais mais seletivos e permeáveis (diagrama de Robeson (BAKER, 2002), linha contínua) com as membranas poliméricas contendo transportadores fixos desenvolvidas nos últimos 15 anos.

As análises da Figura 2. 12 e da Tabela 2. 7 indicam o enorme potencial das membranas de transporte facilitado contendo transportadores fixos. De modo particular, vale destacar o estudo intenso realizado por Nishide e colaboradores, nos últimos 15 anos, visando fixar quimicamente o transportador na matriz polimérica. O melhor resultado obtido consistiu em seletividade de 118 e permeabilidade igual a 2,6 Barrer, com tempo de meia-vida do transportador igual a 3 meses (NISHIDE *et al.*, 1998). Para efeito de comparação, FIGOLI *et al.* (2001) apresentaram as condições desejáveis para que a membrana de transporte facilitado possa competir com a tecnologia criogênica tradicional. Segundo eles, as membranas devem apresentar seletividade maior que 20 e fluxo maior que $1,5 \times 10^{-2} \text{ m}^3\text{m}^{-2}\text{h}^{-1}\text{bar}^{-1}$ (que corresponde a 555 Barrer/cm), operando em um único estágio sob pressão menor que 10 bar e temperaturas entre 0 e 40°C. Para garantir estabilidade, o tempo de vida da membrana deve ser superior a 1 ano.

As seletividades alcançadas nas membranas de transporte facilitado justificam o interesse dos pesquisadores nesta tecnologia, embora ainda haja obstáculos a serem transpostos. Eis alguns deles:

- a) O mecanismo de transporte do soluto através dos sítios fixos do transportador ainda precisa ser esclarecido. Embora o modelo da dupla sorção – mecanismo do tipo sorção de Henry para o transporte difusivo simples e Langmuir para a difusão facilitada – ajuste-se bem aos dados experimentais, a existência ou não de um limite de percolação ainda é questionado.
- b) O efeito da matriz polimérica na permeabilidade da espécie de interesse tem sido pouco estudado (SHENTU e NISHIDE, 2003). Parece haver uma maior facilitação quando se utilizam polímeros vítreos, o que frequentemente é associado a um maior volume livre (WANG *et al.*, 2002).
- c) O efeito da adição do transportador na matriz polimérica precisa ser investigado. Parece haver um limite, acima do qual a membrana torna-se muito quebradiça e a medida de permeabilidade é prejudicada (NISHIDE *et al.*, 1991a).
- d) A influência de grupos substituintes no transportador pode alterar a seletividade das membranas e este tipo de estudo ainda é escasso na literatura (YANG e HUANG, 2000a e b).
- e) O desenvolvimento de técnicas que permitam a síntese de membranas assimétricas de fibra oca, com a camada superficial extremamente fina, na faixa de 0,1 a 0,5 μm . Isso pode tornar as membranas viáveis, uma vez que o fluxo pode ser muito aumentado.
- f) A investigação do mecanismo de autooxidação que permita o desenvolvimento de transportadores mais estáveis pode ser entendida como o maior desafio para a aplicação comercial das membranas de transporte facilitado. Como o maior período de utilização destas membranas foi de apenas 3 meses (NISHIDE *et al.*, 1998), este é um fator decisivo para a melhoria do desempenho destas membranas.

2.3. Transportadores de oxigênio

A transição da vida anaeróbica para a aeróbica foi uma importante etapa evolutiva, já que um rico reservatório de energia foi disponibilizado. Dezoito vezes mais energia é extraída da glicose na presença de oxigênio que em sua ausência. Os desenvolvimentos

de um sistema circulatório e de moléculas transportadoras garantiram aos vertebrados fluxos contínuos e adequados de oxigênio. Mioglobina e hemoglobina são os principais transportadores. A hemoglobina, contida nos eritrócitos sangüíneos, aumenta em 50 vezes a capacidade de transporte de oxigênio. Já a mioglobina serve como fornecedora de oxigênio reserva e facilita o transporte deste no músculo. Na ausência de um dispositivo como este, o tamanho dos organismos aeróbios estaria limitado a alguns milímetros porque a difusão de oxigênio ao longo de grandes dimensões seria muito lenta para suprir as necessidades celulares (STRYER, 1999). Nesta seção, os principais aspectos estruturais dos transportadores de oxigênio com potencial para aplicação nas membranas de transporte facilitado são apresentados.

2.3.1. Transportadores naturais

A mioglobina é uma hemoproteína citoplasmática capaz de se ligar reversivelmente ao oxigênio molecular e facilitar o transporte do mesmo dos eritrócitos para as mitocôndrias, durante períodos de aumento da atividade metabólica, ou atuar como reservatório deste em condições de anoxia ou hipoxia (ORDWAY e GARRY, 2004). Primeira proteína a ter sua estrutura desvendada através da difração de raios-X (STRYER, 1999), a mioglobina ainda é estudada devido às funções atribuídas a ela recentemente (GARRY *et al.*, 2003). Sua cadeia polipeptídica é constituída por 153 resíduos que se organizam em oito seqüências de α -hélices, denominadas de A a H e arrançadas de modo a formar uma proteína globular com dimensões de, aproximadamente, 44 x 44 x 25 Å (STRYER, 1999). A estrutura da mioglobina é apresentada na Figura 2. 13.

O grupo prostético hemo, apresentado na Figura 2. 14, localiza-se numa cavidade hidrofóbica da molécula entre dois resíduos de histidina, His 64 e His 93, e é constituído por um átomo de ferro central coordenado a quatro nitrogênios de anéis pirrólicos dispostos em um único plano. A quinta posição de coordenação é ocupada pela ligação com o anel imidazol da His 93, responsável pela estabilização do grupo hemo e pelo deslocamento do átomo de ferro de 0,3 Å do plano da molécula. A sexta posição de ligação, vazia no caso da desoximioglobina, funciona como o sítio de ligação da molécula de oxigênio, bem como de outros ligantes, como CO e NO. A ligação com o oxigênio promove o alinhamento do ferro no plano do grupo hemo (STRYER, 1999).

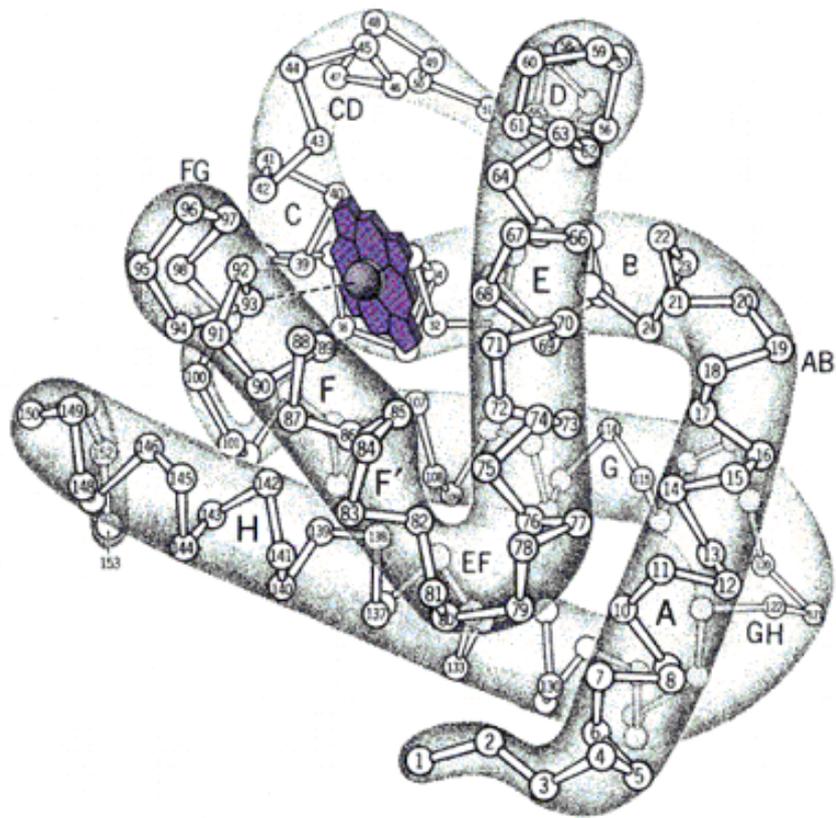


Figura 2. 13: Estrutura da mioglobina (VOET *et al.*, 2000).

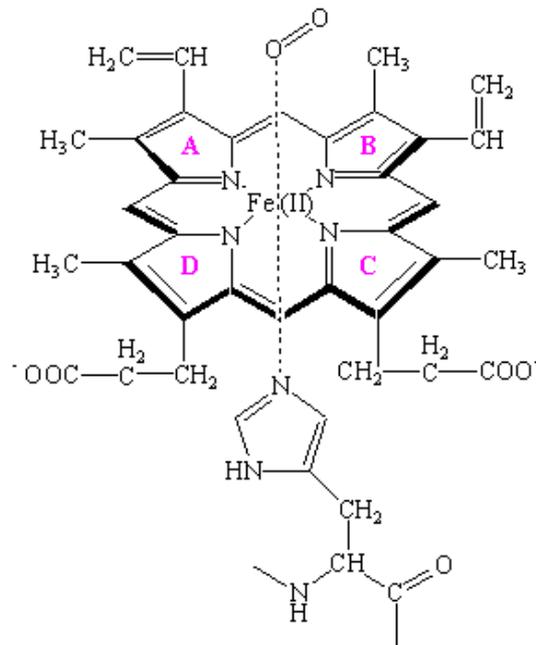


Figura 2. 14: Grupo prostético hemo, ilustrando as ligações do átomo de ferro central com os nitrogênios do anel porfirínico, a Histidina (His 93) e o oxigênio molecular (VOET *et al.*, 2000).

O papel da histidina distal, His 64 ou His E7, consiste em oferecer impedimento espacial do sítio ativo, garantindo a reversibilidade da reação, através da formação de uma ponte de hidrogênio com o O₂, na geometria mostrada na Figura 2. 15. Duas cadeias laterais do hemo onde o O₂ se liga, Val E11 e Phe CD1, auxiliam na manutenção da posição do grupo prostético. Estas cadeias laterais provavelmente oscilam à medida que a proteína “respira”, permitindo a saída e a entrada do O₂ (VOET *et al.*, 2000).

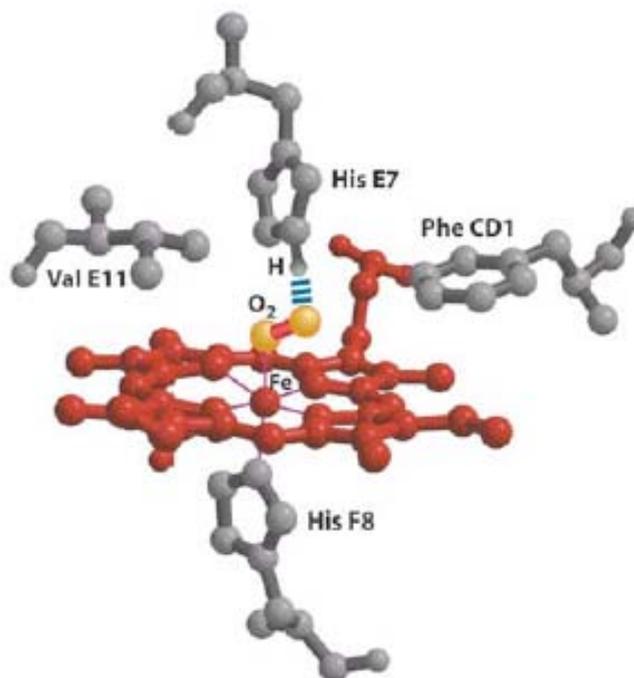


Figura 2. 15: Desenho esquemático ilustrando o ambiente em que o grupo hemo está inserido na molécula de mioglobina (STRYER, 1999).

O átomo de Fe(II) do grupo hemo isolado, quando exposto ao oxigênio, é oxidado de maneira irreversível a Fe(III), uma forma inativa, chamada de metamioglobina. A porção protéica da mioglobina impede esta oxidação e torna possível a ligação reversível com o oxigênio. A oxigenação altera o estado eletrônico do complexo Fe-hemo, conforme indicado pela mudança de coloração de púrpura para vermelho (VOET *et al.*, 2000).

A estabilidade do complexo MbFe(II)—O₂ surge em parte da interação favorável dos orbitais preenchidos (d_{xy} , d_{yz}) do Fe(II) com os orbitais p^* do O₂ e da sobreposição do orbital s preenchido do O₂ com o orbital vazio d_z^2 do Fe(II). Esta interação favorece a orientação angular do O₂, conforme apresentado na Figura 2. 16, uma vez que esta

geometria maximiza a sobreposição s e é facilitada pelas interações com os resíduos próximos ao sítio de ligação do Fe — O₂ (KAIM e SCHWEDERSKI, 1994, DEMICHELI e MAIA, 2005).

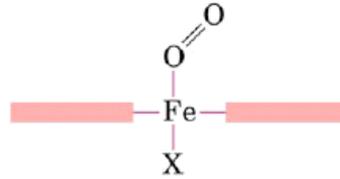


Figura 2. 16: Interação angular do Fe com a molécula de O₂ (STRYER, 1999).

A hemoglobina, cuja estrutura é apresentada na Figura 2. 17, é responsável pelo transporte de oxigênio, H⁺ e dióxido de carbono nos eritrócitos sanguíneos. Nos vertebrados, a proteína possui quatro cadeias polipeptídicas de dois tipos diferentes, as cadeias α e as β . Cada uma destas cadeias possui um grupo prostético hemo e a junção das mesmas é efetuada através de ligações não covalentes. A molécula resultante é quase esférica, com diâmetro de 55 Å. Os grupos hemo são localizados próximo à superfície externa da molécula e encontram-se a cerca de 25 Å de distância um do outro (STRYER, 1999).

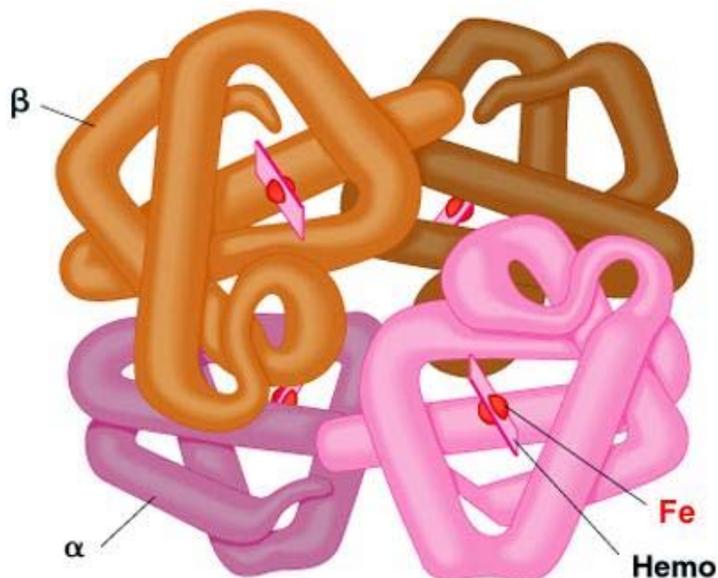


Figura 2. 17: Estrutura da hemoglobina, evidenciando os quatro sítios para ligação com o oxigênio molecular (STRYER, 1999).

As estruturas tridimensionais da mioglobina e das cadeias α e β da hemoglobina são muito semelhantes, apesar de corresponderem a uma seqüência de aminoácidos bastante diferente. Este fato indica que a complexa conformação tridimensional destas proteínas consiste no projeto da natureza para um transportador de oxigênio: ela insere o grupo hemo em um microambiente hidrofóbico que permite a ligação reversível com o oxigênio (STRYER, 1999).

A organização das cadeias α e β provocou uma modificação substancial na função fisiológica da hemoglobina, permitindo à proteína o transporte de espécies como H^+ e CO_2 , além do oxigênio molecular. Como resultado, a hemoglobina é uma proteína alostérica, de modo que algumas características são observáveis:

- a) a ligação de uma molécula de oxigênio molecular à proteína favorece a ocupação dos demais grupos hemo por este soluto;
- b) A afinidade da proteína pelo oxigênio é regulada pelo pH do meio e pela presença de CO_2 ;
- c) A afinidade da hemoglobina também é regulada por fosfatos orgânicos, como o 2,3-difosfoglicerato (VOET *et al.*, 2000).

A dissociação do O_2 destas proteínas é caracterizada por sua fração de saturação, θ , definida como a fração dos sítios de ligação ocupados pelo oxigênio. O comportamento da fração de saturação com a pressão parcial de oxigênio para a mioglobina é hiperbólico, enquanto para a hemoglobina é sigmoideal, conforme apresentado na Figura 2. 18. Para uma pressão parcial baixa de oxigênio, poucas moléculas se ligam à mioglobina e, como consequência, θ é pequeno. Já para pressões parciais elevadas do oxigênio, quase todos os sítios estão ocupados até que haja saturação da mioglobina. Na figura, são destacados os valores de pO_2 no sangue arterial (100 torr) e venoso (30 torr), que são os limites fisiológicos existentes (VOET *et al.*, 2000). Como a ligação do oxigênio nos quatro sítios da hemoglobina é cooperativa, a curva apresentada na Figura 2. 18 para esta proteína é sigmoide, ou seja, a reação em um grupo hemo facilita a ligação em outros sítios do mesmo tetrâmero. Em outras palavras, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio aumenta na medida em que as moléculas deste se ligam no sítio ativo. Já a etapa de

descomplexação é favorecida à medida que menos moléculas encontram-se ligadas ao ferro.

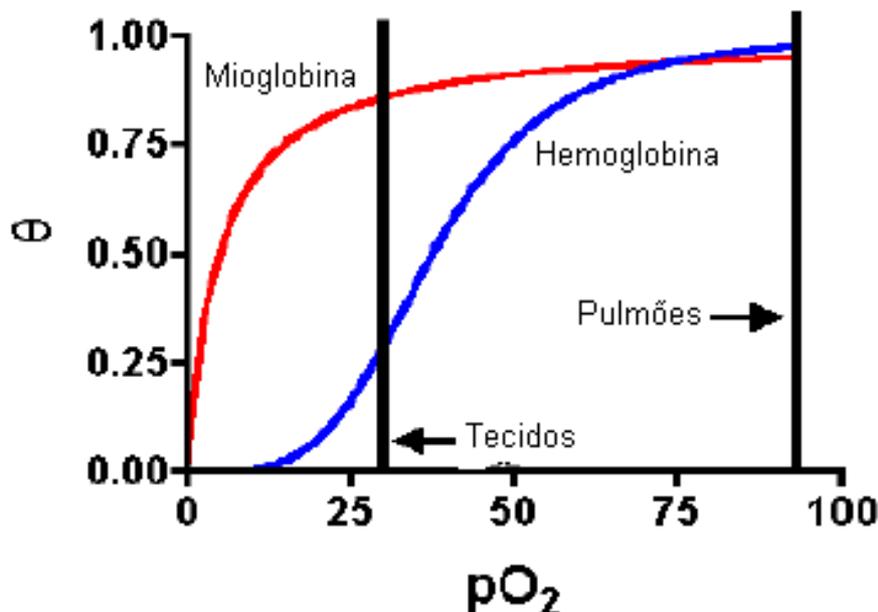


Figura 2. 18: Fração de saturação do oxigênio na mioglobina e na hemoglobina (STRYER, 1999).

O transporte facilitado de oxigênio em sistemas *ex-vivo* pela hemoglobina humana foi observado pela primeira vez por SCHOLANDER (1960). A permeabilidade do oxigênio na membrana líquida foi 8 vezes maior que em água pura, com seletividade O₂/N₂ igual a 14. Outros estudos foram realizados, buscando estabilizar o sistema com gelatina (HEMMINGSSEN e SCHOLANDER, 1960) e estendendo a investigação para outras proteínas (WITTENBERG, 1966). Porém, estes trabalhos revelaram também a pequena estabilidade das soluções aquosas destas hemoproteínas.

2.3.2. Transportadores sintéticos

Basset e Schultz (BASSET e SCHULTZ, 1970 *apud* WAY e NOBLE, 1992) foram pioneiros ao investigar o uso de um transportador sintético para o oxigênio, o bis-histidinato de Co(II), semelhante ao grupo prostético das hemoproteínas. A permeabilidade ao oxigênio foi igual ao dobro da obtida em água pura, com seletividade igual a 3,5. Desde então, diversos transportadores sintéticos têm sido investigados para o transporte seletivo de oxigênio. De um modo geral, eles se classificam em dois grupos

principais, as cobalto-porfirinas e cobalto-bases de Schiff, como pode ser visualizado na Figura 2. 19.

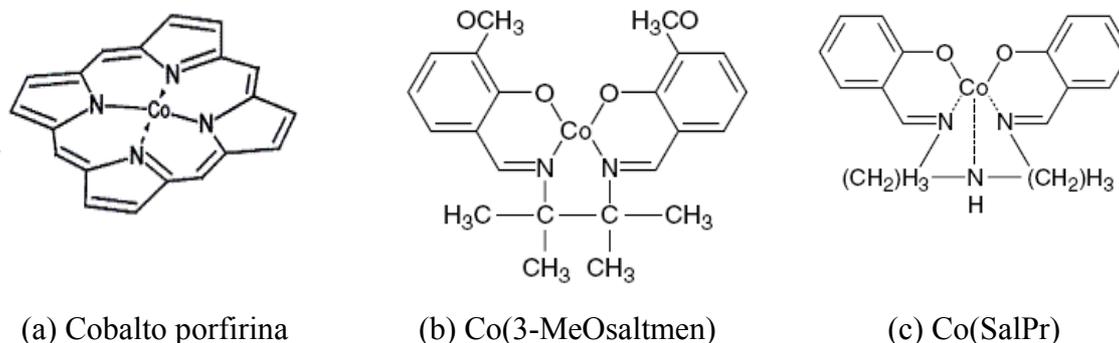


Figura 2. 19: Estrutura química dos principais tipos de transportadores sintéticos do oxigênio (BAKER, 2002).

De um modo geral, estes compostos sintéticos imitam a estrutura do grupo hemo: um centro metálico — composto por ferro ou cobalto, na maioria das vezes — é complexado com um ligante tetravalente, usualmente uma base de Schiff ou uma porfirina. Existem, geralmente, dois sítios para a ligação do oxigênio, um acima e outro abaixo do plano da molécula. Para que a ligação com o O₂ ocorra, um ligante tipo base de Lewis deve primeiro ligar-se a um destes sítios. Esta base axial pode ser um aditivo na solução de espalhamento da membrana (trietilamina, conforme empregado por DELANEY *et al.*, 1990) ou pode consistir em um dos grupos do copolímero — vinilimidazol ou piridina, como nos trabalhos de Nishide e colaboradores (NISHIDE *et al.*, 1991a e b, 1998, SHENTU e NISHIDE, 2003).

Todos estes transportadores, porém, estão sujeitos à autooxidação pelo próprio oxigênio. Embora os mecanismos de degradação ainda sejam pesquisados, os três mais importantes incluem a formação de peroxo-dímeros — formado pela ligação de uma molécula de O₂ entre dois transportadores —, a oxidação irreversível do ligante tetravalente e a oxidação do metal central. Estes mecanismos de degradação podem ocorrer simultaneamente ou em reações consecutivas (WAY e NOBLE, 1992).

2.3.3. Interesse renovado nos transportadores naturais

Apesar de terem sido as primeiras proteínas a ter sua estrutura desvendada pela técnica de fluorescência de raios-X, mioglobina e hemoglobina continuam sendo intensamente estudadas. Os trabalhos envolvem tanto a utilização como proteínas modelo (KHMELNITSKI *et al.*, 1991), como ainda investigam novas funções fisiológicas destas biomoléculas (GARRY *et al.*, 2003). Assim, por exemplo, a maior parte dos trabalhos recentes publicados na literatura a respeito da mioglobina ainda busca estabelecer os efeitos do meio na taxa de autoxidação. Isso se justifica, principalmente, porque a mioglobina é usada como parâmetro de qualidade de carnes e peixes. MANCINI e HUNT (2005) apresentam uma revisão a respeito dos fatores que afetam a estrutura química da mioglobina, bem como as técnicas empregadas para monitorar a desativação desta proteína. CHOW (1991) investigou a estabilidade de mioglobinas de espécies de peixes variando o pH de 4,5 a 10. Observou-se que a menor taxa de autoxidação ocorreu para pH entre 7 e 8. Posteriormente, UEKI *et al.* (2005) compararam a termoestabilidade de mioglobinas de peixes com a equina e verificaram que a última apresenta maior estabilidade térmica (temperatura de desnaturação igual a 84,2°C, contra 75°C das de peixes) e maior teor de α -hélices, iguais a 55,3% e 34,5%, respectivamente.

YAN *et al.* (2003) utilizaram a espectroscopia no infravermelho bidimensional para estudar a seqüência de eventos térmicos durante a desnaturação mioglobina equina. Quando a temperatura foi aumentada gradualmente, observou-se agregação da proteína em temperaturas relativamente baixas, de 50 a 58°C, antes da completa desnaturação (84°C). Porém, quando o processo era iniciado a 60 ou 70°C, a agregação só ocorreu após a desnaturação da proteína.

Em relação à hemoglobina, uma grande parte das publicações recentes está relacionada ao desenvolvimento de substitutos para o sangue. A “primeira geração” dos HBOCs (*hemoglobin-based oxygen carriers*) consiste na polimerização da hemoglobina pelo glutaraldeído. A necessidade de polimerização reside na pequena estabilidade da hemoglobina não polimerizada fora dos eritrócitos, que pode se dissociar e provocar uma série de problemas como obstrução dos túbulos renais (EIKE e PALMER, 2004).

Embora disponíveis comercialmente, as hemoglobinas bovinas polimerizadas com glutaraldeído ainda estão em fase de testes clínicos (BUEHLER *et al.*, 2005).

SUGAWARA *et al.* (1995) investigaram o papel da matriz protéica das hemoproteínas na estabilização da ligação Fe — O₂. Verificou-se que a desnaturação da proteína pode aumentar em até 1.000 vezes a taxa de autoxidação do ferro. Portanto, os autores concluíram que a matriz protéica representa uma proteção ao grupo prostético contra os efeitos deletérios de solventes próticos como a água.

A partir do exposto acima e considerando o avanço das técnicas de Biologia Molecular e outras ferramentas analíticas, a investigação de biotransportadores em membranas de transporte facilitado vem ganhando um novo interesse dos pesquisadores (FERRAZ, 2003). Assim, por exemplo, HARGROVE *et al.* (1996) e FERRAZ (2003) investigaram a alteração na seqüência de aminoácidos da mioglobina, visando aumentar sua estabilidade frente à autoxidação. Os resultados obtidos por FERRAZ (2003) indicaram um aumento de 3,5 vezes na estabilidade das mioglobinas mutantes, quando comparadas com as selvagens. Estes avanços estão diretamente associados a um maior tempo de vida útil das membranas de transporte facilitado e indicam que a utilização destas proteínas como transportadores de oxigênio é bastante promissora.

2.4. Polímeros hidrofílicos

Considerando a natureza hidrofílica dos biotransportadores de oxigênio, a seleção de polímeros que apresentem solubilidade em água no pH fisiológico, de modo a garantir a fixação das proteínas sem perda da atividade biológica das mesmas é fundamental para o sucesso do transporte facilitado. Além disso, como os polímeros deverão ser usados posteriormente para a síntese de membranas, o poli(álcool vinílico) e o alginato de sódio foram investigados neste trabalho, dada a habilidade de formação de filmes. A seguir, a estrutura e as propriedades destes materiais são apresentadas.

2.4.1. O alginato de sódio

Os alginatos ocorrem na natureza como componente estrutural das algas marrons e como polissacarídeo capsular em bactérias. Embora algumas pesquisas apontem para a possibilidade de obtenção do alginato por fermentação, este biopolímero ainda é

exclusivamente obtido por extração das algas (DRAGET *et al.*, 2005). Aplicações industriais mais desenvolvidas consistem no emprego como agente espessante e emulsificante em indústrias alimentícias, enquanto outras aplicações biotecnológicas potenciais vêm despontando, como na liberação controlada de drogas (GEORGE e ABRAHAN, 2006, TAQIEDDIN e AMIJI, 2004, QI *et al.*, 2006).

O alginato é um copolímero resultante da ligação 1 → 4 dos ácidos α-D-manurônico (M) e β-L-gulurônico (G), com grande variedade na composição e seqüenciamento destes resíduos. A hidrólise ácida do material indica a presença de três frações principais: duas delas correspondem quase exclusivamente a regiões homopoliméricas dos resíduos M e G, denominadas blocos M e G, respectivamente, intercaladas com regiões de estrutura alternada, os blocos GM. As conformações adquiridas pela cadeia polimérica são dependentes da composição deste polissacarídeo, conforme apresentado na Figura 2. 20, sendo que ao resíduo G é geralmente atribuída a rigidez e a extensão da cadeia polimérica (DRAGET *et al.*, 2005).

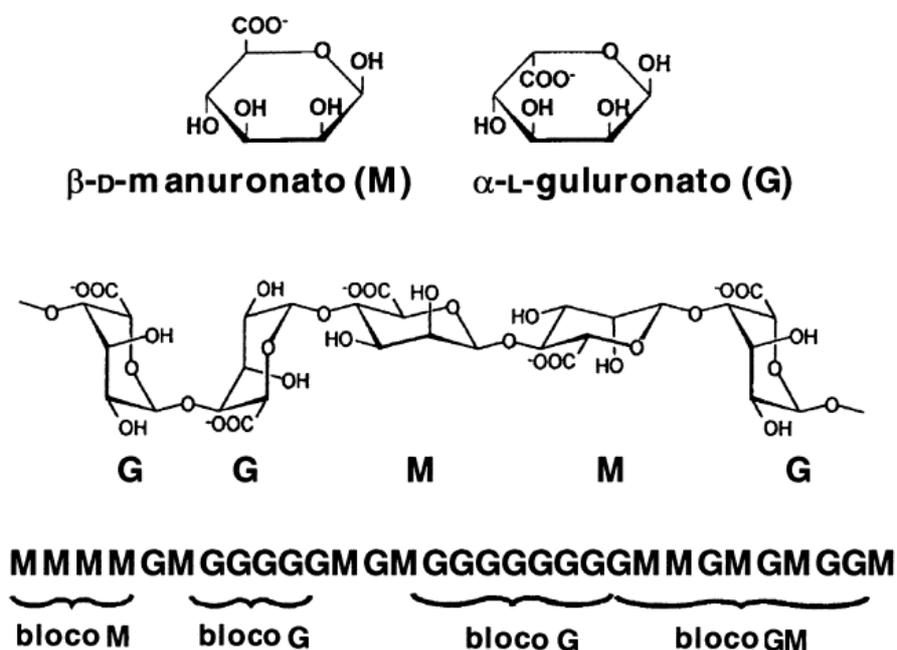


Figura 2. 20: Possíveis configurações do alginato de sódio (DRAGET *et al.*, 2005).

Do ponto de vista fisiológico, acredita-se que os géis dos alginatos sejam responsáveis pela formação da estrutura das algas marrons, garantindo tanto a resistência mecânica

quanto a flexibilidade destes organismos. Em outras palavras, os alginatos se assemelham ao papel que a celulose desempenha nas plantas (DRAGET *et al.*, 2005).

A base para a gelificação do alginato reside em sua ligação seletiva a certos metais, especialmente os alcalinos terrosos. Experimentos de diálise do alginato indicaram que a ligação seletiva de certos íons como o cálcio aumenta bastante com o aumento do teor de blocos G na cadeia e é quase independente em relação ao acréscimo de blocos M e GM (DRAGET *et al.*, 2005). A elevada seletividade destes metais sugere a formação de um quelato, freqüentemente ilustrado pelo “modelo da caixa de ovo”, para representar a forma de diamante assumida pelas cadeias poliméricas, ideal para a ligação com o átomo de cálcio (GRANT *et al.*, 1973). Esta reticulação do alginato é obtida quase independente da temperatura, o que torna a técnica bastante atraente para a imobilização de biomoléculas e células (DRAGET *et al.*, 2005).

2.4.2. O poli(álcool vinílico)

O poli(álcool vinílico), PVA, é um polímero hidrossolúvel, biocompatível e com habilidade para formação de filmes densos. Estas características têm garantido sua aplicação em membranas densas para pervaporação (HAN *et al.*, 2003), permeação de gases (KIM *et al.*, 2004), imunisolamento (BAKER *et al.*, 1997) e biossensores (VIDAL *et al.*, 1999a).

O PVA é produzido pela hidrólise do poli(acetato de vinila), obtido pela polimerização do monômero acetato de vinila (TOYOSHIMA, 1973). A estrutura do polímero hidrolisado é apresentada na Figura 2. 21.

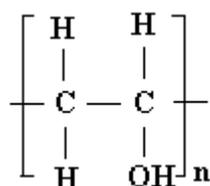


Figura 2. 21: Estrutura química do PVA.

As propriedades físicas do polímero como solubilidade e inchamento em água, estabilidade térmica e cristalinidade são muito dependentes do grau de hidrólise do poli(acetato de vinila) (TOYOSHIMA, 1973).

O PVA forma filmes rígidos e transparentes, resistentes à abrasão e a altas tensões. A qualidade do polímero como barreira para o oxigênio é superior aos demais materiais empregados como embalagem (MILER e LUTZMANN, 1985). Com o intuito de aumentar a flexibilidade e a permeabilidade das membranas, os glicóis têm sido investigados como plastificantes, por apresentarem solubilidade em água e temperatura de ebulição elevada. De modo particular, glicerol e etileno glicol apresentam maior compatibilidade com o PVA (TOYOSHIMA, 1973). A melhoria das propriedades dos filmes através de aditivos pode viabilizar o emprego dos mesmos em sistemas de liberação controlada de drogas (LIM e WAN, 1994) e imobilização de lodo (CHEN *et al.*, 1996), por exemplo.

As soluções aquosas do PVA não são estáveis. Elas podem sofrer uma série de reações complexas reversíveis e irreversíveis de gelificação. Assim, por exemplo, a agregação das cadeias do polímero pode provocar um aumento da viscosidade através da formação de produtos insolúveis.

Dois métodos são empregados para melhorar a estabilidade: a cristalização, geralmente através de um tratamento térmico, e a reticulação, via tratamento químico. Este último método pode aumentar significativamente a estabilidade das membranas de PVA na presença de água e solventes orgânicos, em temperaturas elevadas. Isso é atribuído, principalmente, à presença abundante de grupos hidroxila, o que torna fácil a modificação do polímero com muitos reagentes químicos (HAN *et al.*, 2003). Na Tabela 2. 8 são apresentados os principais agentes reticulantes utilizados.

De um modo geral, utiliza-se o glutaraldeído catalisado por ácido como agente reticulante. A vantagem da utilização deste composto reside em sua bifuncionalidade, que favorece reações intermoleculares, aliada à possibilidade de reação com grupos OH e NH₂, o que é de especial interesse para imobilização de proteínas no PVA.

Vale destacar o trabalho de KIM *et al.* (2004), que investigaram a permeação de gases através de membranas de PVA contendo alginato de sódio inchadas em água. A motivação do estudo consistiu na síntese de membranas de transporte facilitado estáveis para a permeação seletiva de CO₂. Os autores ressaltam que géis inchados em solventes adequados, que é uma configuração intermediária entre as membranas líquidas suportadas e as poliméricas, podem ser empregados para a separação de gases, com taxas de permeação elevadas.

Tabela 2. 8: Tratamentos de reticulação para o PVA.

Utilização	Tratamento	Observação	Trabalho
Permeação de gás	Glutaraldeído/HCl	Inchamento em isopropanol e reticulação com glutaraldeído simultaneamente.	KIM <i>et al.</i> (2004)
Pervaporação	Formaldeído/tratamento térmico Ácido maleico/H ₂ SO ₄ /tratamento térmico	Formaldeído: reação intramolecular. Ácido maleico: reação intermolecular.	HAN <i>et al.</i> (2003)
Biossensor	Glutaraldeído	Imobilização de urease sobre um eletrodo de pH.	SEHITOGULLARI e USLAM (2002)
Pervaporação	Glutaraldeído/HCl e Formaldeído/HCl Tratamento térmico	Glutaraldeído para membranas densas e formaldeído para membranas de osmose inversa	DURMAZ-HILMIOLGLU <i>et al.</i> (2001)
Biossensor	Glutaraldeído/HCl	Imobilizou hemoglobina para determinação de bilirrubina.	VIDAL <i>et al.</i> (1999a)
Pervaporação	Glutaraldeído/H ₂ SO ₄ Tratamento térmico	Membrana catalítica para esterificação assistida por pervaporação	LIU <i>et al.</i> (1999)
Cápsulas	Glutaraldeído/H ₂ SO ₄	Fixação covalente de enzimas no polímero	ARAUJO <i>et al.</i> (1997)

As membranas de PVA e PVA/alginato foram preparadas por espalhamento das soluções aquosas sobre um suporte de ultrafiltração. A reticulação foi realizada

imersando as membranas contendo glutaraldeído em uma solução de isopropanol/água/HCl (90:10:1) por 4 horas, a 40°C. Observou-se que a permeabilidade de N₂ e CO₂ aumenta com o aumento do teor de alginato. A adição deste polissacarídeo (0 a 10% em massa) aumentou o inchamento das membranas em água e diminuiu a cristalinidade, propriedades fundamentais para determinação da magnitude da permeabilidade de gases.

2.5. Biomoléculas imobilizadas em polímeros: aplicações

O desenvolvimento de membranas de transporte facilitado contendo biotransportadores fixos depende da estabilização das hemoproteínas na matriz polimérica. O conhecimento adquirido na imobilização de biomoléculas, mesmo em outras áreas de pesquisa, pode auxiliar na incorporação da hemoglobina ou mioglobina nos filmes sólidos. As áreas correlacionadas envolvem os biossensores, o imunisolamento de células transplantadas, a busca de substitutos para o sangue e de guelras artificiais. Em seguida, os principais avanços em cada uma destas áreas de pesquisa são apresentados.

Na área de biossensores, vale ressaltar o trabalho realizado por Vidal e colaboradores (VIDAL *et al.*, 1996, VIDAL *et al.*, 1999a e b) para fixar a hemoglobina em membranas de PVA reticuladas com glutaraldeído/HCl.

Inicialmente, os autores comprovaram a eficácia da utilização da hemoglobina para degradar a bilirrubina em biliverdina, na presença de glicose oxidase, mesmo quando a proteína tetramérica era imobilizada em PVA (VIDAL *et al.*, 1996).

Avaliando a fixação da hemoglobina no polímero através da reação com glutaraldeído catalisada por HCl, os autores prepararam membranas a 25°C, durante 24 horas. Testes de inchamento em água e de calorimetria exploratória diferencial foram utilizados para inferir a respeito da densidade de reticulação e da organização das cadeias poliméricas. Os resultados mostraram que o aumento das concentrações de HCl e de glutaraldeído provocaram uma maior reticulação do polímero, até um limite em que a flexibilidade dos filmes fica comprometida. Já em relação à hemoglobina, observou-se uma faixa ótima (de 0,25 a 2,5% na solução de espalhamento) em que ocorre decréscimo do

volume livre do polímero, como resultado da incorporação efetiva da biomolécula nos filmes. Concentrações maiores favorecem a segregação da proteína para a superfície das membranas (VIDAL *et al.*, 1999a).

Considerando a imobilização da mistura de glicose oxidase e hemoglobina no PVA através da reação com glutaraldeído/HCl, observou-se perda da atividade catalítica das enzimas e extração da hemoglobina para a fase aquosa. A falta de reprodutibilidade nos ensaios indicou a complexidade do sistema (VIDAL *et al.*, 1999b).

Com o intuito de fornecer oxigênio a células transplantadas, TILAKARATNE *et al.* (2002) investigaram modelos matemáticos considerando a mioglobina imobilizada em suportes de alginato. A simulação indicou um aumento de 50% no suprimento de oxigênio, num raio de 100 μm , evidenciando o potencial do sistema.

A busca de substitutos para o sangue é uma área de pesquisa que também pode oferecer subsídios para as membranas de transporte facilitado. A necessidade de suprimento regular de sangue que atenda às restrições impostas pelo organismo tem motivado muitos trabalhos. A polimerização da hemoglobina por glutaraldeído foi realizada com eficiência por BUDHIRAJA e HELLUMS (2002), visando estabilizar o sistema, já que a proteína fora dos eritrócitos pode ser metabolizada e provoca complicações aos organismos. Os coeficientes de difusão efetivos do O_2 nas proteínas polimerizadas foram maiores que os do sangue (proteínas em eritrócitos), indicando que a reticulação da hemoglobina com glutaraldeído é capaz de manter sua atividade biológica.

O desenvolvimento de guelras artificiais também pode contribuir para a área de membranas de transporte facilitado para permeação seletiva de oxigênio. O dispositivo em questão consiste em uma membrana capaz de retirar o oxigênio dissolvido em um fluido e liberá-lo como gás no permeado (NAGASE *et al.*, 2005, MATSUDA *et al.*, 2001, DAVIS, 1991). Este avanço pode aumentar a autonomia humana na exploração dos mares, por exemplo. O estágio atual da pesquisa envolve a investigação de soluções de hemoglobina ou transportadores sintéticos de oxigênio, usados em fibras ocas. As etapas de complexação e descomplexação com o oxigênio são realizadas em módulos diferentes, o que ainda constitui uma limitação da técnica.

A partir da análise destes trabalhos, observa-se que a síntese de membranas de transporte facilitado contendo biomoléculas para a permeação seletiva de oxigênio é estratégica, já que envolve a fixação de proteínas em matrizes poliméricas hidrofílicas. Os trabalhos publicados indicam que ainda há muito a ser realizado e que a tarefa pode se tornar menos complicada com a utilização do conhecimento adquirido em áreas afins. Eis o nosso desafio.

2.6. Referências bibliográficas

- ARAUJO, A. M., NEVES JR., M. T., AZEVEDO, W. M. *et al.*, 1997, “Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as a support for protein immobilization”, *Biotechnology Techniques*, v. 11, n. 2 (Feb), pp. 67-70.
- BAKER, R. W., 2004, *Membrane Technology and Applications*. 4 ed. New York, John Wiley & Sons, Ltd.
- BAKER, R. W., 2002, “Future directions of membrane gas separation technology”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 41, n. 6 (Mar), pp. 1393-1411.
- BAKER, A. R., FOURNIER, R. L., SARVER, J. G., *et al.*, 1997, “Evaluation of a immunoisolation membrane formed by incorporating a polyvinyl alcohol hydrogel within a microporous filter support”, *Cell Transplantation*, v. 6 n. 6 (Nov-Dec), pp. 585-595.
- BAKER, R. W., ROMAN, I. C., LONSDALE, H. K., 1987, “Liquid membranes for the production of oxygen enriched air. I. Introduction and passive liquid membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 31, n. 1 (Jan), pp. 15-29.
- BERNAL, M. P., BARDAJÍ, M., CORONAS, J., *et al.*, 2002, “Facilitated transport of O₂ through alumina-zeolite composite membranes containing a solution with a reducible metal complex”, *Journal of Membrane Science*, v. 203, n. 1-2 (Jun), pp. 209-213.
- BUDHIRAJA, V., HELLUMS, J. D., 2002, “Effect of hemoglobin polymerization on oxygen transport in hemoglobin solutions”, *Microvascular Research*, v. 64, n. 2 (Sep), pp. 220-233.
- BUEHLER, P. W., BOYKINS, R. A., JIA, Y., *et al.*, 2005, “Structural and functional characterization of glutaraldehyde-polymerized bovine hemoglobin and its isolated fractions”, *Analytical Chemistry*, v. 77, n. 11 (Jun), pp. 3466-3478.
- BURCHELL, T. D., OMATETE, O. O., GALLEGO, N. C., *et al.*, 2005, “Use of carbon fibre composite molecular sieves for air separation”, *Adsorption Science & Technology*, v. 23, n. 3, pp. 175-194.
- CHEN, K. C., CHEN, S. J., HOUNG, J. Y., 1996, “Improvement of gas permeability of denitrifying PVA gel beads”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, n. 7 (May) pp. 502-506.
- CHEN, S. H., LAI, J. Y., 1996, “Polycarbonate/(N, N'-dialicylidene ethylene diamine) cobalt (II) complex membrane for gas separation, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 59, n. 7 (Feb), pp. 1129-1135.

- CHEN, S. H., CHUANG, W.-H., WANG, A. A. *et al.*, 1997a, “Oxygen/nitrogen separation by plasma chlorinated polybutadiene/polycarbonate composite membrane”, *Journal of Membrane Science*, v. 124, n. 2 (Feb), pp. 273-281.
- CHEN, X.-S., NISHIDE, H., OYAIZY, K., *et al.*, 1997b, “Highly selective oxygen transport through a cobalt porphyrin liquid membrane”, *Journal of Physical Chemistry B*, v. 101, n. 29 (Jul), pp. 5725-5729.
- CHEN, S. H., WU, T. H., RUAAN, R. C., *et al.*, 1998, “Effect of top layer swelling on the oxygen/nitrogen separation by surface modified polyurethane membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 141, n. 2 (Apr), pp. 255-264.
- CHOI, M. J., PARK, C. K., LEE, J. M., 1995, “Chelate membrane from poly(vinyl alcohol)/poly(N-salicylidene allyl amine) blend. II. Effect of Co(II) content on oxygen/nitrogen separation”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 58, n. 13 (Dec) pp. 2373-2379.
- CHOW, C. J., 1991, “Relationship between the stability and autoxidation of myoglobin”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, n. 1 (Jan), pp. 22-26.
- CUSSLER, E. L., ARIS, R., BHOWN, A., 1989, “On the limits of facilitated diffusion”, *Journal of Membrane Science*, v. 43, n. 2-3 (May), pp. 149-164.
- DAVIS, S., 1991, “Unsteady facilitated transport of oxygen in hemoglobin-containing membranes and red cells”, *Journal of Membrane Science*, v. 56, n. 3 (Mar), pp. 341-358.
- DELANEY, M. S., REDDY, D., WESSLING, R. A., 1990, “Oxygen/nitrogen transport in glassy polymers with oxygen-binding pedant groups”, *Journal of Membrane Science*, v. 49, n. 1 (Mar), pp. 15-36.
- DEMICHELI, C. P., MAIA, E. C. P., 2005, “Química de Coordenação de sistemas biológicos”. In: Farias, R. F. (org.), *Química de coordenação: fundamentos e atualidades*, capítulo 3, São Paulo, Brasil, Ed. Átomo.
- DRAGET, K. I., SMIDSRD, O., SKJAK-BRAEK, G., 2005, “Alginates from algae”, In: Steinbuechel, A., Rhee, S. K. (eds.), *Polysaccharides in the food industry. Properties, Production, and Patents*, chapter 8, Weinheim, Germany, John Wiley & Sons Ltd.
- DRIOLI, E., ROMANO, M., 2001, “Progress and new perspectives on integrated membrane operations for sustainable industrial growth”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 40, n. 5 (Mar), pp. 1277-1300.
- DURMAZ-HILMIOGLU, N., YILDIRIM, A. E., SAKAOGLU, A. S. *et al.*, 2001, “Acetic acid dehydration by pervaporation”, *Chemical Engineering and Processing*, 40, n. 3 (May), pp. 263-267.
- EIKE, J. H., PALMER, A. F., 2004, “Effect of NaBH₄ concentration and reaction time on physical properties of glutaraldehyde-polymerized hemoglobin”, *Biotechnology Progress*, v. 20, n. 3 (May-Jun), pp. 946-952.
- FERRAZ, H. C., 2003, *Membranas de transporte facilitado para separação de oxigênio utilizando biotransportadores*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FIGOLI, A., SAGER, W. F. C., MULDER, M. H. V., 2001, “Facilitated oxygen transport in liquid membranes: review and new concepts”, *Journal of Membrane Science*, v. 181, n. 1 (Jan), pp. 97-110.

- GARRY, D. J., KANATOUS, S. B., MAMMEN, P. P. A., 2003, “Emerging roles for myoglobin in the heart”, *Trends in Cardiovascular Medicine*, v. 13, n. 3 (Apr), pp. 111-116.
- GEORGE, M., ABRAHAM, T. E., 2006, “Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan – a review”, *Journal of Controlled Release*, v. 114, n. 1 (Ago), pp. 1-14.
- GORDON, R. D., CUSSLER, E. L., 1999, “Possible air separations with superconducting membranes”, *AIChE Journal*, v. 45, n. 11 (Nov), pp. 2313-2325.
- GRANT, G. T., MORRIS, E. R., REES, D. A. *et al.*, 1973, “Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model”, *Febs Letters*, v. 32, n. 1 (May), pp. 195-198.
- HABERT, A. C., BORGES, C. P., NÓBREGA, R., 2006, *Processos de Separação por Membranas*. Rio de Janeiro, e-papers.
- HAN, B., LI, J., CHEN, C., *et al.*, 2003, “Effects of degree of formaldehyde acetal treatment and maleic acid crosslinking on solubility and diffusivity of water in PVA membranes”, *Chemical Engineering Research & Design*, v. 81, n. A10 (Nov), pp. 1385-1392.
- HARGROVE, M. S., WILKINSON, A. J., OLSON, J. S., 1996, “Structural factors governing hemin dissociation from metmyoglobin”, *Biochemistry*, v. 35, n. 35 (Sep) pp. 11300-11309.
- HE, Y., YANG, J., LI, H. *et al.*, 1998, “The effect of oxygen carriers on gas transport through polysiloxane and ethylcellulose membranes”, *Polymer*, v. 39, n. 15 (Jul), pp. 3393-3397.
- HEMMINGSSEN, E., SCHOLANDER, P. F., 1960. “Specific transport of oxygen through hemoglobin solutions”, *Science*, v. 131, n. 3437 (Nov), pp. 1379-1381.
- HONG, J. M., KANG, Y. S., Jang, J. J. *et al.*, 1996, “Analysis of facilitated transport in polymeric membrane with fixed site carrier. 2. Series RC circuit model”, *Journal of Membrane Science*, v. 109, n. 2 (Jan), pp. 159-163.
- HONG, S. U., WON, J. PARK, H. C. *et al.*, 1999, “Estimation of penetrant transport properties through fixed site carrier membranes using the RC circuit model and sensitivity analysis”, *Journal of Membrane Science*, v. 163, n. 1 (Oct), pp. 103-108.
- JOHNSON, B. M., BAKER, R. W., MATSON, S. L., *et al.*, 1987, “Liquid membranes for the production of oxygen-enriched air. II. Facilitated-transport membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 31, n. 1 (Apr), pp. 31-67.
- KAIM, W., SCHWEDERSKI, B., 1994, “The dioxygen molecule, O₂: uptake, transport and storage of an inorganic natural product”. In: *Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life – An introduction and guide*, chapter 4, Grã-Bretanha, John Wiley & Sons.
- KANG, Y. S., HONG, J. M., Jang, J. J. *et al.*, 1996, “Analysis of facilitated transport in solid membranes with fixed site carriers. 1. Single RC circuit model”, *Journal of Membrane Science*, v. 109, n. 2 (Jan), pp. 149-157.
- KHMELNITSKY, Y. L., MOZHAEV, V. V., BELOVA, A. B. *et al.*, 1991, “Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvent as reaction media in biocatalysis”, *European Journal of Biochemistry*, v. 198, n. 1 (May), pp. 31-41.

- KIM, M. J., PARK, Y. I., YOUM, K. H. *et al.*, 2004, “Gas permeation through water-swollen polysaccharide/poly(vinyl alcohol) membranes”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 91, n. 5 (Mar), pp. 3225-3232.
- KURDI, J., TREMBLAY, A. Y., 2003, “Improvement in polyetherimide gas separation membranes through the incorporation of nanostructured metal complexes”, *Polymer*, v. 44, n. 16 (Jul), pp. 4533-4540.
- LI, X.-G., HUANG, M.-R., LIN, G., 1996, “Temperature dependence and stability of oxygen enrichment through liquid crystalline triheptyl cellulose-containing membranes cast from three solvents”, *Journal of Membrane Science*, v. 116, n. 2 (Aug), pp. 143-148.
- LIU, Q., JIA, P., CHEN, H., 1999, “Study on catalytic membranes of H₃PW₁₂O₄₀ entrapped in PVA”, *Journal of Membrane Science*, v. 159, n. 1-2 (Aug), pp. 233-241.
- MANCINI, R. A., HUNT, M. C., 2005, “Current research in meat color”, *Meat Science*, v. 71, n. 1 (Sep), pp. 100-121.
- MATSON, S. L., LONSDALE, H. K., 1987, “Liquid membranes for the production of oxygen-enriched air. III. Process design and economics”, *Journal of Membrane Science*, v. 31, n. 1 (Jan), pp. 69-87.
- MATSUDA, N., SAKAI, K., NAKAMURA, T. *et al.*, 2001, “Temperature-controlled enhancement of oxygen uptake from water using oxygen carrier solution”, *Journal of Membrane Science*, v. 184, n. 1 (Mar), pp. 17-26.
- MILER, G. W., LUTZMANN, H. H., 1985, “Plasticized polyvinyl alcohol compositions, forming process and formed articles”, *U.S. Patent*, 4536532.
- MULDER, M., 1996, *Basic Principles of Membrane Technology*, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- NAGASE, K., KOHORI, F., SAKAI, K. *et al.*, 2005, “Rearrangement of hollow fibers for enhancing oxygen transfer in an artificial gill using oxygen carrier solution”, *Journal of Membrane Science*, v. 254, n. 1-2 (Jun), pp. 207-217.
- NIJDAM, W., JONG, J., van RIJN, C. J. M., *et al.*, 2005, “High performance micro-engineered hollow fiber membranes by smart spinneret design”, *Journal of Membrane Science*, v. 256, n. 1-2 (Jul), pp. 209-215.
- NISHIDE, H., OHYANAGI, M., FUNADA, Y. *et al.*, 1987, “Oxygen transport behavior through the membrane containing a fixed carrier and adhered to a second polymer”, *Macromolecules*, v. 20, n. 9 (Sep), pp. 2312-2313.
- NISHIDE, H., KAWAKAMI, H., TODA, S. *et al.*, 1991a, “Selective sorption and facilitated transport of oxygen in porphinatocobalt-coordinated polymer membranes”, *Macromolecules*, v. 24, n. 21 (Oct), pp. 5851-5855.
- NISHIDE, H., KAWAKAMI, H., SUZUKI, T. *et al.*, 1991b, “Effect of polymer matrix on the oxygen diffusion via cobalt porphyrin fixed in a membrane”, *Macromolecules*, v. 24, n. 23 (Nov), pp. 6306-6309.
- NISHIDE, H., TSUKAHARA, Y., TSUCHIDA, E., 1998, “Highly selective oxygen permeation through a poly(vinylidene dichloride)-cobalt porphyrin membrane: hopping transport of oxygen via the fixed cobalt porphyrin carrier”, *J. Phys. Chem. B*, v. 102, n. 44 (Oct), pp. 8766-8770.
- NOBLE, R. D., WAY, J. D., POWERS, L. A., 1986, “Effect of external mass transfer resistance on facilitated transport”, *Industrial and Engineering Chemical Fundamentals*, v. 25, n. 3 (Aug), pp. 450-452.

- NOBLE, R. D., 1990, "Analysis of facilitated transport with fixed site carrier membranes", *Journal of Membrane Science*, v. 50, n. 2 (Jun), pp. 207-214.
- NOBLE, R. D., KOVAL, C. A., PELLEGRINO, J. J., 1989, "Facilitated transport membrane systems", *Chemical Engineering Progress*, v. 11, n. 3 (Mar), pp. 58-70.
- ORDWAY, G. A., GARRY, D. J., 2004, "Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle", *Journal of Experimental Biology*, v. 207, n. 20 (Sep), pp. 3441-3446.
- PARK, C. K., CHOI, M. J., LEE, J. M., 1997, "Chelate membrane from poly(vinyl alcohol)/poly(N-salicylidene allyl amine) blend. III. Effect of Mn (II) and Co (II) on oxygen/nitrogen separation", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 66, n. 3 (Oct) pp.483-490.
- QI, W., MA, J. LIU, Y. *et al.*, 2006, "Insight into permeability of protein through microcapsule membranes", *Journal of Membrane Science*, v. 269, n. 1-2 (Feb), pp. 126-132.
- ROMAN, I. C., BAKER, R. W., 1985, "Method and apparatus for producing oxygen and nitrogen and membrane therefor", *U. S. Patent*, 4542010.
- RUAAN, R. C., CHEN, S. H., LAI, J. Y., 1997, "Oxygen/nitrogen separation by polycarbonate/Co(SalPr) complex membranes", *Journal of Membrane Science*, v. 135, n. 1 (Nov), pp. 9-18.
- RUAAN, R. C., WU, T.-H., CHEN, S.-H. *et al.*, 1998, "Oxygen/nitrogen separation by polybutadiene/polycarbonate composite membranes modified by ethylenediamine plasma", *Journal of Membrane Science*, v. 138, n. 2 (Jan), pp. 213-220.
- SCHOLANDER, P.F., 1960, "Oxygen transport through hemoglobin solutions", *Science*, v. 131, n. 3400 (Feb), pp. 585-590.
- SEHITOGULLARI, A., USLAM, A. H., 2002, "Preparation of a potentiometric immobilized urease electrode and urea determination in serum", *Talanta*, v. 57, n. 6 (Jul), pp. 1039-1044.
- SHENTU, B., NISHIDE, H., 2003, "Facilitated oxygen transport membranes of picket-fence cobaltoporphyrin complexed with various polymer matrixes", *Ind. Eng. Chem.Res.*, v. 42, n. 24 (Nov), pp. 5954-5958.
- SHREVE, R. N., BRINK JR., J. A., 1997, *Indústrias de processos químicos*. 4 ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S. A.
- SMITH, D. R., QUINN, J. A., 1979, "The prediction of facilitation factors for reaction augmented membrane transport", *AIChE Journal*, v. 21, n. 1, pp. 197-200.
- STRATHMANN, H., 2001, "Membrane separation processes: current relevance and future opportunities", *AIChE Journal*, v. 47, n. 5 (May), pp. 1077-1087.
- STRYER, L., 1999, *Biochemistry*. 4 ed., New York, W. H. Freeman and Company.
- SUGAWARA, Y., MATSUOKA, A., KAINO, A. *et al.*, 1995, "Role of globin moiety in the autoxidation reaction of oxymyoglobin: effect of 8 M urea", *Biophysical Journal*, v. 69, n. 2 (Aug), pp. 583-592.
- SUZUKI, T. YASUDA, H., NISHIDE, H. *et al.*, 1996, "Electrochemical measurement of facilitated oxygen transport through a polymer membrane containing cobaltporphyrin as a fixed carrier", *Journal of Membrane Science*, v. 112, n. 2 (Apr), pp. 155-160.
- TAQIEDDIN, E., AMIJI, M., 2004, "Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules", *Biomaterials*, v. 25, n. 10 (May), pp. 1937-1945.

- TILAKARATNE, H. K., HUNTER, S. K., RODGERS, V. G. J., 2002, “Mathematical modeling of myoglobin facilitated transport of oxygen in devices containing myoglobin-expressing cells”, *Mathematical Biosciences*, v. 176, n. 2 (Apr), pp. 253-267.
- TOYOSHIMA, K., 1973, “General properties of polyvinyl alcohol in relation to its applications”, In: Finch, C. A. (Ed.), “*Polyvinyl alcohol – Properties and applications*”, chapter 2 and 14, Londres, John Wiley & Sons.
- UEKI, N., CHOW, C. J., OCHIAI, Y., 2005, “Characterization of bullet tuna myoglobin with reference to the thermostability-structure relationship”, *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, n. 12 (Jun), pp. 4968-4975.
- VIDAL, M. M., DELGADILLO, I., GIL, M. H. *et al.*, 1996, “Study of an enzyme coupled system for the development of fibre optical bilirubin sensors”, *Biosensors & Bioelectronics*, v. 11, n. 4, pp. 347-354.
- VIDAL, M. M. B., GIL, M. H., DELGADILLO, I., *et al.*, 1999a, “Swelling and thermal properties of poly(vinyl alcohol) containing hemoglobin membranes”, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 14, n. 3 (May), pp. 243-257.
- VIDAL, M. M. B., GIL, M. H., DELGADILLO, I., *et al.*, 1999b, “Study of the thermal stability and enzymatic activity of an immobilized enzymatic system for the bilirubin oxidation”, *Biomaterials*, v. 20, n. 8 (Apr), pp. 757-763.
- VOET, D., VOET, J. G., PRATT, C. W., 2000, “Função das Proteínas”. In: *Fundamentos de Bioquímica*, capítulo 4, Brasil, Artmed Editora.
- WANG, C. C., CHENG, M. H., CHEN, C. Y. *et al.*, 2002, “Facilitated transport of molecular oxygen in cobalt-chelated copolymer membranes prepared by soap-free emulsion polymerization”, *Journal of Membrane Science*, v. 208, n. 1-2 (Oct), pp. 133-145.
- WANG, Y. C., HUANG, S. H., HU, C. C. *et al.*, 2005, “Sorption and transport properties of gases in aromatic polyimide membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 248, n. 1-2 (Feb), pp. 15-25.
- WARD, W. J., 1970, “Analytical and experimental studies of facilitated transport”, *AIChE Journal*, v. 16, n. 3, pp. 405-410.
- WAY, J. D., NOBLE, R. D., 1992, “Facilitated transport”, In: HO, W. S W., SIRKAR, K. K. (Eds.), *Membrane Handbook*, United States, Van Nostrand Reinhold.
- WITTENBERG, J. B., 1966, “The molecular mechanism of hemoglobin-facilitated oxygen diffusion”, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 241, n. 1, pp. 104-114.
- YAN, B., WANG, Q., HE, W. H. *et al.*, 2003, “Two-dimensional infrared correlation spectroscopy study of sequential events in the heat-induced unfolding and aggregation process of myoglobin”, *Biophysical Journal*, v. 85 (Sep), pp. 1959-1967.
- YANG, J. P., HUANG, P. C., 2000a, “Facilitated transport of oxygen in ethyl cellulose membranes containing cobalt porphyrins as oxygen carriers”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 77, n. 3 (Jul), pp. 484-488.
- YANG, J., HUANG, P., 2000b, “A study of cobalt (II) porphyrins on their oxygen-binding behaviors and oxygen-facilitated transport properties in polymeric membranes”, *Chemistry of Materials*, v. 12, n. 9 (Sep), pp. 2693-2697.

Capítulo 3:

Estabilidade estrutural da mioglobina em fase orgânica

A estabilidade estrutural da mioglobina equina em solventes orgânicos e em soluções aquosas destes co-solventes é apresentada neste capítulo com o objetivo de determinar os sistemas em que a proteína é capaz de manter sua conformação nativa. Esta descoberta pode ampliar a escolha de solventes utilizados no preparo das membranas poliméricas contendo biotransportadores. As técnicas analíticas utilizadas para inferir sobre a estabilidade da proteína nestes solventes não naturais foram a espectroscopia no UV-visível e o dicroísmo circular. A inversão da polaridade da mioglobina com dodecil sulfato de sódio também foi avaliada, visando aumentar a solubilidade da proteína em fase orgânica.

3.1. Introdução

A função fisiológica primária das hemoproteínas consiste no transporte e no armazenamento do oxigênio molecular nos organismos vivos, o que possibilitou a utilização de um grande reservatório de energia através da oxidação da glicose a CO₂ e H₂O (VOET *et al.*, 2000). O aparecimento destes biotransportadores e o desenvolvimento de um sistema circulatório eficiente constituíram uma resposta evolutiva às limitações impostas pelas baixas solubilidade e difusividade do oxigênio, permitindo a existência de espécies mais complexas e maiores (STRYER, 1999). O desenvolvimento de um envoltório protéico ao redor do grupo hemo, como apresentado na Figura 3. 1, garantiu a proteção contra a oxidação do ferro (II) a ferro (III). Em outras palavras, a porção globina é responsável pelo impedimento espacial que previne a formação de oxo-dímeros, estrutura intermediária na autooxidação da porfirina (KAIM e SCHWEDERSKY, 1994). Porém, a cavidade hidrofóbica em que se localiza o grupo prostético não está completamente isolada do ambiente externo, estando sujeita à entrada de moléculas de água e de íons hidroxila que desempenham uma função deletéria no sítio ativo, desativando o ferro (SUGAWARA *et al.*, 1995). Como

alternativa, os glóbulos vermelhos do sangue e os tecidos possuem oxirredutases para evitar que as concentrações de metaemoglobina e metamioglobina atinjam níveis elevados (SHIKAMA, 2006).

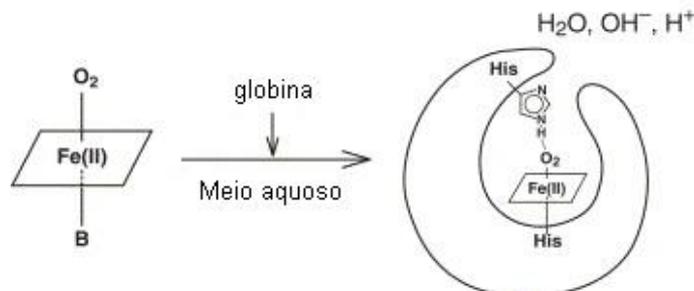


Figura 3. 1: Desenho esquemático da função da porção globina na proteção do grupo hemo contra a autoxidação (SHIKAMA, 2006).

A aplicação das hemoproteínas em ambientes *ex-vivo* é muito limitada às condições fisiológicas que favorecem o desempenho de suas atividades catalíticas, já que a não observância destas restrições pode danificar permanentemente tanto a mioglobina quanto a hemoglobina, reduzindo o seu tempo de vida útil. A investigação da atividade destas proteínas em fase orgânica constitui uma das alternativas para prevenir a perda de atividade biológica nos processos industriais, já que a oxigenação dos transportadores sintéticos pode sofrer alteração em função do solvente empregado (NIEDERHOFFER *et al.*, 1984). Portanto, a utilização de solventes não aquosos pode aumentar a estabilidade destas biomoléculas em membranas poliméricas e ampliar sua aplicabilidade.

A idéia de proteínas ativas em solventes orgânicos não é intuitiva porque a atividade biológica foi desenvolvida em ambiente aquoso e, portanto, a água foi incorporada na estrutura tridimensional destas macromoléculas, interferindo na função e na dinâmica das mesmas. Estudos estruturais indicam que a água altera a especificidade, a cooperatividade e a termodinâmica dos sítios ligantes durante a catálise enzimática. Sabe-se, porém, que as proteínas são estáveis em alguns solventes orgânicos e que algumas enzimas são capazes de reter a atividade catalítica neste meio. A descoberta dos fatores que diminuem a atividade enzimática em meio orgânico pode levar ao entendimento do fenômeno e ajudar na proposição de alternativas para compensar estes efeitos (MATTOS e RINGE, 2001, KLIBANOV, 2001).

Uma técnica utilizada para aumentar a solubilidade de proteínas em fase orgânica é conhecida pelo nome de emparelhamento iônico hidrofóbico. Ele consiste na substituição estequiométrica de contra-íons polares como cloreto, acetato ou nitrato por um detergente iônico com carga semelhante. Moléculas anfifílicas de baixa massa molar são capazes de reduzir a solubilidade de proteínas em meio aquoso e aumentá-la em fase orgânica, com manutenção da estrutura nativa e da atividade enzimática (MEYER e MANNING, 1998).

Em relação ao solvente orgânico utilizado, a hidrofobicidade, a capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio e a miscibilidade em água são propriedades que apresentam influência na integridade estrutural e na atividade catalítica das enzimas. Acredita-se que as proteínas dissolvidas em solventes hidrofóbicos retêm sua estrutura nativa como resultado de uma imobilidade cinética que resulta de ligações de hidrogênio fortes entre os átomos da proteína, o que leva a uma estrutura mais rígida na ausência de água (GRIEBENOW e KLIBANOV, 1996). Por outro lado, em solventes orgânicos solúveis em água, qualquer molécula desta que possa estar presente tende a ficar na superfície da proteína. A adição de pequenas quantidades de água é suficiente para aumentar a atividade catalítica nestes solventes não naturais. Solventes muito polares, por outro lado, podem facilmente remover água da superfície das proteínas e competem pelas ligações de hidrogênio, causando desnaturação. Já os álcoois apresentam alguns componentes hidrofílicos, mas são competidores moderados por ligações amida/hidrogênio. Eles tendem a romper a estrutura terciária e deixar grande parte das interações da estrutura secundária intactas (MATTOS e RINGE, 2001).

Estudos de conformação de proteínas em uma variedade de solventes mostraram que a estrutura nativa pode representar o mínimo energético global em alguns solventes não-aquosos. Ensaio de calorimetria conduzidos para a lisozima em glicerol apresentaram a mesma estabilidade da solução aquosa na faixa de 20 a 80°C (BUROVA *et al.*, 2000). Embora não haja dúvidas de que exista uma exigência estrutural mínima para que haja atividade biológica, a idéia de que todas as proteínas têm de estar intactas em relação à estrutura nativa para que ocorra a catálise não é generalizada (GUO e CLARK, 2001). O metanol é um exemplo de solvente que aumenta a possibilidade de conformações

intermediárias e tem sido usado em estudos de conformação de proteínas e de transições conformacionais em peptídeos sintéticos (KONY *et al.*, 2007).

A correlação das propriedades dos solventes orgânicos com a capacidade de manutenção da estrutura de proteínas visa a predição da atividade enzimática em um meio específico. Assim, por exemplo, a solubilidade em naftaleno tem sido usada como parâmetro para avaliar a desnaturação de proteínas em meio orgânico (ROSELL *et al.*, 1995). KHMELNITSKY *et al.* (1991) desenvolveram um modelo termodinâmico para descrever a desnaturação reversível de proteínas em fase orgânica baseado no fato de que existe uma quantidade crítica de água removida da camada de hidratação que compromete a atividade catalítica da enzima. O tratamento quantitativo levou em consideração a concentração limite do solvente orgânico que causou mudança brusca nas propriedades catalítica ou espectroscópica de proteínas como a quimotripsina, a tripsina, a lacase, o quimotripsinogênio, o citocromo c e a mioglobina com as propriedades físico-químicas como hidrofobicidade, capacidade de solvatação e geometria molecular e, a partir deles, foi estabelecida a escala DC, sigla para capacidade de desnaturação, visando classificar os diferentes solventes orgânicos. Embora a escala tenha apresentado validade para uma série de solventes orgânicos, o comportamento das enzimas testadas em formamida e N-metilformamida, por exemplo, não é completamente compreendido, revelando que as propriedades específicas de cada sistema influenciam bastante na manutenção da conformação das proteínas.

Muitos estudos conformacionais de proteínas em meio orgânico utilizam a mioglobina como modelo, dado o conhecimento acumulado pelos pesquisadores em relação às propriedades (BABU e DOUGLAS, 2000). Assim, por exemplo, o efeito do dimetil sulfóxido, DMSO, como solvente e co-solvente da mioglobina tem sido estudado (JACKSON e MANTSCH, 1991 e LI e MABROUK, 2003). Observou-se que, embora o perfil de absorção no visível para a proteína dissolvida em DMSO puro se mantenha em grande extensão (LI e MABROUK, 2003), a estrutura secundária e a estabilidade térmica da proteína neste meio são muito alteradas, mesmo para pequenas concentrações do co-solvente, indicando que o grupo sulfóxido, forte acceptor de hidrogênio, competiu com os peptídeos pela água de hidratação da mioglobina (JACKSON e MANTSCH, 1991).

As alterações espectroscópicas da metamioglobina equina em misturas água/glicerol foram estudadas por BARTERI *et al.* (1996) para determinar a influência deste solvente orgânico na estrutura e estabilidade termodinâmica da proteína. Os resultados indicaram um aumento de 8% no teor α -helicoidal da mioglobina em solução aquosa de glicerol (glicerol/água 60:40 em volume). O aumento dos segmentos helicoidais induzido pelo solvente orgânico provavelmente afetou a estrutura global da mioglobina, com perda das moléculas de água presentes no interior da macromolécula, indicando que o glicerol desempenha um papel importante na interação entre o solvente e as regiões que conectam as α -hélices. A alteração estrutural pode ter sido o resultado de um rearranjo de segmentos não helicoidais GH e EF, que envolveram mudanças nos ângulos de orientação. As mudanças conformacionais que afetam a região EF devem perturbar o microambiente reservado ao grupo hemo, uma vez que a histidina proximal (His 93) e a histidina distal (His 64) estão localizadas respectivamente nas hélices E e F.

3.2. Objetivo

Tendo em vista a necessidade de estudar os fatores que afetam a conformação de proteínas em meio orgânico, o objetivo desta etapa do trabalho consistiu na avaliação da estabilidade estrutural da mioglobina equina em solventes orgânicos e em soluções aquosas destes co-solventes para ampliar as condições de síntese das membranas poliméricas de transporte facilitado de oxigênio. Portanto, a estrutura da metamioglobina foi investigada através de técnicas espectroscópicas.

Embora biologicamente inativa, esta forma da proteína foi usada no estudo estrutural por simplicidade, para evitar a trabalhosa etapa de ativação da proteína. Além disso, o estudo conformacional foi realizado considerando que a oximioglobina apresentaria comportamento semelhante nos diversos solventes investigados. Vale ressaltar, ainda, que a manutenção da estrutura nativa é apenas um dos requisitos para a manutenção da atividade biológica da proteína.

Inicialmente, os perfis de absorção no visível foram utilizados para inferir a respeito das modificações do grupo hemo provenientes da adição dos solventes orgânicos. Após 15 horas do preparo destas soluções, a estrutura secundária da proteína foi analisada por dicroísmo circular para investigar se a exposição prolongada da biomolécula ao meio

provoca alterações em relação à conformação nativa. Alternativamente, o estudo do aumento da solubilidade da mioglobina em fase orgânica pela substituição de contra-íons por um detergente aniônico foi investigado, visando a modificação da hidrofiliabilidade superficial da proteína.

3.3. Materiais e métodos

3.3.1. Materiais

Os reagentes utilizados foram a metamioglobina eqüina (Sigma-Aldrich, teor mínimo de 90%), dodecil sulfato de sódio (Sigma, conteúdo maior que 99%), ditionito de sódio (Vetec) e os solventes orgânicos listados na Tabela 3. 1. Os solventes foram utilizados na forma em que foram fornecidos pelos fabricantes. As principais características destes solventes são apresentadas no Anexo 1.

Tabela 3. 1: Compostos orgânicos investigados como solventes para a mioglobina.

Solvente	Fabricante	MM (g/mol)	Teor (%)	Solvente	Fabricante	MM (g/mol)	Teor (%)
Formamida	Vetec	45,04	99,0	Isobutanol	Vetec	74,12	99,0
Etileno glicol	Vetec	62,03	99,5	Sec-butanol	Vetec	74,12	99,0
Glicerol	Vetec	92,09	99,5	1,4-Dioxano	Vetec	88,10	99,0
Metanol	Vetec	32,04	99,8	Tetrahidrofurano	Vetec	72,10	99,5
Etanol	Vetec	46,07	99,8	N-Metilpirrolidona	Vetec	99,13	99,0
Dimetil sulfóxido	RioLab	78,13	99,8	Hexano	Merck	86,18	99,0
N,N-Dimetilformamida	Spectrum	73,10	99,8	Clorofórmio	Vetec	119,39	99,8
Isopropanol	Vetec	60,09	99,5	Acetato de Etila	CarloErba	88,10	99,8
N-butanol	CarloErba	74,12	99,5	Tolueno	Vetec	92,13	99,5
Acetona	Vetec	58,08	99,5	-	-	-	-

Os sais de fosfato de sódio monobásico monoidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Vetec) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4 , Vetec) foram utilizados para o preparo de soluções tampão fosfato, pH 7. Já o ácido acético (Vetec) e acetato de sódio (Vetec) foram utilizados para o preparo de soluções tampão acetato pH 5,7, na concentração de 0,1 M. Todas as soluções foram preparadas com água destilada, deionizada e microfiltrada.

3.3.2. Caracterização da mioglobina

As formas fisiológicas da mioglobina (metamioglobina, oximioglobina e desoximioglobina) foram caracterizadas por espectrofotometria no UV-visível. Para isso, a metamioglobina comercial foi dissolvida em solução tampão fosfato na concentração de 5 g/L e reduzida com ditionito de sódio, utilizando razão mássica proteína/agente redutor igual a 1, na temperatura ambiente (25°C). As formas oxi e desoxi da mioglobina reduzida foram separadas por filtração em gel, utilizando a resina Sephadex G25 superfina (Aldrich), conforme descrito por FERRAZ (2003). Estas etapas de redução e separação da mioglobina dos resíduos da reação serão detalhadas no Capítulo 4.

Como os testes de estabilidade foram realizados com a mioglobina na forma férrica, conforme apresentada pelo fabricante, utilizou-se os métodos de Bradford (BRADFORD, 1976) e o coeficiente de extinção da proteína a 409 nm ($\epsilon = 160 \text{ mM}^{-1}$) para quantificar a mesma em solução. Esta estratégia foi utilizada para comparar os métodos analíticos.

O efeito da força iônica na estrutura da oximioglobina foi investigada variando-se as concentrações da solução tampão fosfato pH 7 de 0,0625 a 2 mol/L, além da investigação da proteína dissolvida em água destilada, pH 6,2. Para avaliar o efeito do pH na estrutura da metamioglobina, a escala foi variada de 3 a 9, utilizando-se tampão fosfato de pH 5 a 8, os sais ácido e básico para pH 4 e 9, respectivamente, e tampão acetato para pH 3. A comparação dos perfis de absorção por espectroscopia no visível foi utilizada para inferir sobre a estrutura da proteína nas soluções. Todos os testes foram conduzidos a 25°C.

3.3.3. Estabilidade da mioglobina em solventes orgânicos

A estabilidade conformacional da metamioglobina em fase orgânica foi investigada por meio da dissolução da proteína em solventes orgânicos e em soluções aquosas do co-solvente orgânico nas concentrações de 96% e 50% em volume e na concentração denominada C_{50} , conforme apresentado no trabalho de KHMELNITSKY *et al.* (1991). Os testes foram realizados a 25°C. Segundo os autores, o valor de C_{50} corresponde à

concentração do co-solvente orgânico em tampão aquoso onde há desnaturação de 50% da proteína, condição determinada pelas alterações espectrofotométricas, ou seja, queda brusca da absorção da metamioglobina a 409 nm. Na Tabela 3. 2, são apresentadas a concentração molar e a porcentagem em volume correspondentes ao valor de C_{50} para os solventes orgânicos investigados.

A concentração final da mioglobina foi mantida em 11 $\mu\text{mol/L}$ (equivalente a 0,2 mg/mL). Para os testes com co-solventes orgânicos, a mioglobina foi dissolvida em tampão acetato (pH 5,7), seguida pela adição do solvente orgânico de interesse. As soluções assim obtidas foram analisadas por espectrofotometria no UV-visível (Espectrofotômetro UV mini 1240, Shimadzu), a 25°C, em intervalo de tempo inferior a 10 minutos, a partir da adição do co-solvente. Os solventes orgânicos ou as misturas tampão/solvente orgânico sem mioglobina foram utilizados como referência antes das leituras das amostras contendo a proteína.

Tabela 3. 2: Concentração do co-solvente orgânico onde há queda na absorção a 409 nm de metade da metamioglobina, C_{50} , conforme KHMELNITSKY *et al.* (1991).

Solvente	C_{50} (mol/L)	C_{50} (% v/v)
Formamida	9,3	37
Etileno glicol	14,3	80
Metanol	12,4	50
Etanol	5,3	31
Dimetilsulfóxido	6,5	46
N,N-Dimetilformamida	7,7	60
2-Propanol	3,4	26
1-Butanol	0,9	8
Acetona	2,2	16
2-Metil-1-Propanol	0,8	7
2-Butanol	-	20 ¹
1,4-Dioxano	2,5	21
Tetrahidrofurano	1,4	11

(-) Dado não disponível.

¹ HERSKOVITS *et al.*, 1970.

Foram realizados testes de espectrofotometria de dicroísmo circular (Espectropolarímetro Jasco J-715) nos sistemas em que a adição do co-solvente orgânico não provocou

alteração nos espectros de UV-visível. Os dados obtidos com o CD foram convertidos em elipsidade molar (ϵ_M), conforme apresentado na Equação 3. 1.

$$\epsilon_M = \frac{CD}{10 \times C \times c \times (N - 1)} \quad \text{Equação 3. 1}$$

Onde CD foi o sinal obtido na análise, C é a concentração molar da proteína, c é o caminho ótico percorrido e N é o número de resíduos da mioglobina. Com auxílio do programa CD-Pro (SREERAMA e WOODY, 2000) foram determinados os teores de α -hélices e de folhas- β da mioglobina em cada um dos sistemas. O cálculo foi realizado utilizando o algoritmo CDSSTR (MANAVALAN e JOHNSON JR., 1987), que compara os perfis de absorção com o banco de dados de referência, constituído por 56 proteínas, incluindo a mioglobina.

3.3.4. Inversão da polaridade da mioglobina com dodecil sulfato de sódio

A adição de pequenas quantidades de dodecil sulfato de sódio, SDS, a soluções ácidas de mioglobina foi estudada, com o objetivo de inverter a polaridade desta proteína, aumentando sua solubilidade em meio orgânico. Em pequenas proporções em relação à molécula do peptídeo, o SDS pode emparelhar-se nos resíduos básicos da proteína, alterando sua solubilidade, sem perda da atividade biológica (MEYER e MANNING, 1998). A mioglobina foi dissolvida em tampão acetato e, em seguida, foram adicionadas as quantidades desejadas de uma solução aquosa de SDS, de modo que a concentração final da proteína na solução fosse de 0,2 mg/mL (11 μ mol/L). A razão molar SDS/mioglobina foi investigada de 5 a 200, incluindo o valor 33, por se tratar do número de resíduos básicos da proteína. Espera-se que nesta razão haja a substituição estequiométrica dos ânions pelas moléculas do detergente aniônico (MEYER e MANNING, 1998).

Para avaliar o aumento de solubilidade da mioglobina em solventes apolares, o aumento da partição da proteína em meio orgânico foi realizado através da adição dos solventes orgânicos, hexano e óleo de silicone, na proporção volumétrica de 1:1, de acordo com

MATSUURA *et al.* (1993). Em ambos os casos, o aumento de solubilidade foi investigado a partir dos espectros no UV-visível das fases orgânica e aquosa.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Caracterização da mioglobina

As principais características da mioglobina utilizada são apresentadas na Tabela 3. 3. Os coeficientes de extinção (ϵ) correspondem à proteína dissolvida em 0,1 M da solução de tampão fosfato pH 7.

Tabela 3. 3: Principais propriedades da mioglobina equina.

Propriedade	Valor
Massa Molar (kDa)	18,8
Ponto isoelétrico (pI)	7,0-7,4
<i>Formas Fisiológicas</i>	<i>Absorção característica e Coef. de extinção</i>
Metamioglobina	409 ($\epsilon = 160 \text{ mM}^{-1}$) e 630 nm
Desoximioglobina	434 e 556 nm ($\epsilon = 11,8 \text{ mM}^{-1}$)
Oximioglobina	418, 543 e 581 nm ($\epsilon = 13,3 \text{ mM}^{-1}$)

Os espectros característicos da metamioglobina (metamb), oximioglobina (oximb) e desoximioglobina (desoximb) são apresentados na Figura 3. 2. Embora a faixa de concentração investigada corresponda a valores de absorção maiores que 1, estes espectros foram considerados de modo qualitativo. Comparando a Figura 3. 2 com os picos característicos da mioglobina apresentados na Tabela 3. 3, observa-se que os espectros obtidos experimentalmente estão de acordo com o esperado. O pico mais espalhado observado para metamb em 502 nm corresponde, provavelmente, a impurezas da amostra. Constatou-se que as diferentes formas da mioglobina podem ser identificadas por uma técnica analítica simples, como a espectrofotometria no visível. Além disso, verificou-se que a metodologia utilizada para reduzir a metamioglobina comercial foi efetiva, mantendo a conformação nativa da proteína. A banda de absorção característica das hemoproteínas – e também de maior intensidade – é na região do Soret, que corresponde a 409 nm para a metamioglobina, 418 nm para a oximioglobina e 434 nm para a desoximioglobina.

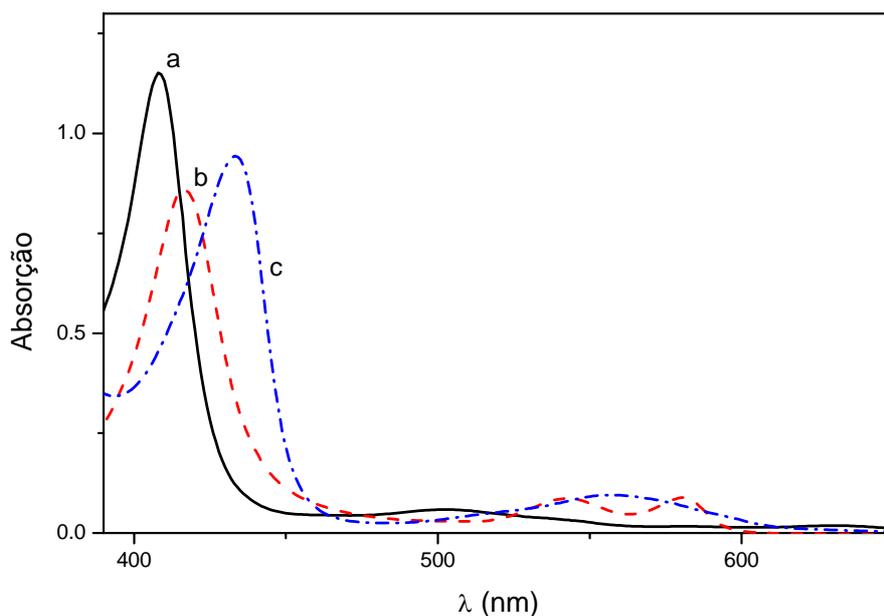


Figura 3. 2: Espectros de absorção das formas fisiológicas da mioglobina no visível. 11 $\mu\text{mol/L}$ de mioglobina dissolvida em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH = 7. a) metamioglobina, b) oximioglobina, c) desoximioglobina.

A concentração da solução de metamioglobina foi determinada utilizando o coeficiente de extinção e o método colorimétrico de Bradford. Os resultados obtidos foram de 5,06 e 5,13 g/L, respectivamente, indicando concordância entre os métodos. Assim, o coeficiente de extinção será utilizado para quantificar a proteína nos próximos testes por simplicidade.

O efeito da força iônica da solução na estrutura da oximioglobina foi avaliado por espectroscopia no visível e os resultados são apresentados na Figura 3. 3. A concentração da solução tampão fosfato pH 7 foi variada de 0,0625 a 2 M, além dos testes com água destilada (pH 6,3). Estes testes foram conduzidos para investigar a estabilidade da proteína em soluções de diluídas de fosfato.

Os perfis de absorção da oximioglobina mantiveram-se praticamente intactos com a variação da força iônica na solução, o que indicou a viabilidade de utilização da oximioglobina dissolvida em água para a síntese das membranas poliméricas. Entretanto, outras técnicas devem ser utilizadas para verificar a manutenção da atividade biológica nestes sistemas.

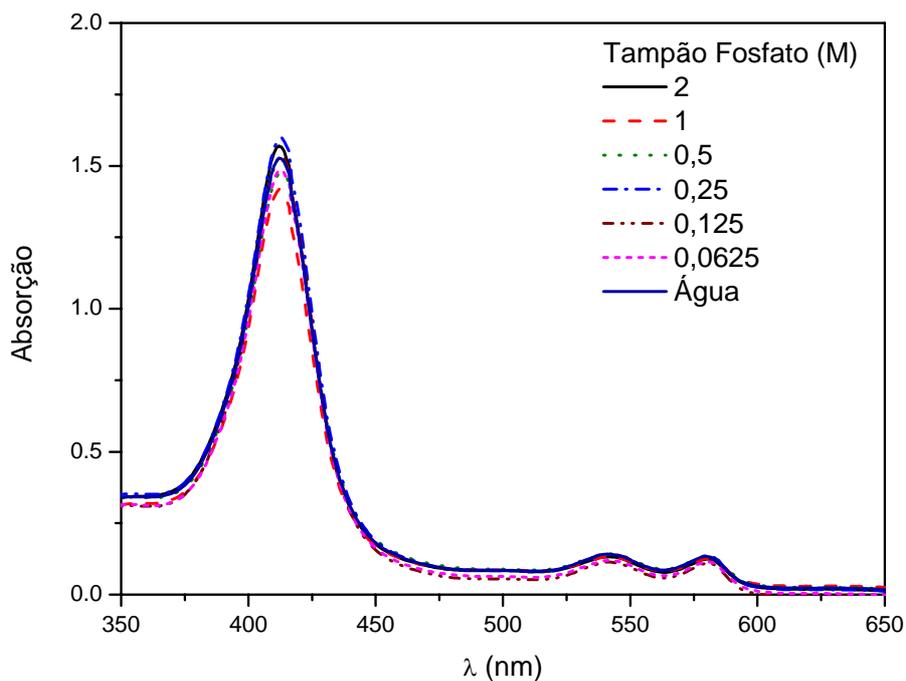


Figura 3. 3: Influência da força iônica na estrutura da oximioglobina em tampão fosfato pH 7 e em água, pH 6,2. Os valores numéricos na legenda da figura referem-se à concentração do tampão, em mol/L.

Novos ensaios foram conduzidos para determinar o efeito do pH do meio na estrutura da proteína e os resultados são apresentados na Figura 3. 4.

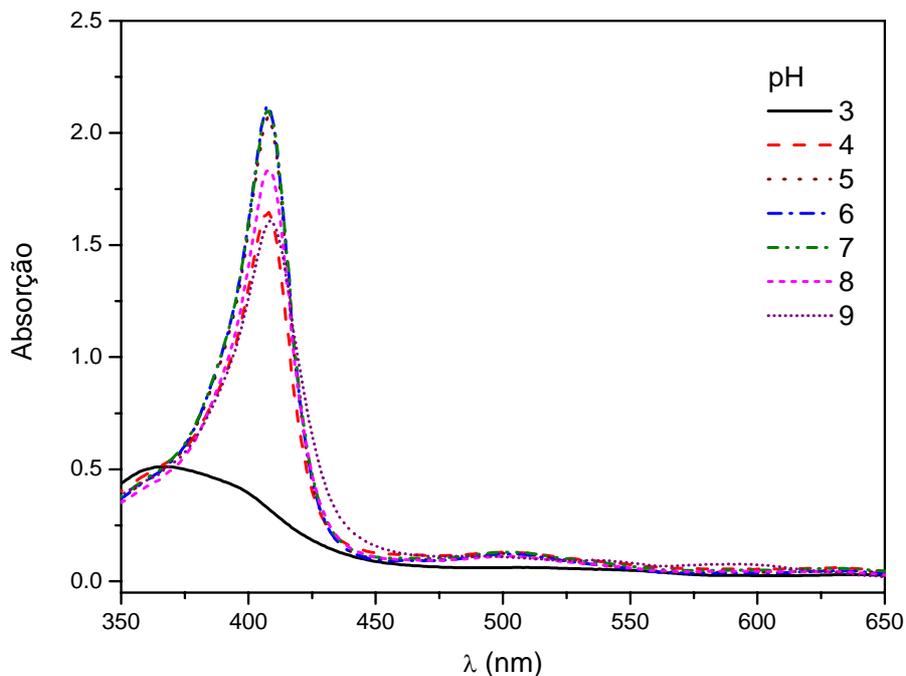


Figura 3. 4: Influência do pH na estrutura da metamioglobina.

O espectro de absorção da metamioglobina em pH 3 foi descaracterizado, indicando desnaturação da proteína. Para pH igual a 4, 8 e 9, houve manutenção do perfil, mas com redução da intensidade de absorção, conforme ilustrado na Figura 3. 5, onde as intensidades de absorção a 409 nm são apresentadas como função do pH.

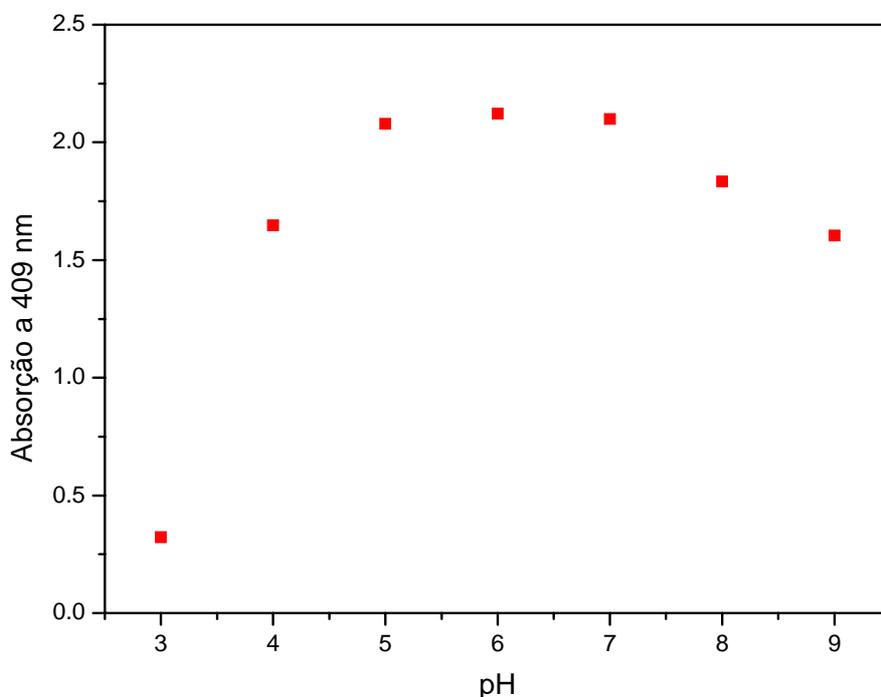


Figura 3. 5: Efeito do pH na absorção da metamioglobina a 409 nm.

Os resultados indicaram que a proteína manteve seu perfil de absorção para pH de 5 a 7, indicando que esta é a faixa ótima para o trabalho e, portanto, a utilização do tampão acetato pH 5,7 para os testes com os co-solventes orgânicos não é deletéria à estrutura da biomolécula.

3.4.2. Efeito dos solventes orgânicos na estrutura da metamioglobina

Esta seção foi dividida em três partes. Na primeira, a solubilidade da metamioglobina nos solventes orgânicos e nas soluções do co-solvente orgânico foi avaliada visualmente. Em seguida, a espectrofotometria no visível foi utilizada para inferir sobre a manutenção da estrutura nativa da proteína nestes solventes ou na mistura de solventes. Para os sistemas com resultado positivo, ou seja, em que os picos em 409 e 630 nm foram mantidos, realizou-se a análise de dicroísmo circular, visando

caracterizar a estrutura secundária da biomolécula, quantificando os teores de α -hélices e folhas- β .

3.4.2.1. Análise preliminar

As observações sobre o aspecto visual das soluções de metamioglobina nos diversos solventes orgânicos e nas soluções do co-solvente orgânico em água são apresentadas na Tabela 3. 4.

Tabela 3. 4: Solubilidade da mioglobina em diversos sistemas orgânicos na temperatura ambiente (25°C). As siglas utilizadas são explicadas em nota após a tabela.

Solvente	Concentração			
	100%	96%	50%	C50
Metanol	SP	Turva	Turva	Turva
Etanol	I	Turva	SP	S
Isopropanol	I	Turva	S	S
N-Butanol	I	I	Turva (ptn na interface)	S
Isobutanol	I	I	Turva (ptn na interface)	S
Sec-Butanol	I	I	Turva	S
Etileno glicol	S	S	S	S
Glicerol	SP	S	S	S
Formamida	S	S	S	S
N, N - Dimetilformamida	I	Turva	Turva	Turva (ppt vermelho)
Acetona	I	Turva	Turva	S
DMSO	S	S	S	S
1, 4 - Dioxano	I	Turva	I	Esverdeado
Tetraidrofurano	I	Turva	S	Esverdeado
N-Metilpirrolidona	I	Amarelado	I	-
Hexano	I	I	-	-
Clorofórmio	I	I	-	-
Acetato de etila	I	I	-	-
Tolueno	I	I	-	-

S: solúvel; SP: solubilidade parcial; I: insolúvel; ppt: precipitado; ptn: proteína; (-) não investigado.

Considerando os solventes puros, a proteína se dissolveu apenas em metanol, glicerol, etileno glicol, formamida e DMSO. De um modo geral, a adição de água favorece a solubilidade, embora a observação da turbidez da solução indique a separação de fases,

com formação de um sistema heterogêneo. Nestes sistemas, a mioglobina foi deslocada para a interface. Já para a concentração correspondente a C_{50} , observa-se que a mioglobina é solúvel em quase todas as misturas do co-solvente orgânico.

Vale destacar que em glicerol, a solubilidade foi melhorada com a adição de pequenas quantidades de água (4% em volume), provavelmente porque as moléculas desta última devem se localizar preferencialmente na superfície da mioglobina. Para os isômeros do butanol na concentração de 50% em volume, houve separação de fases devido à adição da mioglobina. Em dioxano e tetraidrofurano, THF, solventes polares, na concentração de C_{50} , a cor da solução passou de marrom para verde, indicando competição pela água de hidratação da proteína, que levou à desnaturação.

Em N-metilpirrolidona, NMP, um solvente muito utilizado no preparo de membranas, a mioglobina mostrou-se insolúvel. Porém, para o sistema contendo 96% de NMP em volume, a solução adquiriu aspecto amarelado, indicando que houve perda da conformação nativa, como resultado da reação entre a proteína e a mistura de solventes. Como a mistura do NMP em água é exotérmica, novos ensaios foram realizados adicionando a biomolécula à mistura de solventes na temperatura ambiente. O resultado, porém, foi semelhante ao obtido anteriormente, indicando que o NMP não deve ser usado como solvente para a mioglobina, já que causa sua desnaturação.

As tentativas de solubilizar a mioglobina equina em solventes como hexano, clorofórmio, acetato de etila e tolueno não foram bem sucedidas, mostrando a interação entre os mesmos e a biomolécula é desfavorecida.

3.4.2.2. Transições conformacionais

Visando facilitar a apresentação dos resultados e a correlação entre eles, os espectros no visível foram agrupados de acordo com a semelhança estrutural dos solventes orgânicos. A absorção de luz das amostras na região do visível foi utilizada como parâmetro para inferir sobre as transições conformacionais sofridas pela proteína. A mistura de solventes sem a mioglobina foi utilizada como referência antes da leitura de cada amostra.

Os perfis de absorção da metamioglobina em metanol são apresentados na Figura 3. 6. A proteína apresentou solubilidade em metanol puro, enquanto a adição de água ao sistema provocou separação de fases, conforme observado pelo deslocamento da linha de base tanto para 96% quanto para 50% em volume do álcool, que corresponde também a C₅₀. Observou-se a redução do comprimento de onda em que houve absorção máxima na região do Soret, indício de que houve alteração no sítio ativo da mioglobina.

O alongamento do pico em C₅₀ deve ser avaliado com cautela, uma vez que pode indicar uma maior exposição do grupo prostético, como resultado de mudanças na conformação nativa da proteína (MATTOS e RINGE, 2001), e não um aumento de solubilidade. Estas conformações intermediárias podem expor mais os grupos responsáveis pela absorção de luz, tornando a proteína mais propensa à desnaturação. Estudos mais detalhados avaliando o efeito desta mudança estrutural no transporte de oxigênio seriam necessários para indicar se houve comprometimento da função fisiológica da mioglobina.

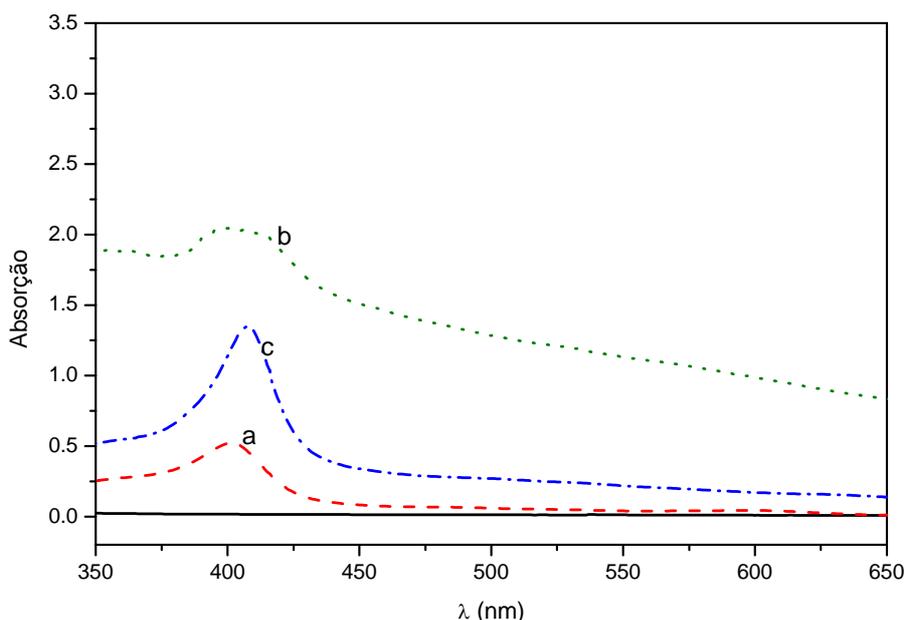


Figura 3. 6: Espectros de absorção no visível da metamioglobina em soluções de metanol. Teor de metanol: a) 100%, b) 96% v/v; c) 50% v/v.

Considerando o etanol, os melhores resultados foram observados para as concentrações de 50 e 31% em volume do álcool, conforme apresentado na Figura 3. 7, uma vez que a mioglobina não apresentou solubilidade álcool puro e que houve separação de fases com 96% do solvente orgânico. Ainda assim, a mudança no formato do pico do Soret em

50% do álcool e o aumento de absorção para a amostra correspondente a C_{50} indicaram alterações significativas na estrutura da proteína nestas misturas de solventes.

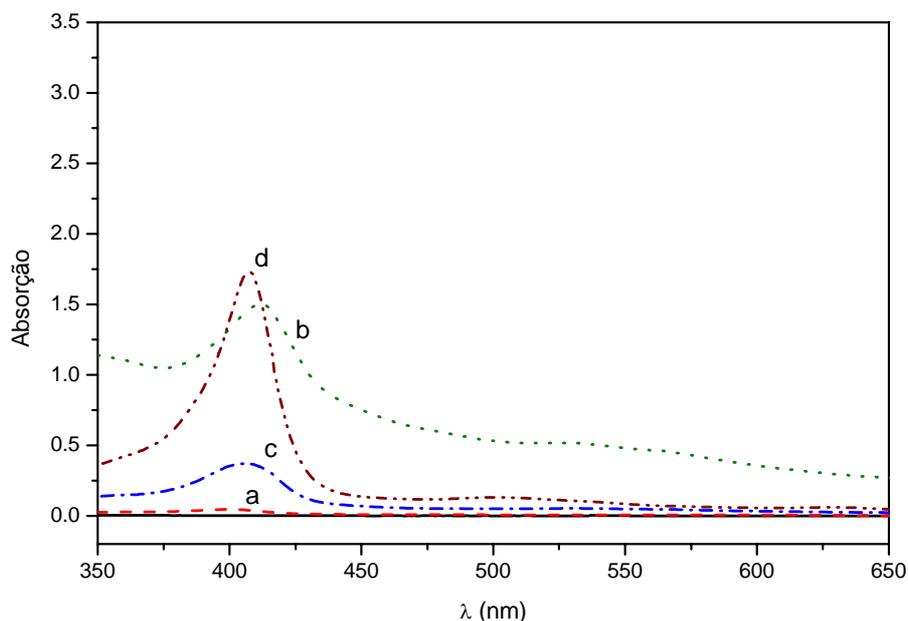


Figura 3. 7: Espectros de absorção no visível da metamioglobina em soluções de etanol. Teor de etanol: a) 100%, b) 96% v/v; c) 50% v/v, d) 31% v/v.

A dissolução da mioglobina em isopropanol revelou o mesmo comportamento observado para o etanol, conforme visualizado na Figura 3. 8, exceto pelo alongamento do pico do Soret para 26% em volume do álcool. Os valores de C_{50} para etanol e isopropanol são próximos, iguais a 31 e 26% em volume do álcool, respectivamente, o que comprova a semelhança entre o tipo de interação destes álcoois com a mioglobina.

Em relação aos isômeros do butanol, ou seja, sec-butanol, apresentado na Figura 3. 9, n-butanol, na Figura 3. 10, e isobutanol, na Figura 3. 11, observa-se solubilidade da mioglobina apenas para soluções mais diluídas do álcool, ou seja, em 50% em volume e em C_{50} . A turbidez das soluções é reduzida do sec-butanol ao isobutanol, já que a separação mais nítida entre as fases permitiu a análise da fase aquosa saturada nos álcoois primários. Esta separação de fases pode ser proveniente da redução da solubilidade em água com o aumento do número de carbonos do álcool e/ou da agregação das cadeias da biomolécula não conformada, como resultado da ação deletéria do álcool na estrutura nativa da proteína.

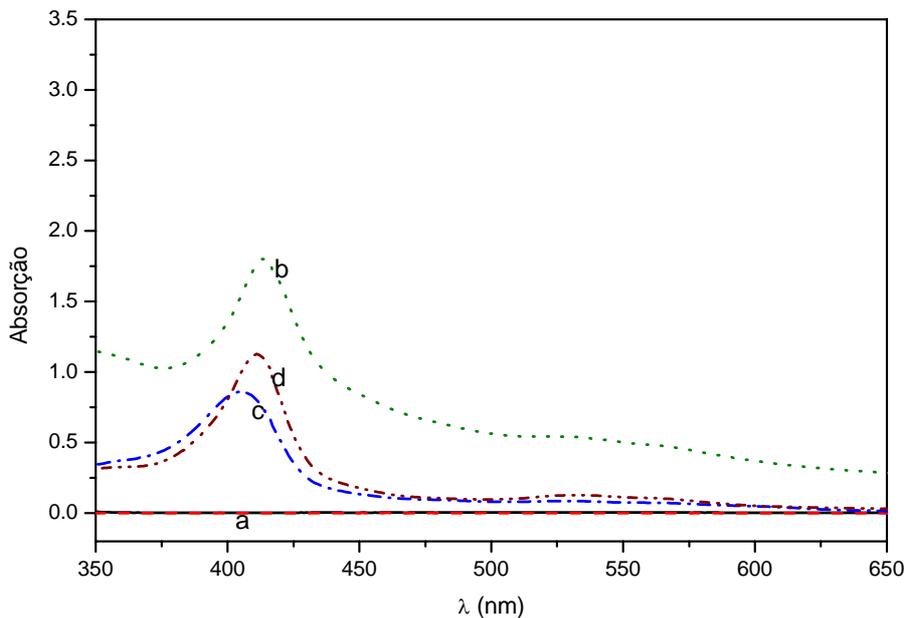


Figura 3. 8: Espectros de absorção no visível para a metamioglobina em isopropanol. Teor de isopropanol: a) 100%, b) 96% v/v; c) 50% v/v, d) 26% v/v.

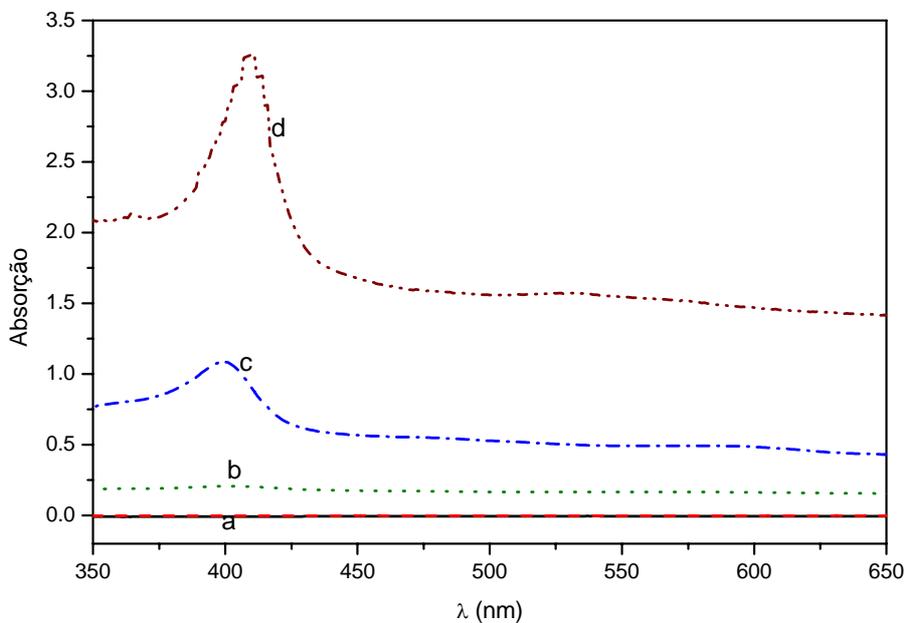


Figura 3. 9: Espectros de absorção no visível da metamioglobina em sec-butanol. Teor de sec-butanol: a) 100%, b) 96% v/v; c) 50% v/v, d) 20% v/v.

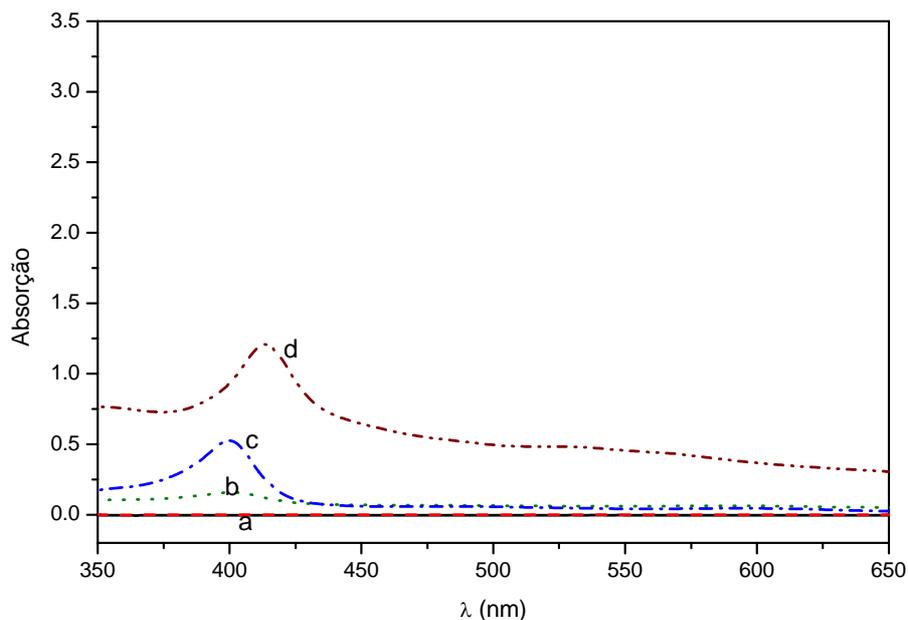


Figura 3. 10: Espectros de absorção no visível da metamioglobina em n-butanol. Teor de n-butanol: a) 100%, b) 96% v/v; c) 50% v/v, d) 8% v/v.

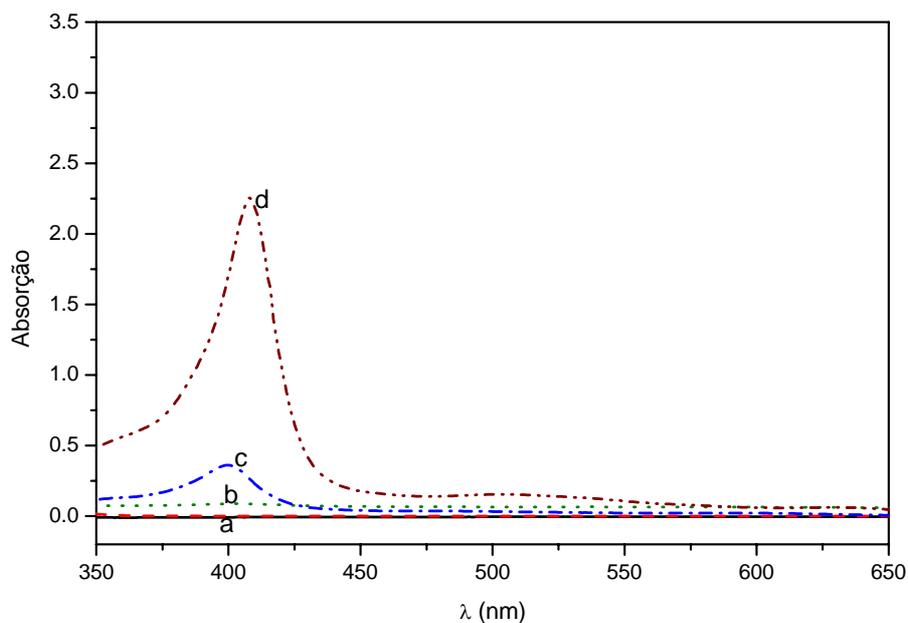


Figura 3. 11: Espectros de absorção no visível para a metamioglobina em isobutanol. Teor de isobutanol: a) 100%, b) 96% v/v; c) 50% v/v, d) 7% v/v.

Outro fato que merece destaque é o pequeno valor de C_{50} do n-butanol e do isobutanol, 8 e 7% em volume, respectivamente, indicando elevado poder desnaturante destas substâncias. Analogamente ao comportamento da mioglobina em etanol e isopropanol, as mudanças na forma do pico do Soret e o alongamento dos picos em C_{50} constituem um indício de mudanças conformacionais da proteína nestes álcoois.

Analisando os resultados obtidos, observou-se que o aumento no teor hidrocarbônico e a diminuição na ramificação da cadeia aumentam a efetividade dos álcoois na alteração da estrutura da proteína, conforme observado por *HERSKOVITS et al. (1970)*. Para todos os sistemas investigados, a concentração limite do álcool que promove a desnaturação de 50% da mioglobina é muito baixa – o maior valor foi de 50% em volume para o metanol – para que a solução do co-solvente orgânico seja usada para dissolver polímeros hidrofóbicos. Entretanto, embora a solubilidade da mioglobina em metanol puro seja reduzida, a manutenção do perfil de absorção indica o potencial uso deste solvente na síntese das membranas de transporte facilitado. A investigação da atividade biológica da proteína complementaria este estudo conformacional.

Os espectros da metamioglobina em etileno glicol indicaram solubilidade da proteína em toda a faixa investigada, de 100 a 50% do glicol, conforme visualizado na Figura 3. 12. Os perfis de absorção da proteína nativa foram mantidos até mesmo para o etileno glicol puro.

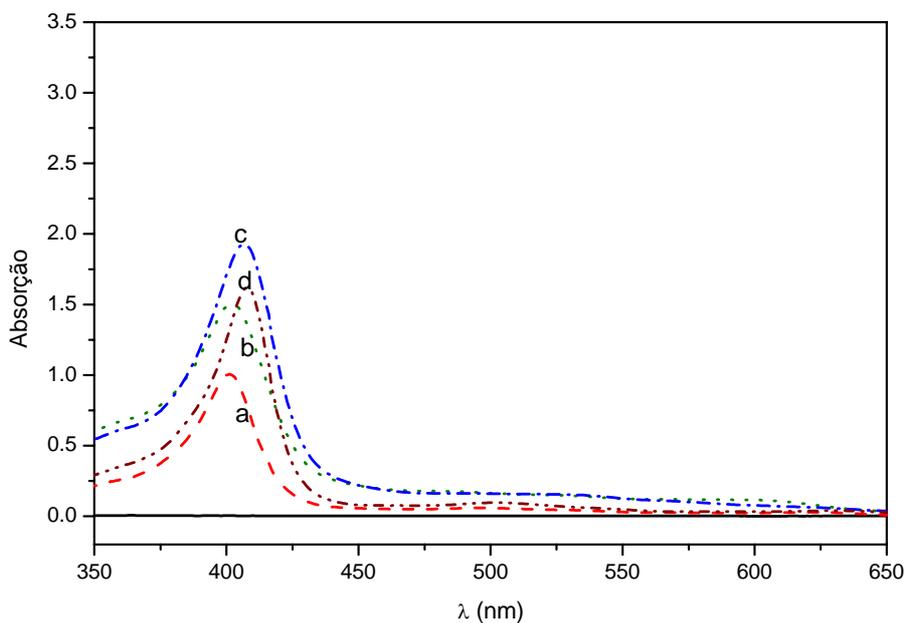


Figura 3. 12: Espectros de absorção no visível da metamioglobina em etileno glicol. Teor de etileno glicol: a) 100%, b) 96% v/v; c) 80% v/v, d) 50% v/v.

No caso do glicerol, substância mais viscosa, observou-se menor solubilidade da proteína, mas a adição de 4% em volume de água aumenta a absorção do Soret em cerca de quatro vezes, conforme apresentado na Figura 3. 13. Estes resultados revelam que o

tipo de interação entre a mioglobina e os glicóis investigados mantém a conformação nativa da proteína, o que pode viabilizar a síntese de membranas contendo este biotransportador, uma vez que estes solventes são utilizados como plastificantes de polímeros.

Comparando-se os glicóis com os álcoois, parece evidente que a adição de mais grupos hidroxila é bastante favorável à manutenção da conformação da proteína. Isso pode ser explicado considerando as inúmeras ligações de hidrogênio que a mioglobina estabelece com a água para promover sua solubilização. Como os resultados dos espectros da mioglobina dissolvida em glicóis foram positivos, estes sistemas foram analisados em relação ao dicroísmo circular e serão apresentados na próxima seção.

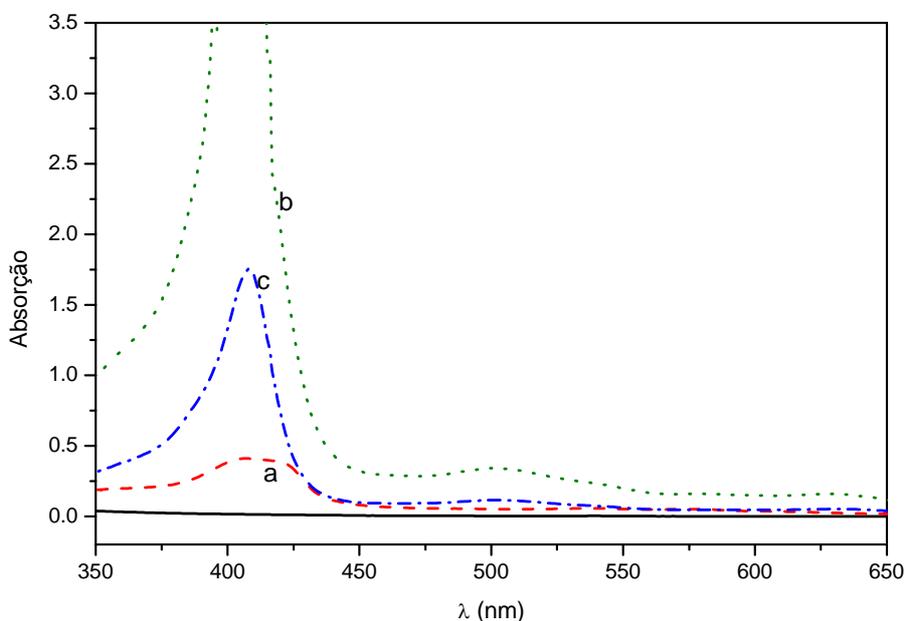


Figura 3. 13: Espectros de absorção no visível da metamioglobina em glicerol. Teor de glicerol: a) 100%, b) 96% v/v; c) 50% v/v.

A dissolução da mioglobina em formamida foi observada em toda a faixa investigada, ou seja, de 100 a 37% em volume do solvente orgânico, conforme apresentado na Figura 3. 14. O fato de a proteína apresentar boa solubilidade neste solvente puro pode ser atribuído aos grupos amida presentes em ambos.

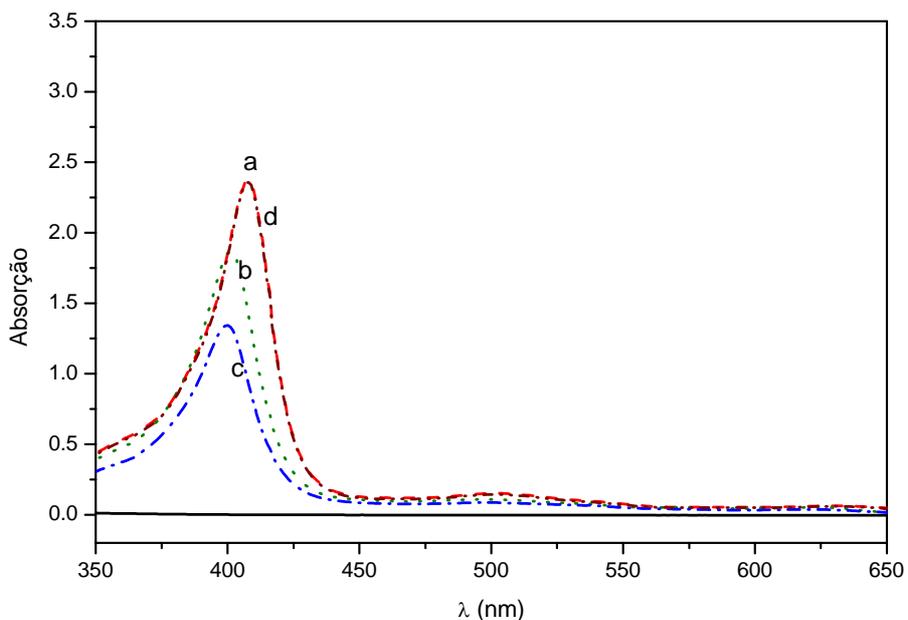


Figura 3. 14: Espectros de absorção no visível da metamioglobina em formamida. Teor de formamida: a) 100%, b) 96% v/v; c) 50% v/v, d) 37% v/v.

Já em N, N-dimetilformamida, DMF, Figura 3. 15, os espectros mostraram a insolubilidade da proteína e a separação de fases da solução com a adição de água ao sistema. Portanto, a substituição de hidrogênio por grupos alquila no nitrogênio das amidas aumenta a efetividade destas na alteração da conformação nativa da mioglobina.

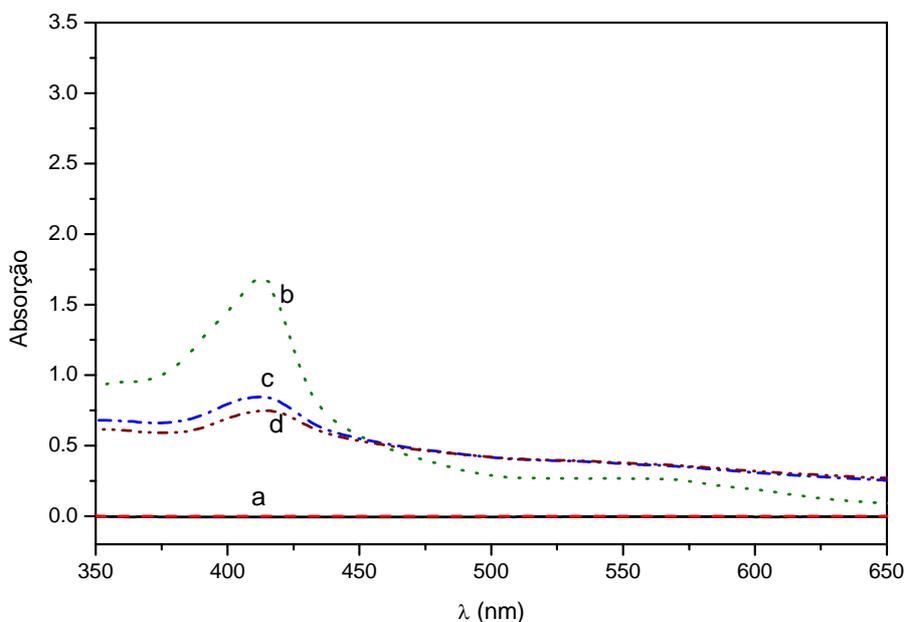


Figura 3. 15: Espectros de absorção no visível da metamioglobina em N, N-dimetilformamida. Teor de DMF: a) 100%, b) 96% v/v; c) 60% v/v, d) 50% v/v.

Na Figura 3. 16, apresentam-se os espectros da mioglobina em soluções contendo acetona. Os melhores resultados foram obtidos para a mistura contendo 16% em volume do co-solvente orgânico. Concentrações maiores provocam a turbidez do sistema até a insolubilização completa, observada em acetona pura. Provavelmente esta turbidez deve-se à perda da conformação nativa da proteína e aglomeração das cadeias devido à remoção da água da camada de hidratação.

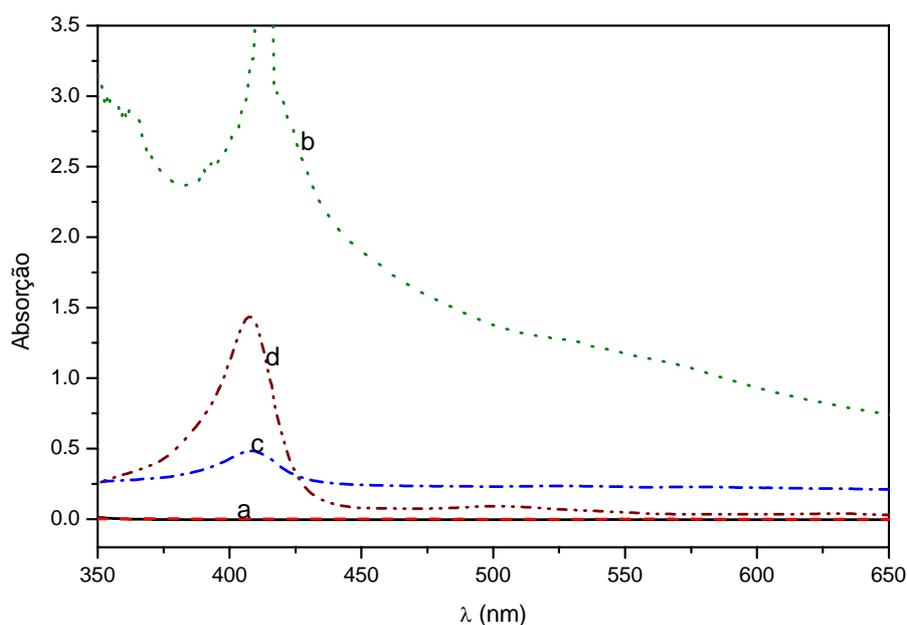


Figura 3. 16: Espectros de absorção no visível da metamioglobina em acetona. Teor de acetona: a) 100%, b) 96% v/v; c) 50% v/v, d) 16% v/v.

Os espectros no visível para a solução de metamioglobina em DMSO são apresentados na Figura 3. 17. Observou-se a manutenção do perfil característico da proteína nativa em toda a faixa investigada, de 100 a 46% do co-solvente orgânico, indicando que o DMSO é capaz de dissolver a proteína. Testes de dicroísmo circular foram realizados para quantificar o teor de α -hélices e folhas- β da proteína neste solvente.

Os perfis de absorção da mioglobina em soluções de dioxano são apresentados na Figura 3. 18. A proteína mostrou-se insolúvel no solvente puro, porém a adição de água parece promover reações que levam à mudança de cor da solução. Comportamento semelhante foi observado para o tetraidrofurano, THF, conforme ilustrado na Figura 3. 19. Embora a água favoreça a solubilidade da proteína, a mudança de cor e a turbidez da solução

indicaram alterações conformacionais significativas da proteína. Desta forma, observou-se que os éteres cíclicos polares promovem a perda da estrutura nativa da mioglobina. Considerando a polaridade destes solventes, provavelmente o mecanismo de desnaturação deve envolver a competição pela água da camada de hidratação da proteína.

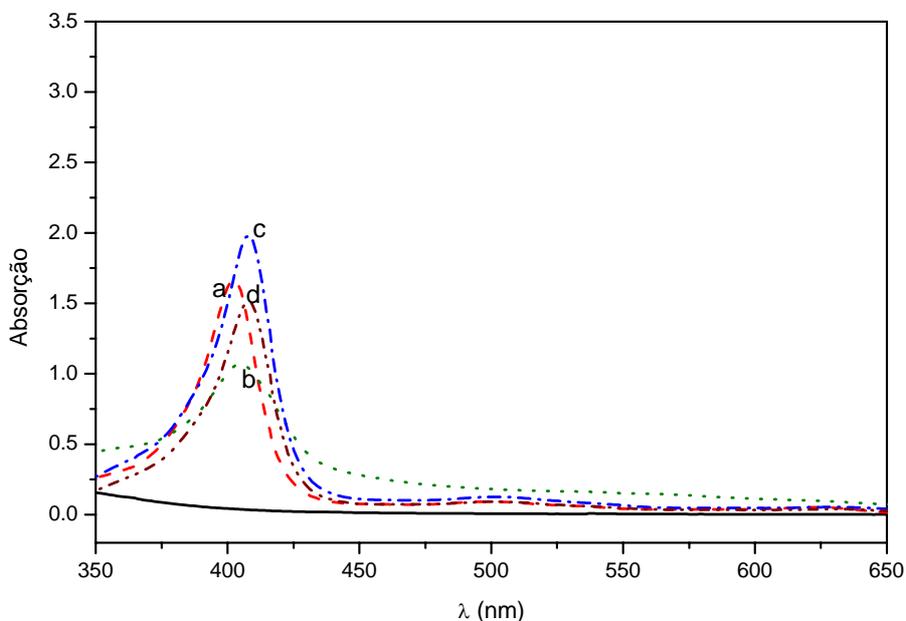


Figura 3. 17: Espectros de absorção no visível da metamioglobina em DMSO. Teor de DMSO: a) 100%, b) 96% v/v; c) 46% v/v, d) 50% v/v.

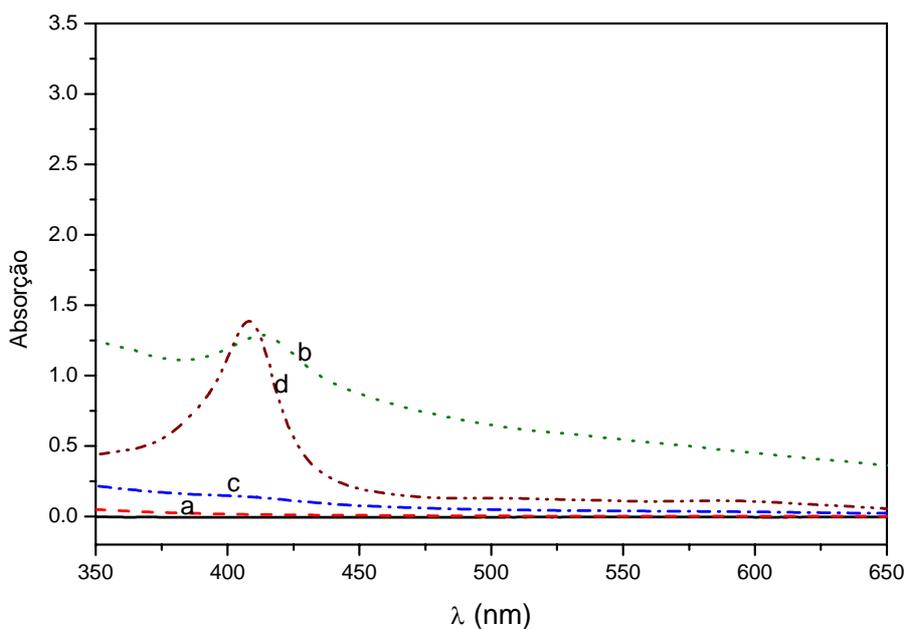


Figura 3. 18: Espectros de absorção no visível da metamioglobina em dioxano. Teor de dioxano: a) 100%, b) 96% v/v; c) 50% v/v, d) 21% v/v.

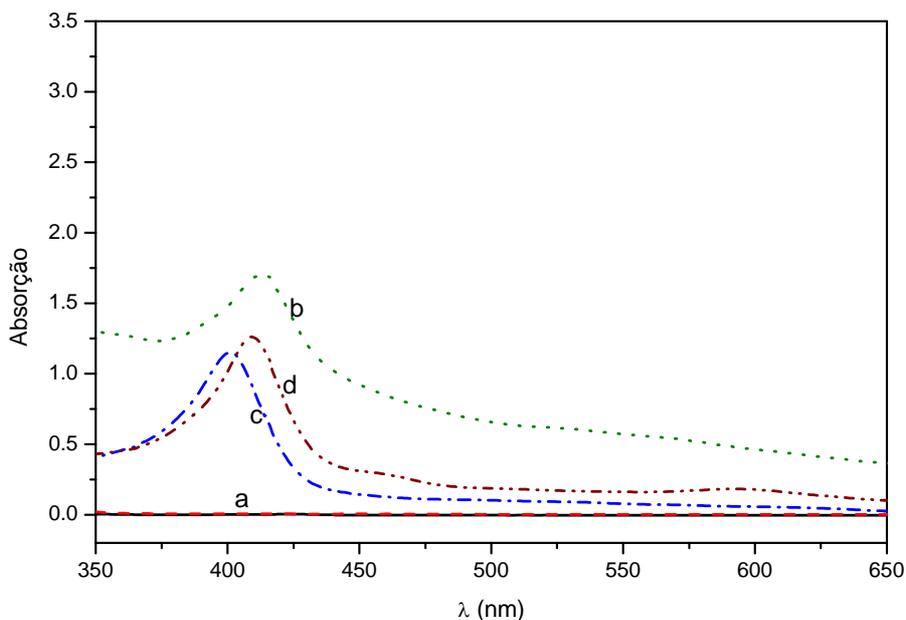


Figura 3. 19: Espectros de absorção no visível da metamioglobina em THF. Teor de THF: a) 100%, b) 96% v/v; c) 50% v/v, d) 11% v/v.

De um modo geral, a análise dos resultados de espectroscopia no visível indica que os solventes polares próticos foram mais eficientes na manutenção da estrutura nativa da proteína que os apróticos, já que os primeiros parecem capazes de estabelecer o mesmo tipo de interação existente entre a proteína e a água. Dentre os solventes polares próticos, quanto menor sua polaridade, maior será a capacidade de alterar a estrutura nativa da proteína (FIGUEIREDO *et al.*, 2005).

Os resultados de espectroscopia das soluções de mioglobina em solventes orgânicos e em soluções do co-solvente orgânico foram utilizados para selecionar os sistemas a serem submetidos à análise de dicroísmo circular, apresentada na próxima seção.

3.4.2.3. A estrutura secundária da mioglobina em meio orgânico

A espectroscopia de dicroísmo circular baseia-se na interação de substâncias opticamente ativas com a luz polarizada no sentido horário ou anti-horário e constitui uma ferramenta para inferir a respeito da estrutura secundária de proteínas. De acordo com as diferenças de absorção, é possível identificar a fração da molécula correspondente às α -hélices e folhas- β . Como a seqüência de aminoácidos restringe a estrutura secundária das proteínas, esta técnica é bastante utilizada para avaliar as

mudanças conformacionais resultantes da exposição da biomolécula a certas misturas de solventes (GLANDIERES *et al.*, 1995).

A estrutura secundária da mioglobina foi investigada para os sistemas que apresentaram melhor desempenho na análise de espectroscopia no visível, ou seja, foram selecionadas as condições em que a concentração do co-solvente orgânico fosse igual ou superior a 50% em volume com espectro de absorção no visível intacto em relação à proteína nativa. A mistura de solventes foi utilizada como referência para todas as amostras analisadas. O perfil de absorção da metamioglobina equina em tampão acetato pH 5,7 foi determinado a fim de evidenciar o efeito da adição do solvente orgânico na conformação da proteína. As condições utilizadas nos testes foram as mesmas relatadas para o estudo de espectroscopia no visível, ou seja, foi utilizada a metamioglobina dissolvida em misturas de tampão acetato pH 5,7 com co-solventes orgânicos, na concentração de 11 $\mu\text{mol/L}$.

Para os solventes orgânicos em que a metamioglobina foi solúvel, como formamida e DMSO, a análise de CD indicou alteração completa da estrutura secundária da proteína. Não foi possível distinguir nenhuma fração contendo α -hélices, por exemplo. Uma possível explicação para a diferença de comportamento observada entre as duas técnicas espectrofotométricas consiste na diferença entre o tempo de contato do solvente com a biomolécula e o início da análise. Os espectros no visível foram determinados em até 10 minutos após a mistura, enquanto o CD foi realizado 15 horas depois, tempo suficiente para permitir os rearranjos moleculares da proteína, em função da exposição aos solventes orgânicos.

As curvas de CD obtidas para a mioglobina em soluções aquosas de etileno glicol são apresentadas na Figura 3. 20. Foram adicionados também os espectros da proteína em tampão acetato com o objetivo de comparar os perfis obtidos.

Observou-se que o aumento da concentração do co-solvente provocou alterações sensíveis no perfil de absorção característico das α -hélices. Porém, para a solução mais diluída, ou seja, contendo 50% em volume do glicol, houve uma grande semelhança com o perfil obtido para o tampão acetato.

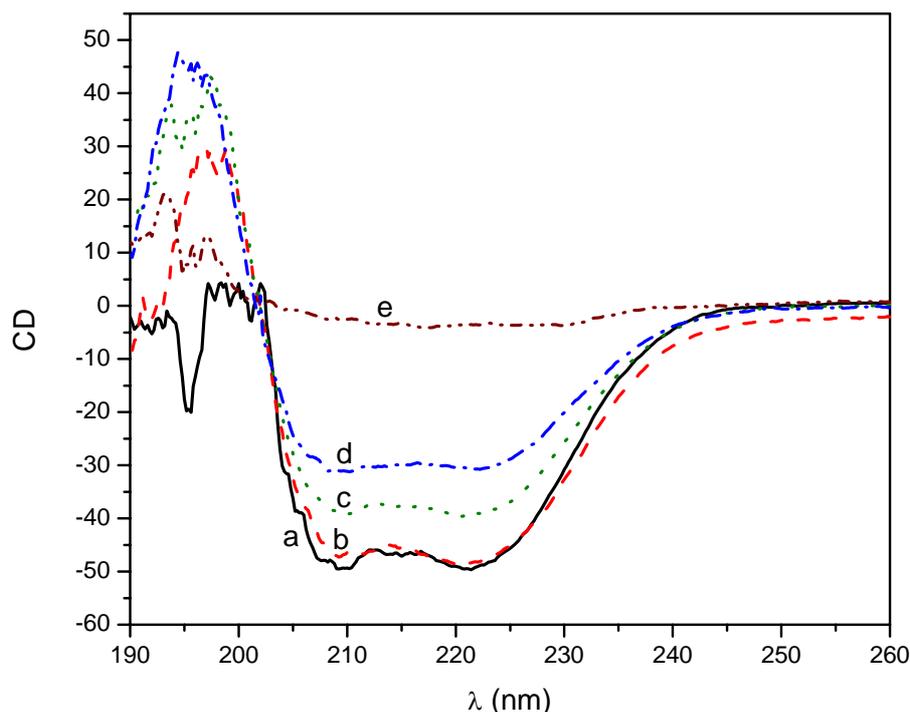


Figura 3. 20: Espectros de dicroísmo circular para soluções de metamioglobina em etileno glicol. Teor de etileno glicol na solução em volume: a) 0% (tampão acetato), b) 50%, c) 80%, d) 96%, e) 100%. pH da fase aquosa = 5,7, T = 25°C, 11 $\mu\text{mol/L}$ de metamb.

Os espectros de dicroísmo circular para a dissolução da mioglobina em soluções contendo glicerol como co-solventes são apresentados na Figura 3. 21, sendo que o perfil para tampão acetato também foi adicionado para comparação. Os resultados obtidos foram análogos aos perfis para o etileno glicol: diminuição do teor helicoidal com o aumento da concentração do co-solvente.

A quantificação dos teores de α -hélices e folhas- β foi realizada calculando-se a elipsidade molar para cada sistema, seguida pela utilização do programa CDPro, rotina CDSSTR (MANAVALAN e JOHNSON JR., 1987), que compara os espectros com um banco de dados contido no algoritmo. Na Tabela 3. 5, apresentam-se as frações de α -hélices e folhas- β da mioglobina equina em função da mistura de solventes utilizada.

O teor helicoidal em tampão acetato foi estimado em 50% da estrutura da molécula. Como a quantificação das estruturas presentes na proteína se baseia na comparação com modelos fornecidos por um banco de dados do algoritmo, o valor absoluto destes teores deve ser avaliado com cautela (KELLY *et al.*, 2005). Porém, em pH 5,7, a carga global da proteína é positiva, o que deve alterar consideravelmente o tipo de interação com o

solvente, causando modificações na estrutura secundária da mioglobina em relação à conformação nativa. Portanto, a ênfase aqui será no aspecto comparativo das estruturas.

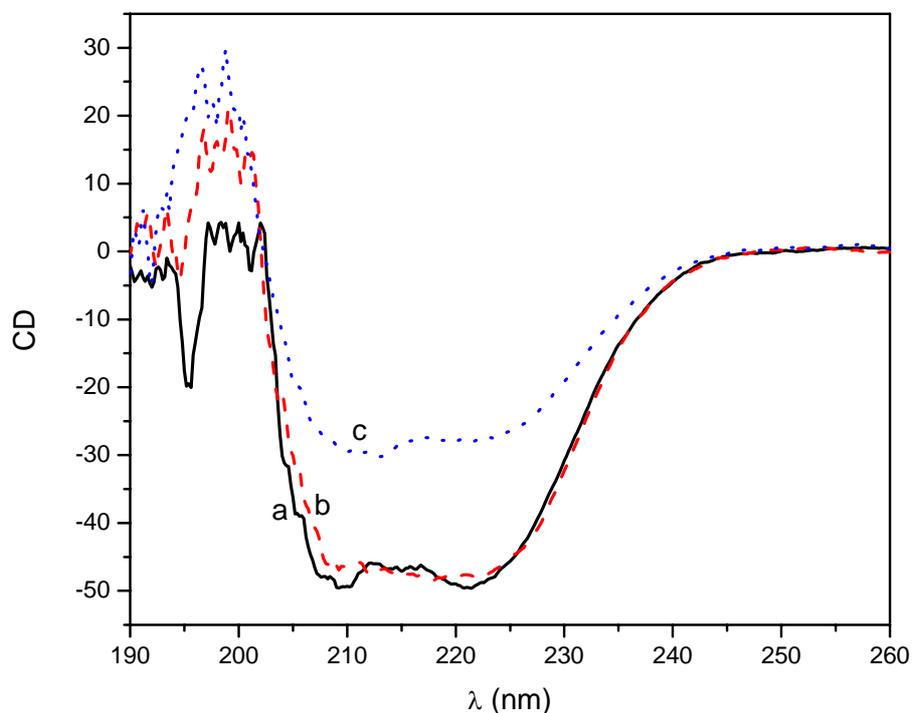


Figura 3. 21: Espectros de dicroísmo circular para soluções de metamioglobina em glicerol. Teor de glicerol na solução em volume: a) 0% (tampão acetato), b) 50%, c) 96%. pH da fase aquosa = 5,7, T = 25°C, 11 μmol/L de metamb.

Tabela 3. 5: Fração de α-hélices e folhas-β estimada para soluções de mioglobina em co-solventes orgânicos, utilizando o programa CD-Pro (SREERAMA e WOODY, 2000).

Solvente	Concentração (% v/v)	α-hélices	Folhas-β
Tampão acetato (pH 5,7)	-	50,2	20,6
Etileno glicol	50	54,8	12,8
	80	47,4	9,9
	96	42,3	12,9
Glicerol	50	50,8	16,6
	96	38,5	13,6

De um modo geral, a adição dos glicóis à solução de mioglobina em tampão acetato provocou uma redução do teor de α-hélices. Porém, para cerca de 50% em volume do co-solvente orgânico, o teor de helicoidal permaneceu praticamente inalterado. Estes resultados estão de acordo com a literatura, já que soluções água/glicerol 1:1 em volume

são utilizadas para armazenamento de proteínas (GLANDIERES *et al.*, 1995). Vale ressaltar, ainda, que apesar de o glicerol promover modificações na estrutura da mioglobina, a determinação da conformação da proteína em glicerol ainda é um assunto controverso (BARTERI *et al.*, 1996). Entretanto, tendo em vista os objetivos deste trabalho, ou seja, a síntese de membranas de transporte facilitado contendo biotransportadores, a constatação de que a proteína mantém grande parte de sua estrutura em soluções água/glicerol e água/etileno glicol é promissora, uma vez que estas substâncias são usadas como plastificantes em filmes de PVA (LIM e WAN, 1994).

3.4.3. Inversão da polaridade da mioglobina com SDS

A mioglobina não apresentou solubilidade em solventes apolares e fracamente polares como tolueno, acetato de etila e hexano. Portanto, o aumento da solubilidade nesse tipo de solvente foi investigado através da técnica de emparelhamento iônico hidrofóbico, pela adição de SDS a soluções da proteína em tampão acetato pH 5,7. Como o pI da proteína é 7,2, em pH 5,7, os grupos ácidos da mioglobina estarão protonados, de forma que carga total será positiva. Espera-se, então, que o surfactante substitua os ânions que atuam como contra-íons dos resíduos básicos existentes na proteína (MATSUURA *et al.*, 1993). No caso da mioglobina, o número de resíduos básicos é igual a 33 e, portanto, esta deve ser a razão estequiométrica da adição de SDS. Desta forma, a razão molar SDS/mioglobina foi variada de 5 a 200. A concentração final de SDS foi mantida abaixo da sua concentração micelar crítica. O efeito da variação da razão molar entre o SDS e a mioglobina foi avaliado por espectroscopia no visível e os resultados são apresentados na Figura 3. 22. Os espectros correspondentes à razão SDS/Mb de 100 e 200 apresentaram deslocamento na linha de base e não foram apresentados na figura.

A absorção na região do Soret foi utilizada como parâmetro de eficiência da alteração da solubilidade da mioglobina. A comparação dos espectros com o perfil da mioglobina em tampão acetato revelou que houve redução na intensidade de absorção. Isso pode ser indício de diminuição na solubilidade da proteína em fase aquosa, como resultado do emparelhamento do dodecil sulfato de sódio nos sítios positivos da proteína, conforme esperado. Para a razão SDS/Mb igual a 10, houve um desvio na linha de base do

espectro, que pode indicar perda da conformação nativa da proteína, com agregação das regiões hidrofóbicas.

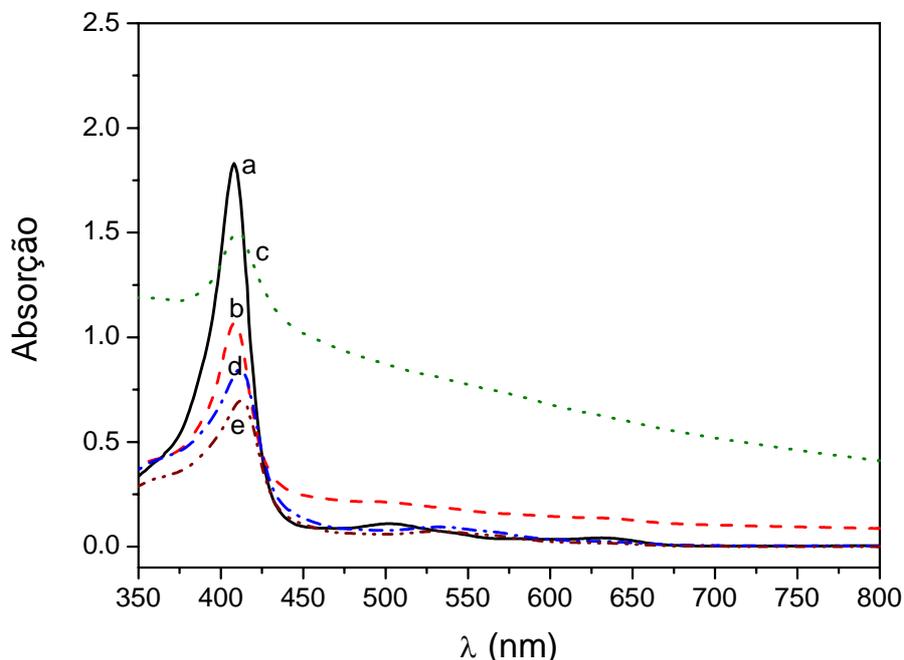


Figura 3. 22: Espectros no UV-visível do complexo SDS/metamioglobina, em diversas proporções. Razão molar SDS/Mb a) 0, b) 5, c) 10, d) 33 e e) 50.

O aumento da solubilidade da mioglobina modificada em fase orgânica foi avaliado a partir da extração da mesma para uma fase apolar, constituída por hexano ou óleo de silicone. Foram selecionados os sistemas com razão molar entre o SDS e a Mb de 5 e de 33. Os espectros no visível das fases orgânicas foram usados para avaliar a mudança na solubilidade da proteína.

Para o óleo de silicone, em ambas as razões SDS/Mb investigadas, houve manutenção da absorção da proteína na região do Soret, mas a turbidez do sistema indicou a possibilidade de alteração conformacional da proteína. No caso da extração para hexano, observou-se a manutenção do espectro para a razão SDS/Mb igual a 5, conforme apresentado na Figura 3. 23. Para SDS/Mb igual a 33, também houve elevada turbidez, evidenciada pelo deslocamento da linha de base do espectro. A análise da figura indica que a proteína foi efetivamente transferida para o hexano, já que houve absorção nos picos característicos da proteína nativa. O espectro da fase aquosa após a extração também apresenta o mesmo perfil de absorção.

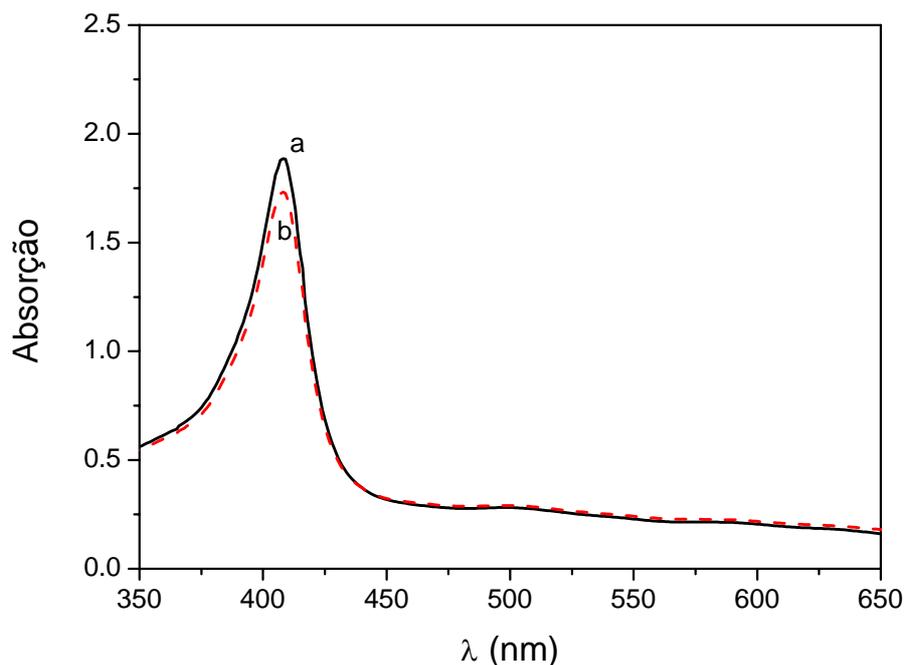


Figura 3. 23: Espectros do UV-visível para a extração da mioglobina modificada por SDS em hexano. a) extrato aquoso, b) extrato orgânico.

Como a inversão da polaridade da proteína foi alcançada para uma razão molar inferior a 33, há indícios de que nem todos os resíduos básicos estavam expostos ao solvente, impedindo o acesso da molécula do surfactante. Os resultados obtidos indicaram o potencial da técnica e a avaliação da estrutura da mioglobina modificada em hexano pode viabilizar novas rotas de síntese de membranas contendo este biotransportador.

3.5. Conclusão

A solubilidade e a conformação da mioglobina em fase orgânica mostraram-se bastante dependentes da função química do solvente, de sua concentração na solução e das propriedades do meio. De um modo geral, os solventes próticos foram capazes de estabelecer o mesmo tipo de interação observada entre a água e a proteína, apresentando desempenho superior aos demais solventes investigados. Em particular, os glicóis mantiveram a estrutura nativa da mioglobina em grande extensão, especialmente na concentração de 50% em volume. Os estudos revelaram que o teor helicoidal foi mantido mesmo após 15 horas de exposição da proteína à mistura. Tendo em vista a utilização de glicerol e etileno glicol como plastificantes de membranas poliméricas, os

resultados obtidos indicam a utilização potencial destes solventes na síntese de membranas poliméricas contendo biotransportadores.

Como alternativa à insolubilidade da mioglobina em meio apolar, a técnica de emparelhamento iônico hidrofóbico foi eficiente em alterar a polaridade da proteína e aumentar sua partição em hexano. A caracterização da atividade da mioglobina neste meio pode viabilizar a imobilização desta em polímeros apolares.

3.6. Referências bibliográficas

- BABU, K. R., DOUGLAS, D. J., 2000, "Methanol-induced conformations of myoglobin at pH 4.0", *Biochemistry*, v. 39, n. 47 (Nov), pp. 14702-14710.
- BARTERI, M., GAUDIANO, M. C., SANTUCCI, R., 1996, "Influence of glycerol on the structure and stability of ferric horse heart myoglobin: a SAXS and circular dichroism study", *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1295, n. 1 (Jun), pp. 51-58.
- BRADFORD, M. M., 1976, "A rapid and sensitive method for the qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, pp. 248-254.
- BUROVA, T. V., GRINBERG, N. V., GRINBERG, V. Y., *et al.*, 2000, "Calorimetric evidence for a native-like conformation of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol", *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1478, n. 2 (May), pp. 309-317.
- FERRAZ, H. C., 2003, *Membranas de transporte facilitado para separação de oxigênio utilizando biotransportadores*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FIGUEIREDO, K. C. S., FERRAZ, H. C., ALVES, T. L. M., *et al.*, 2005, "Influência de solventes orgânicos na estrutura da mioglobina equina". In: Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, pp. 1-7, Recife, Agosto.
- GLANDIERES, J. M., CALMETTES, P., MARTEL, P., *et al.*, 1995, "Solvent-induced structural distortions of horse metmyoglobin", *European Journal of Biochemistry*, v. 227, n. 1-2 (Jan), pp. 241-248.
- GRIEBENOW, K., KLIBANOV, A. M., 1996, "On Protein Denaturation in Aqueous-Organic Mixtures but Not in Pure Organic Solvents", *Journal of the American Chemical Society*, v. 118, n. 47 (Nov), pp. 11695-11700.
- GUO, Y. Z., CLARK, D. S., 2001, "Activation of enzymes for nonaqueous biocatalysis by denaturing concentrations of urea", *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1546, v. 2 (Apr), pp. 406-411.
- HERSKOVITS, T., GADEGBEKEU, B., JAILLET, H., 1970, "On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols", *The Journal of Biological Chemistry*, v. 245, n. 10 (May), pp. 2588-2598.
- JACKSON, M., MANTSCH, H. H., 1991, "Beware of proteins in DMSO", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1078, n. 2 (Jun), pp. 231-235.
- KAIM, W., SCHWEDERSKY, B., 1994, *Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life – An introduction and guide*. New York, John Wiley & Sons Ltd.

- KELLY, S. M., JESS, T. J., PRICE, N. C., 2005, “How to study proteins by circular dichroism”, *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, v. 1751, n. 2 (Aug), pp.119-139
- KHMELNITSKY, Y. L., MOZHAEV, V. V., BELOVA, A. B., *et al.*, 1991, “Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis”, *European Journal of Biochemistry*, v. 198, n. 1 (May), pp. 31-41.
- KLIBANOV, A. M., 2001, “Improving enzymes by using them in organic solvents”, *Nature*, v. 409, n. 6817 (Jan), pp. 241-246.
- KONY, D. B., HUNENBERGER, P. H., VAN GUNSTEREN, W. F., 2007, “Molecular dynamics simulations of the native and partially folded states of ubiquitin: Influence of methanol cosolvent, pH, and temperature on the protein structure and dynamics”, *Protein Science*, v. 16, n. 6 (Jun), pp. 1101-1118.
- LI, Q. C. & MABROUK, P. A., 2003, “Spectroscopic and electrochemistry studies of horse myoglobin in dimethyl sulfoxide”, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 8, n. 1-2 (Jan), pp. 83-94.
- LIM, L. Y., WAN, S. C., 1994, “The effect of plasticizers on the properties of polyvinyl alcohol films”, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 20, n. 6, pp. 1007-1020.
- MANAVALAN, P., JOHNSON JR., W.C., 1987, “Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra”, *Analytical Biochemistry*, v. 167, n. 1 (Nov), pp. 76–85.
- MATSUURA, J., POWERS, M. E., MANNING, M. C., *et al.*, 1993, “Structure and stability of insulin dissolved in 1-octanol”, *Journal of the American Chemical Society*, v. 115, n. 4 (Feb), pp.1261-1264.
- MATTOS, C., RINGE, D., 2001, “Proteins in organic solvents”, *Current Opinion in Structural Biology*, v. 11, n. 6 (Dec), pp. 761-764.
- MEYER, J. D., MANNING, M. C., 1998, “Hydrophobic ion pairing: altering the solubility properties of biomolecules”, *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 2 (Feb), pp. 188-193.
- NIEDERHOFFER, E. C., TIMMONS, J. H., MARTELL, A. E., 1984, “Thermodynamics of oxygen binding in natural and synthetic dioxygen complexes”, *Chemical Reviews*, v. 84, n. 2, pp. 137-203.
- ROSELL, C. M., VAIDYA, A. M., HALLING, P. J., 1995, “Prediction of denaturing tendency of organic solvents in mixtures with water by measurement of naphthalene solubility”, *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1252, n. 1 (Sep), pp. 158-164.
- SHIKAMA, K., 2006, “Nature of FeO₂ bonding in myoglobin and hemoglobin: a new molecular paradigm”, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 91, n. 1-2 (May), pp. 83-162.
- SREERAMA, N., WOODY, R. W., 2000, “Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set”, *Analytical Biochemistry*, v. 287, n. 2 (Dec), pp. 252-260.
- STRYER, L., 1999, *Biochemistry*. 4 ed. New York, W. H. Freeman and Company.
- SUGAWARA, Y., MATSUOKA, A., KAINO, A., *et al.*, 1995, “Role of globin moiety in the autoxidation reaction of oxymyoglobin – effect of 8 M urea”, *Biophysical Journal*, v. 69, n. 2 (Aug), pp. 582-592.
- VOET, D., VOET, J. G., PRATT, C. W., 2000, *Fundamentos de Bioquímica*. 4 ed. Brasil, Artmed Editora.

Capítulo 4:

Membranas compostas de alginato de sódio contendo mioglobina

Nesta etapa do trabalho, que teve sua maior parte desenvolvida durante o estágio de doutorado na Universidade de Twente, Holanda, membranas compostas foram preparadas pela deposição de uma camada de alginato de sódio sobre uma membrana de acetato de celulose de ultrafiltração. O objetivo da investigação desta morfologia foi avaliar a possibilidade de estabilização da mioglobina na matriz sólida e o aumento da resistência mecânica dos filmes deste polissacarídeo. As principais variáveis investigadas foram a razão mássica entre o alginato e a mioglobina, bem como a reticulação iônica do biopolímero. Testes de caracterização compreenderam a espectroscopia no visível, o inchamento em água, além da permeação de gases. Os resultados com as membranas integrais indicaram que o alginato de sódio é capaz de manter a mioglobina em sua forma ativa durante mais de 60 dias.

4.1. Introdução

A escolha do alginato de sódio como matriz polimérica para a imobilização da mioglobina visando o desenvolvimento de membranas de transporte facilitado de oxigênio foi baseada nas características de biocompatibilidade, não toxicidade e hidrofiliabilidade deste polissacarídeo extraído de algas marrons (DRAGET *et al.*, 2005). Estas propriedades, aliadas a uma suscetibilidade à reticulação por íons como o cálcio, vêm garantindo ao alginato uma posição de destaque na pesquisa científica (GEORGE e ABRAHAM, 2006). As aplicações potenciais são bastante vastas, englobando o uso como membranas de pervaporação para desidratação de solventes orgânicos (SHI *et al.*, 1998 e 1996, YEOM e LEE, 1998a e 1998b), matriz para imobilização de amins visando o transporte facilitado de CO₂ (KIM *et al.*, 2004), adsorvente de metais no pré-tratamento de efluentes (FATIN-ROUGE *et al.*, 2006) e contaminante modelo em estudos de micro, ultrafiltração e osmose inversa de águas naturais (JERMANN *et al.*, 2007, LEE *et al.*, 2006, YE *et al.*, 2005). Merece destaque também o grande volume de artigos científicos publicados recentemente visando a síntese de nanopartículas de alginato para o encapsulamento de proteínas, fármacos e outras substâncias

biologicamente ativas, o que reflete o potencial deste polímero em aplicações biotecnológicas industriais (SILVA *et al.*, 2005, DE e ROBINSON, 2003, FUNDUEANU *et al.*, 1999).

Em relação à estrutura química, o alginato é um copolímero aniônico resultante da ligação nas posições 1 e 4 dos ácidos β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G). A ligação cooperativa dos meros G com íons forma uma estrutura denominada “caixa de ovo” (GRANT *et al.*, 1973), conforme apresentada na Figura 4. 1. A seletividade da ligação entre os blocos constituídos pelo resíduo G com os íons cálcio é atribuída ao tamanho deste cátion, que se encaixa perfeitamente nos interstícios da estrutura em formato de diamante. Como resultado deste processo de reticulação em condições amenas, o encapsulamento de biomoléculas e células na rede tridimensional formada torna-se possível, sem perda da atividade biológica. Além disso, o controle da densidade de reticulação pode permitir o ajuste do inchamento destes sistemas em água.

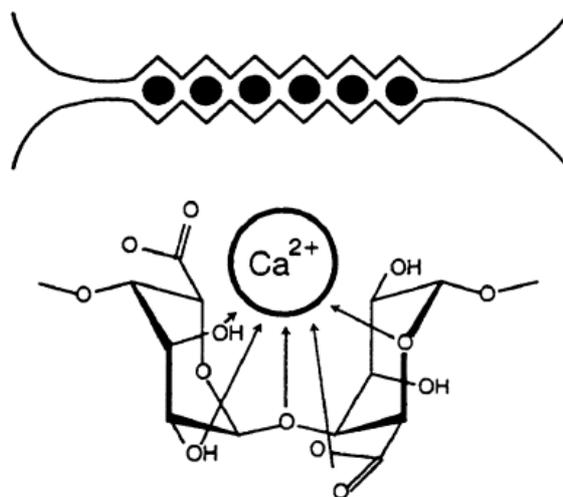


Figura 4. 1: Esquema ilustrativo da morfologia da sequência de resíduos G com ligação cooperativa com íons cálcio, modelo conhecido como caixa de ovo. No detalhe, os possíveis sítios de ligação do polissacarídeo com o cátion (DRAGET *et al.*, 2005).

De um modo geral, a síntese de membranas densas de alginato para utilização em testes de pervaporação é realizada através da utilização de membranas integrais (YEOM e LEE, 1998b) ou membranas compostas produzidas através do espalhamento da solução de alginato na superfície de um suporte poroso, para garantir a resistência mecânica aos filmes finos e propiciar um aumento no fluxo permeado (SHI *et al.*, 1998).

Estudos de ultrafiltração de soluções aquosas contendo alginato de sódio foram conduzidos por pesquisadores da Universidade de Twente, na Holanda, visando a determinação da filtrabilidade deste polieletrólito em função do ambiente iônico. Para soluções aquosas contendo 50 ppm de alginato de sódio, sem a adição de outros sais, observou-se que a reversibilidade da incrustação nas fibras ocas de poli(éter sulfona) foram muito dependentes do fluxo permeado. A adição de cloreto de potássio à solução aumenta a resistência à filtração, uma vez que a repulsão eletrostática entre as cadeias do polímero são reduzidas, provocando o depósito de uma camada mais densa na superfície da membrana. Por outro lado, a adição de cálcio à solução reduz a resistência à filtração, devido à formação de aglomerados e a uma camada de gel mais permeável que pode, eventualmente, bloquear os poros da membrana (VAN DE VEN *et al.*, 2008). Um esquema ilustrativo dos modelos propostos para a conformação das cadeias é apresentado na Figura 4. 2.

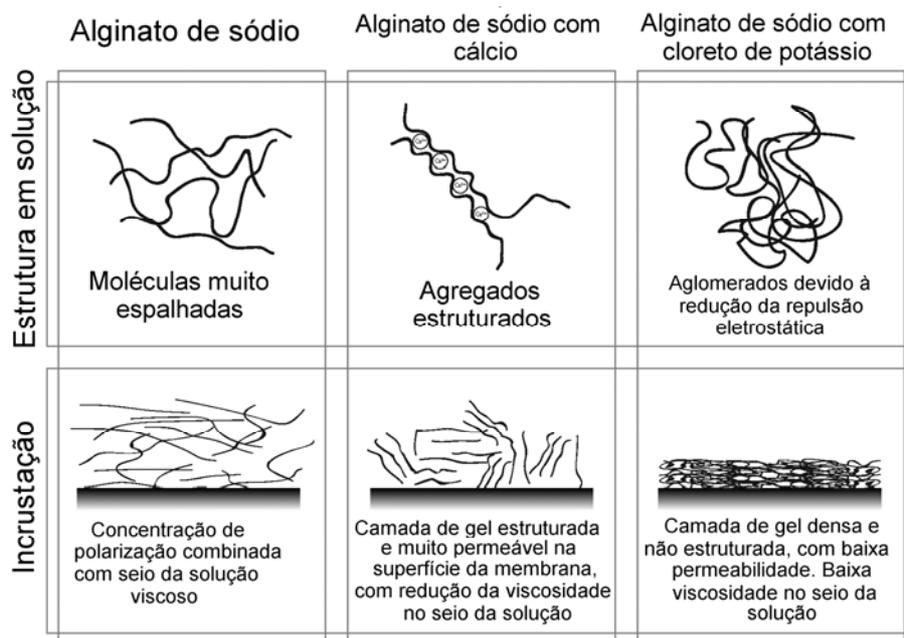


Figura 4. 2: Modelos propostos por VAN DE VEN *et al.* (2008) para a conformação das cadeias de alginato de sódio em solução e na camada de incrustação de membranas de ultrafiltração como função do ambiente iônico.

Com base nestes estudos, a investigação da síntese de membranas compostas através da ultrafiltração de soluções de alginato de sódio foi investigada durante o estágio de doutorado no Grupo de Tecnologia de Membranas da Universidade de Twente. O

desenvolvimento de uma técnica de preparo destas membranas que permita o depósito de uma camada superficial seletiva com espessura de alguns micrômetros pode viabilizar o emprego destes filmes em escala industrial, já que o fluxo permeado pode ser bastante aumentado. Além disso, como o alginato é um polissacarídeo, espera-se que ele seja capaz de manter a estrutura nativa e atividade biológica da mioglobina equina.

4.2. Objetivo

Considerando a necessidade de desenvolvimento de membranas de transporte facilitado com estabilidade em aplicações de longa duração, o objetivo desta etapa do trabalho foi investigar a utilização do alginato de sódio como matriz polimérica para a imobilização da mioglobina. A fixação do transportador em um filme sólido consiste em um avanço considerável na síntese deste tipo de membrana. Para isso, a interação entre o polissacarídeo e a proteína deve ser tal que permita a manutenção da estrutura nativa e atividade biológica desta última.

O principal inconveniente associado ao emprego dos filmes poliméricos densos consiste na redução significativa da permeabilidade dos permeantes, principalmente quando os resultados são comparados com os valores de fluxo permeado para as soluções mantidas em poros por capilaridade. Assim, as membranas compostas representam uma alternativa, já que permitem o depósito de uma camada superficial extremamente fina sobre um suporte microporoso, garantindo manutenção da resistência mecânica dos filmes e sem decréscimo desnecessário na taxa de transporte.

4.3. Materiais e métodos

A estratégia experimental utilizada para alcançar os objetivos apresentados anteriormente consistiu na divisão do trabalho nas seguintes etapas:

- a) Preparo e caracterização de membranas integrais de alginato de sódio com e sem mioglobina para avaliar a estabilidade da proteína no polissacarídeo;
- b) Seleção e caracterização do suporte de ultrafiltração que apresentasse afinidade com o alginato de sódio;
- c) Estudo da reticulação iônica do alginato, visando reduzir o inchamento dos filmes em água;

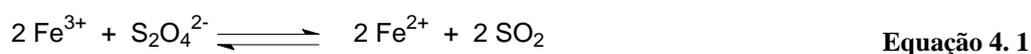
d) Imobilização da mioglobina nas membranas de alginato, visando o transporte facilitado de oxigênio.

4.3.1. Materiais

Os materiais utilizados foram alginato de sódio de viscosidade média (Sigma), mioglobina eqüina (Fluka), Sephadex G-25 superfina (Amersham Biosciences), ditionito de sódio (Merck), cloreto de ferro tetra hidratado (Fluka), cloreto de cálcio dihidratado (Acrós Organics) e cloreto de potássio (Merck). Todas as soluções foram preparadas usando água Milli-Q. Membranas de ultrafiltração de acetato de celulose (Nadir) foram investigadas como suporte.

4.3.2. Ativação da metamioglobina

Para ativar a proteína, a mioglobina comercial foi dissolvida em água, já que os testes de avaliação do efeito da força iônica e do pH indicaram que não houve alteração da estrutura nativa neste solvente puro, conforme apresentado no Capítulo 3. Adicionou-se ditionito de sódio, Na₂S₂O₄, em excesso, para promover a redução do Fe³⁺, conforme a Equação 4. 1.



A solução resultante foi transferida para uma coluna de filtração em gel, preenchida com a resina Sephadex G25 superfina, para separar a oximioglobina dos subprodutos da reação. O preparo da coluna consistiu no inchamento de cerca de 10 g da resina em água durante aproximadamente 15 horas. O fracionamento da proteína em porções de 5 mL contendo cerca de 0,1 g foi necessário para a manutenção da capacidade de separação do gel por mais tempo.

Os espectros no UV-visível das soluções obtidas foram avaliados com o objetivo de verificar a eficácia das etapas de redução e separação da proteína. Caso a fração obtida apresentasse absorção intensa em 630 nm, característico da metamioglobina, ou 350 nm, característico de ditionito, as etapas de separação ou redução eram repetidas.

A proteína foi concentrada até cerca de 70 g/L por ultrafiltração com auxílio do Centriprep[®] YM10 (Millipore), apresentado na Figura 4. 3. O dispositivo consiste em tubos concêntricos, em que a extremidade inferior do tubo interno contém uma membrana de celulose. Sob a ação de uma força centrífuga, a água ou a solução tampão permeia através da membrana e a proteína é retida no tubo mais externo. Utilizou-se centrifugação a 1800 g, a 4°C.



Figura 4. 3: Ilustração do Centriprep[®], utilizado para a concentração da proteína.

Uma vez reduzida e concentrada, a oximioglobina era armazenada em geladeira, cerca de 4°C, até ser utilizada na síntese das membranas.

4.3.3. Membranas densas integrais

4.3.3.1. Preparo das membranas integrais

Foram preparadas soluções aquosas de alginato de sódio 1% em massa contendo 10 mM de KCl. Em seguida, caso necessário, foram misturadas as quantidades desejadas de solução de oximioglobina. A solução resultante foi homogeneizada, transferida para uma placa de Petri de polietileno e seca a 20°C em uma capela por cerca de 15 horas. Foram avaliados os efeitos da razão mássica entre o polímero e o transportador, bem como a adição de cloreto de cálcio ao sistema.

4.3.3.2. Caracterização das membranas integrais

Espectroscopia no UV-visível

Testes de espectroscopia no UV-visível (Shimadzu) foram realizados para determinar a forma fisiológica da mioglobina nos filmes de alginato de sódio. Amostras de dimensões 2,0 por 0,4 cm foram inseridas na cubeta do espectrofotômetro para a realização das leituras. Os filmes preparados sem a adição do transportador foram usados como referência. A manutenção da oximioglobina nos filmes foi caracterizada através da absorção nos comprimentos de onda 543 e 581 nm.

Inchamento em água

Os testes de inchamento das membranas integrais em água foram realizados com o objetivo de verificar se houve alguma redução na solubilidade do polímero em virtude da adição dos íons cálcio, ou mesmo pela interação entre a proteína e o polissacarídeo. Assim, amostras de 2 por 2 cm das membranas densas foram transferidas para uma placa de Petri contendo água. O sistema foi fechado e levado a uma estufa a 40°C por 48 horas. Em seguida, a água foi removida das placas e as dimensões dos filmes foram determinadas. Foram utilizadas as médias de, pelo menos, quatro medidas.

Transferiu-se as amostras inchadas para um dessecador por cerca de 24 horas e tomou-se novamente as medidas das dimensões das amostras, conforme mencionado anteriormente. A porcentagem de inchamento dos filmes foi calculada de acordo com a Equação 4. 2.

$$I = \left(\frac{l_u - l_s}{l_s} \right) * 100 \quad \text{Equação 4. 2}$$

Onde I é o inchamento da amostra, l_u e l_s são as médias dos lados da amostra úmida e seca, respectivamente.

4.3.4. Membranas densas compostas

4.3.4.1. Escolha e caracterização do suporte

Membranas de ultrafiltração de acetato de celulose (Nadir) foram pré-selecionadas como suporte para os filmes de alginato de sódio devido à semelhança química estrutural entre estes polímeros. Antes de efetuar os ensaios, as membranas foram lavadas por aproximadamente 30 minutos com água corrente na temperatura de 30°C para remover o glicerol usado no preenchimento dos poros, de acordo com as instruções do fabricante. A caracterização do fluxo de água pura (Milli-Q) através das membranas com diâmetro de corte de 5 e de 100 kDa foi investigada e os valores de fluxo permeado permitiram escolher entre os materiais disponíveis.

Testes de permeação de soluções aquosas de alginato de sódio e de mioglobina, ambos na concentração de 0,1% em massa, foram conduzidos visando inferir sobre a afinidade entre o suporte e o material da superfície da membrana. As retenções do polímero e da proteína foram investigadas através de um balanço de massa. A quantificação dos teores da mioglobina e do alginato na alimentação e no permeado foram realizados por meio de espectroscopia. No caso da oximioglobina, o coeficiente de extinção foi utilizado para estimar a concentração da proteína. Já para o alginato de sódio, foi utilizada a técnica proposta por Dubois e colaboradores (DUBOIS *et al.*, 1953), que se baseia na redução de açúcares com fenol, catalisada por ácido sulfúrico.

4.3.4.2. Preparo das membranas compostas

Membranas densas compostas foram preparadas pela ultrafiltração de soluções aquosas de alginato de sódio, 0,1% em massa, e KCl 10 mM sobre o suporte de acetato de celulose. Uma vez bloqueados os poros pelas moléculas do polissacarídeo, as soluções aquosas de oximioglobina e/ou reticulante foram adicionadas ao tanque de filtração, com área de permeação de 36,3 cm². As condições operacionais utilizadas foram 3 bar, 20°C e 700 rpm. As membranas foram secas por 12 horas, na temperatura ambiente.

Como reticulantes para as membranas de alginato de sódio, foram investigados os cloretos de cálcio e de ferro (II). Testes de espectroscopia no UV-visível foram realizados para avaliar os efeitos destas soluções salinas na estrutura nativa da mioglobina. A absorção nos picos característicos foi usada como padrão de comparação.

As variáveis investigadas durante a síntese das membranas compostas foram a proporção entre o alginato de sódio, a mioglobina e os íons reticulantes. Os efeitos da concentração da proteína e de cálcio nos filmes foram avaliados de acordo com as técnicas de caracterização e desempenho descritas a seguir.

4.3.4.3. Caracterização das membranas compostas

Espectroscopia no UV-visível

A quantificação da mioglobina nas soluções de alimentação e do permeado foi realizada por espectroscopia no UV-visível. Além de determinar a quantidade de proteína retida na membrana, estes testes permitiram a determinação da forma fisiológica da proteína após permeação. Em outras palavras, foi possível inferir se houve desativação da proteína durante a etapa de ultrafiltração.

Inchamento em água

Como os filmes de alginato são bastante hidrofílicos, os testes de inchamento foram realizados usando vapor de água ao invés da água líquida, para evitar a extração da camada superficial das membranas compostas (SHI *et al.*, 1998). Amostras de 2 por 2 cm foram transferidas para placas de Petri, que por sua vez foram colocados em um dessecador contendo água em sua base. O dessecador foi hermeticamente fechado e após cerca de 48 horas, a 20°C, as amostras foram retiradas e tiveram sua massa determinada.

Em seguida, as amostras foram transferidas para uma estufa a vácuo, a 30°C, até que não houvesse alteração da massa das amostras. A porcentagem de inchamento foi calculada de acordo com a Equação 4.3.

$$I = \left(\frac{m_u - m_s}{m_s} \right) * 100$$

Equação 4. 3

Onde I é o inchamento da amostra, m_u e m_s são a massa da amostra úmida e seca, respectivamente.

Microscopia eletrônica de varredura

As morfologias da camada superficial e da seção transversal das membranas compostas de alginato de sódio foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (JSM 5600LV). As amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido, quando possível, secas em uma estufa a vácuo por 15 horas e recobertas com ouro antes da análise. As imagens obtidas foram utilizadas para inferir a respeito da afinidade entre a camada superficial e o suporte.

Fluxo de água pura

O fluxo de água pura através das membranas compostas foi medido usando um tanque com área de permeação de 3,14 cm², operado a 3 bar, 20°C e 700 rpm. A massa do permeado foi medida em intervalos regulares de tempo e o fluxo permeado foi calculado em seguida.

4.3.5. Testes de desempenho

4.3.5.1. Permeação de gases

Testes de permeação dos gases oxigênio e nitrogênio foram realizados, utilizando a metodologia descrita no Anexo 2.

4.3.5.2. Permeação em fase líquida

A investigação do transporte facilitado de oxigênio através da membrana de PVA com mioglobina foi realizada em uma célula de diálise, conforme apresentado na Figura 4. 4.

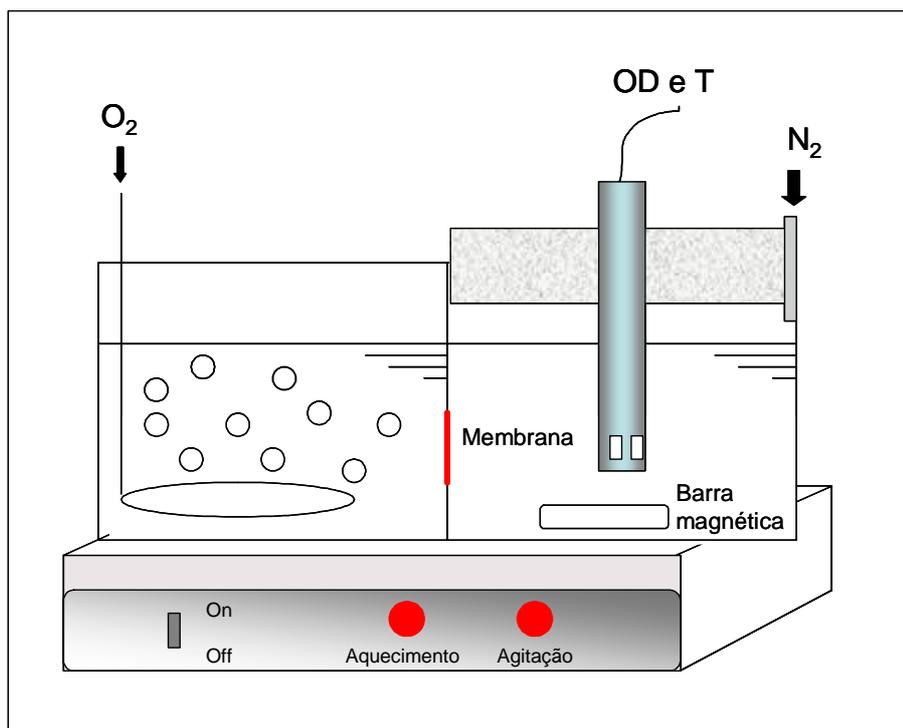


Figura 4. 4: Montagem experimental utilizada nos testes de permeação de oxigênio em fase líquida. OD e T referem-se ao eletrodo de oxigênio dissolvido e de temperatura.

A célula de diálise consiste em dois compartimentos de acrílico contendo uma abertura para o acoplamento da membrana. A membrana ($7,0 \text{ cm}^2$ de área) foi colocada na junção destes compartimentos. Adicionou-se 250 mL de água destilada em cada lado. Um dos compartimentos foi mantido saturado em oxigênio, borbulhando continuamente este gás durante o teste. O outro foi isolado do ambiente, desoxigenado com N_2 e mantido sob atmosfera inerte. O aumento na concentração de oxigênio dissolvido foi medido com o auxílio de um sensor de oxigênio (YSI), sendo que o sistema foi agitado magneticamente. O percentual de saturação em oxigênio com o tempo para a membrana contendo transportador foi comparado ao da membrana isenta de mioglobina, a fim de caracterizar o transporte facilitado.

4.4. Resultados e discussão

4.4.1. Membranas densas integrais

Membranas densas integrais de alginato de sódio contendo oximioglobina foram preparadas com o objetivo de investigar a estabilidade da proteína nos filmes deste polissacarídeo. Cloreto de potássio, na concentração de 10 mM, foi adicionado à solução polimérica visando a obtenção de um filme mais denso, de acordo com os resultados anteriores do Grupo de Tecnologia de Membranas (VAN DE VEN *et al.*, 2008). A razão mássica entre a mioglobina e o alginato de sódio foi variada de 0 a 2 g/g. Membranas vermelhas, sem defeitos e com espessura média de 30 μm foram obtidas. A fotografia da membrana é apresentada na Figura 4. 5.



Figura 4. 5: Fotografia da membrana densa integral de alginato de sódio (Mb/alginato = 2 g/g).

A adição de cloreto de cálcio à solução contendo alginato de sódio, KCl e oximioglobina foi efetuada, visando investigar a possibilidade de reticulação iônica do polissacarídeo. Entretanto, o cálcio provocou a formação de agregados de proteína, que comprometeram a homogeneidade dos filmes produzidos. Estes resultados indicaram uma necessidade de investigação mais criteriosa da concentração limite de cálcio capaz de manter a estrutura nativa da mioglobina, uma vez que a aglomeração da proteína

geralmente está associada à perda da conformação nativa e posterior junção das regiões hidrofóbicas da molécula.

Para um pH de 6,5, correspondente à água utilizada como solvente, o alginato de sódio apresenta-se negativamente carregado enquanto a mioglobina possui uma carga ligeiramente positiva, indicando que o tipo de interação esperada entre o polissacarídeo e a proteína é eletrostática. Com o objetivo de investigar a estrutura da proteína em alginato, espectros de UV-visível dos filmes foram determinados e as curvas obtidas podem ser visualizadas na Figura 4. 6.

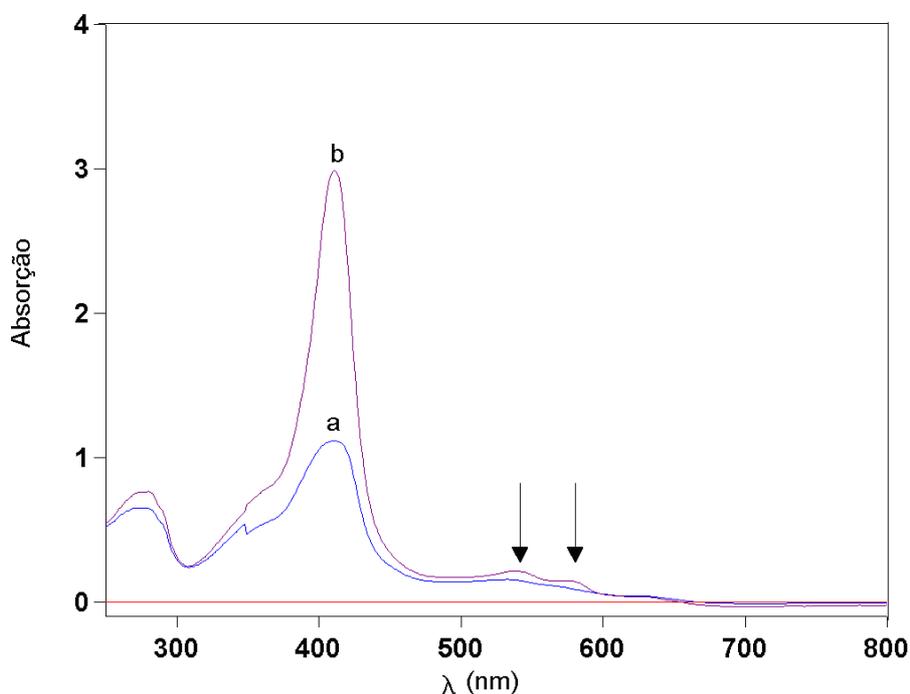


Figura 4. 6: Espectros no UV-visível das membranas integrais de alginato com variação da concentração de mioglobina. a) razão Mb/alginato = 1 g/g e b) razão Mb/alginato = 2 g/g. Encontram-se destacados os picos característicos da oximioglobina.

Os picos de absorção em 418, 542 e 581 nm são equivalentes à forma oximioglobina e indicam a manutenção da estrutura nativa da proteína nos filmes de alginato. A análise espectrofotométrica foi repetida uma vez por semana durante dois meses e não houve alteração no perfil de absorção. Portanto, a interação eletrostática não comprometeu a estrutura da proteína e o alginato de sódio mostrou-se um bom material para imobilização do biotransportador.

Testes de inchamento em água líquida foram realizados para verificar a possibilidade da alteração na estrutura do polissacarídeo devido à interação com a mioglobina. Entretanto, a dissolução das membranas revelou que a interação da água com o polímero e com a proteína são maiores que o par polímero/proteína.

4.4.2. Membranas compostas de alginato de sódio reticuladas com cálcio

A síntese de membranas compostas de alginato de sódio foi investigada visando aumentar a resistência mecânica dos filmes densos integrais. Suportes com duas retenções nominais diferentes foram selecionados, com 5 e 100 kDa. A caracterização do fluxo de água pura através dos mesmos é apresentada na Tabela 4. 1, bem como os valores de referência fornecidos pelo fabricante.

Tabela 4. 1: Fluxo de água pura através das membranas de ultrafiltração de acetato de celulose (Nadir). Condições operacionais: $\Delta P = 3$ bar, $T = 20^\circ\text{C}$ e 700 rpm.

Retenção nominal (kDa)	Fluxo de água (L/hm^2)	Valor esperado (L/hm^2)
5	45	> 25
100	376 ± 15	200 - 400

Os valores experimentais e de referência para o fluxo de água foram concordantes e a escolha da membrana com retenção nominal igual a 100 kDa foi baseada em sua reprodutibilidade nos testes de permeação de uma solução aquosa de alginato de sódio 0,1% em massa contendo 10 mM de KCl, conforme ilustrado na Figura 4. 7. Os testes foram conduzidos em triplicata e os desvios foram inferiores a 10%. Apesar de esta retenção nominal ser bastante superior às dimensões da mioglobina, que é de 18 kDa, a síntese da membrana composta pode ser realizada desde que haja uma etapa anterior para bloquear os poros com a solução de alginato de sódio.

A retenção do alginato de sódio na membrana de acetato de celulose foi quantificada com auxílio do método de Dubois (DUBOIS *et al.*, 1956). Foram determinadas as concentrações do polissacarídeo na solução de alimentação e no permeado e a quantidade retida foi calculada por um balanço de massa. Observou-se um grau de retenção superior a 95%, que corresponde a $1,67$ mg de alginato/ cm^2 de membrana.

A permeabilidade de uma solução aquosa de mioglobina, na concentração de 0,1% em massa, também foi investigada e os resultados são apresentados na Figura 4. 8. Observou-se uma retenção de 65% da mioglobina na membrana de acetato de celulose.

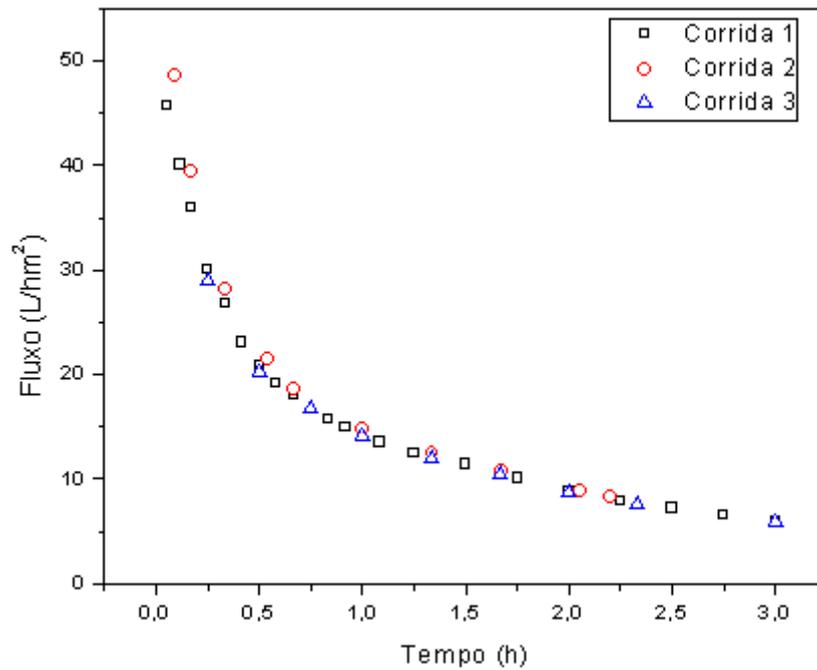


Figura 4. 7: Caracterização do fluxo das soluções aquosas de alginato de sódio, 0,1% em massa, através da membrana de acetato de celulose com retenção nominal de 100 kDa.

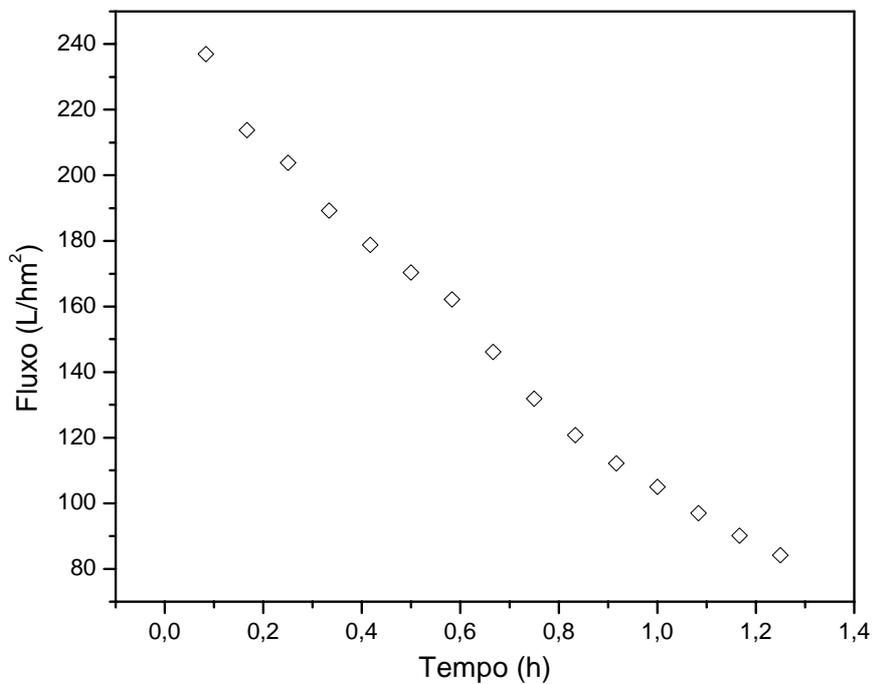


Figura 4. 8: Caracterização do fluxo de uma solução aquosa de mioglobina, 0,1% em massa, através da membrana de acetato de celulose com retenção nominal de 100 kDa.

A reticulação das membranas de alginato de sódio pelo cálcio foi avaliada variando-se a razão mássica entre o cátion e o polímero de 4 a 16 g/g. Apesar de consistir em um valor elevado de cálcio, em comparação com outros trabalhos da literatura (VAN DE VEN *et al.*, 2008), os testes visavam investigar o grau máximo de reticulação que poderia ser alcançado para o sistema, já que houve completa dissolução das membranas integrais durante o teste de inchamento em água líquida. Os resultados obtidos para a avaliação do inchamento das membranas compostas em vapor d'água são apresentados na Tabela 4. 2.

Tabela 4. 2: Inchamento das membranas compostas em vapor d'água.

Amostra	Inchamento (%)
Suporte sem cobrimento	6,0
Suporte + alginato de sódio com KCl	42,8
Suporte + Ca ²⁺ /alginato = 4 g/g	10,6
Suporte + Ca ²⁺ /alginato = 8 g/g	10,4
Suporte + Ca ²⁺ /alginato = 16 g/g	7,6

As membranas de alginato de sódio sem reticulação apresentaram o maior grau de inchamento em vapor d'água, conforme esperado. Comparado ao suporte sem recobrimento, houve um aumento de 7 vezes no grau de inchamento devido à hidrofilicidade da camada de alginato de sódio. A adição de cloreto de cálcio diminui o inchamento em água, indicando que a reticulação do alginato foi eficiente. O aumento da adição de cálcio parece ter pouco efeito no grau de inchamento, mostrando que a membrana já alcançou a maior densidade de reticulação. Vale ressaltar que a razão mássica Ca²⁺/alginato apresentada na tabela acima corresponde à razão nominal, ou seja, às quantidades do reticulante e do polímero adicionadas ao tanque de permeação.

Testes de ultrafiltração indicaram que não houve fluxo de água pura através das membranas reticuladas com cálcio durante 7 horas de experimentos. Em outras palavras, estes testes comprovaram que a síntese de uma camada densa sobre o suporte foi efetiva e que a reticulação com o cálcio reduziu a afinidade do sistema pela água, conforme esperado. Estes resultados mostram que é possível controlar a densidade de reticulação dos filmes de alginato através da adição de íons cálcio.

Com o intuito de investigar a morfologia da camada superficial e da seção transversal das membranas compostas, utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura. Os resultados da análise são apresentados na Figura 4. 9. Com o objetivo de comparar os resultados, as amostras selecionadas foram o suporte sem revestimento, revestido por alginato de sódio/KCl e por alginato/KCl/CaCl₂.

A análise da membrana de acetato de celulose usada como suporte, Figura 4. 9 – imagens a e b, revela uma rede muito complexa formada pelo papel sem trama (*non-woven*), o que provocou uma elevada resistência à cisão da amostra em nitrogênio líquido. Portanto, as amostras foram seccionadas com auxílio de um estilete, o que pode comprometer um pouco a análise morfológica. A fotografia da seção transversal ilustra a estrutura do suporte: uma camada superficial mais organizada e compacta que se torna mais espaçada na medida em que se aproxima da base usada para conferir resistência mecânica.

Para o suporte de acetato de celulose revestido por alginato de sódio, Figura 4. 9 – imagens c e d, a presença de bolhas sugere a formação de aglomerados de água à medida que a membrana é seca. Não é possível identificar se a formação destas gotículas ocorreu durante a secagem das membranas na capela ou durante a exposição ao vácuo, durante o preparo da amostra para análise. Ainda assim, a imagem da seção transversal indica uma elevada afinidade entre o alginato de sódio e o acetato de celulose, já que a camada superficial (membrana + camada de revestimento) se descolou do suporte, ou seja, do papel sem trama. Esta elevada afinidade confirma os resultados obtidos anteriormente, que indicaram um teor de retenção do alginato superior a 95% na membrana de ultrafiltração em todos os ensaios.

Para as membranas reticuladas com cálcio, Figura 4. 9 – imagens e e f, foi observado uma contração bastante significativa da camada superficial (membrana + revestimento) durante a exposição ao vácuo. Em todas as amostras analisadas, houve descolamento desta camada nas extremidades e, ainda, o aparecimento de fendas e defeitos provenientes de uma pequena elasticidade das membranas. Portanto, a adição de cálcio promoveu a reticulação efetiva das membranas. A aplicabilidade das mesmas, porém,

depende de um ajuste na densidade de reticulação para otimizar o inchamento em água e a flexibilidade da pele da membrana.

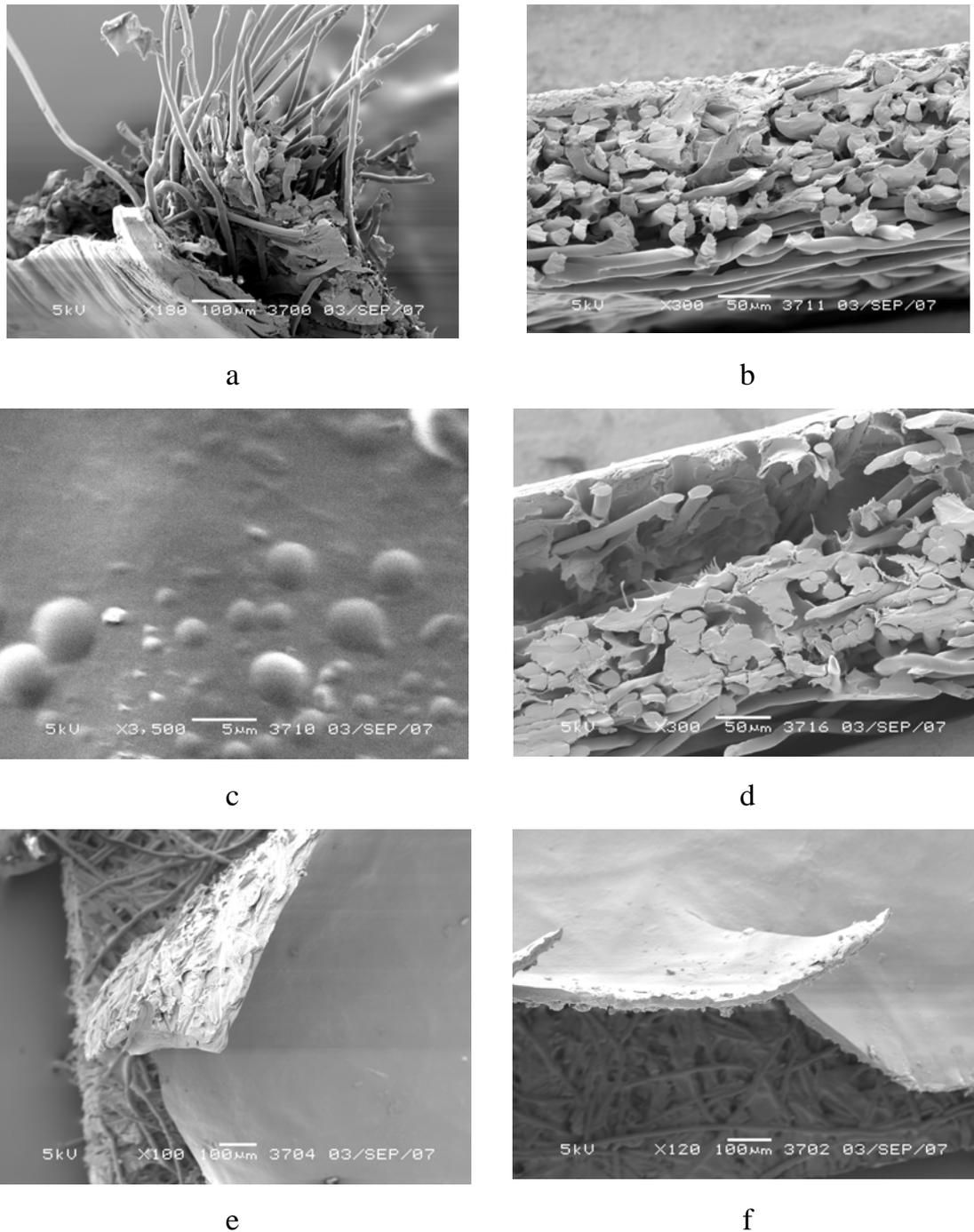


Figura 4. 9: Imagens das membranas compostas de alginato de sódio. a) Extremidade da membrana mostrando a estrutura do papel sem trama (*non-woven*), b) Seção transversal do suporte sem cobertura, c) Camada superficial da membrana recoberta com alginato de sódio, d) Seção transversal da membrana coberta com alginato, e) Descolamento da camada superficial da membrana de alginato reticulada com cálcio, f) Cisão da camada superficial da membrana com razão $\text{Ca}^{2+}/\text{alginato} = 16 \text{ g/g}$.

Ainda a respeito da análise de microscopia eletrônica de varredura, uma estimativa preliminar indicou que a espessura da camada superficial das membranas compostas foi de 5 μm . Este valor ainda está cerca de 10 a 50 vezes maior que aqueles utilizados em aplicações industriais (BAKER, 2004). Obviamente, quanto menor for a espessura da “pele”, menor será a resistência ao transporte.

4.4.3. Membranas compostas de alginato de sódio contendo mioglobina

A síntese das membranas compostas de alginato de sódio contendo mioglobina foi investigada visando a estabilização da proteína no polissacarídeo para garantir o transporte seletivo de oxigênio, ao mesmo tempo em que o controle da espessura da camada depositada evita resistências desnecessárias ao transporte. Como os filmes densos apresentaram um elevado inchamento em água líquida, a necessidade de reticulação do polissacarídeo com íons foi demonstrada. Os cloretos de cálcio e de ferro (II), este último por se tratar do sítio ativo da mioglobina, foram selecionados para a investigação. Inicialmente, a estabilidade da oximioglobina em soluções aquosas destes sais foi avaliada através de um estudo espectrofotométrico.

O comportamento da oximioglobina em soluções aquosas de cloreto de cálcio com concentrações variadas do sal são apresentados na Figura 4. 10. Os espectros foram determinados 1 hora após a mistura da proteína à solução salina.

Para todas as amostras, observou-se a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} , conforme evidenciado pela absorção a 630 nm. Uma possível explicação para o fenômeno seria a ligação do cálcio a algum resíduo próximo ao sítio ativo da proteína, que favoreceu o deslocamento do oxigênio molecular pela água, causando a oxidação do ferro. Esta modificação deve ter favorecido a desativação da proteína. Para concentrações maiores de cálcio, iguais a 0,5 e 1 mM, houve modificação do perfil de absorção na região do Soret, indicando perda da conformação nativa da proteína. A modificação do formato e da intensidade de absorção nestas amostras deve ser o resultado da aglomeração das cadeias do polipeptídeo.

A mesma tendência foi observada para as soluções de oximioglobina em cloreto de ferro (II), conforme apresentado na Figura 4. 11. As soluções mais diluídas do sal apresentaram oxidação do ferro, enquanto a amostra correspondente a 1 mM de FeCl_2 apresentou perda do perfil característico de absorção.

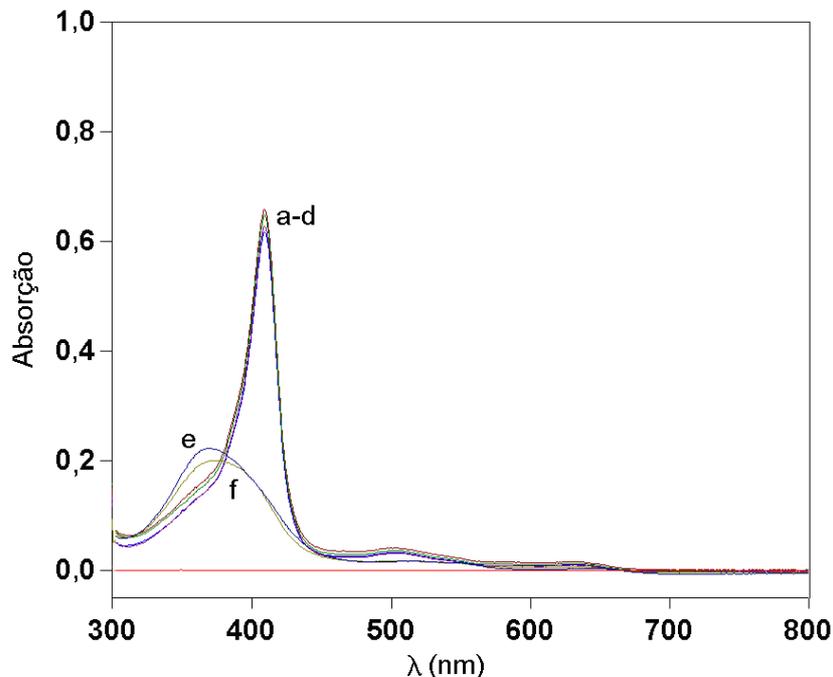


Figura 4. 10: Espectros da oximioglobina em soluções de cloreto de cálcio. Concentração do CaCl_2 : a – 1 μM , b – 0,07 mM, c – 0,13 mM, d – 0,25 mM, e – 0,5 mM, f – 1 mM.

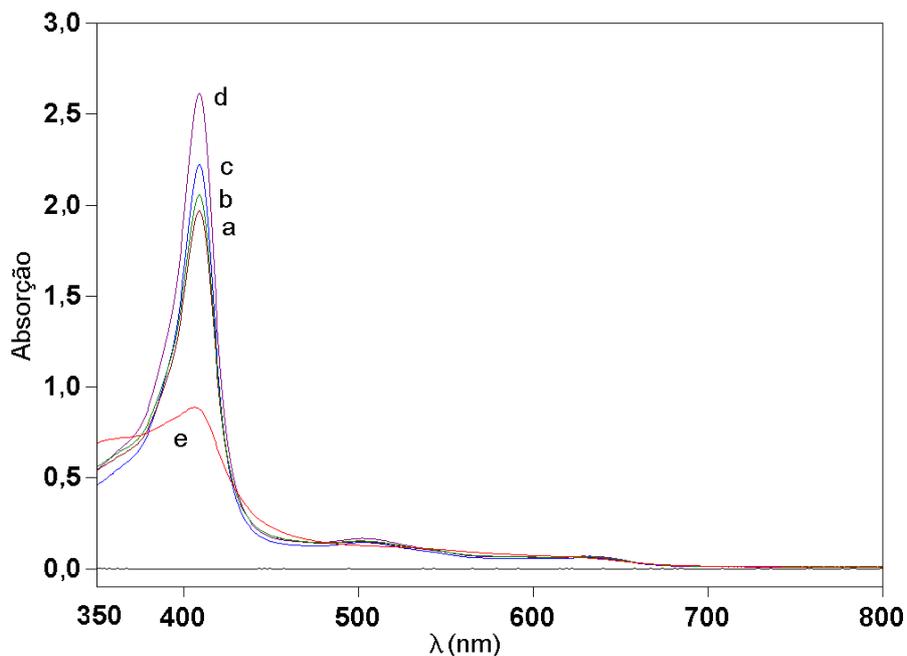


Figura 4. 11: Espectros da oximioglobina em soluções de cloreto de ferro (II). Concentração do FeCl_2 : a – 0,07 mM, b – 0,13 mM, c – 0,25 mM, d – 0,5 mM, e – 1 mM.

É interessante observar ainda que as curvas de λ até μ apresentam um aumento gradual na absorção do Soret, provavelmente indicando que o grupo prostético da proteína está sendo exposto para a solução e que a força motriz para a ocorrência deste fenômeno é a concentração dos íons na solução.

Estes resultados revelaram a instabilidade da mioglobina nas soluções de cálcio e de ferro (II), dificultando o uso destes compostos como reticulantes do alginato. Ainda assim, a síntese de membranas de alginato de sódio contendo mioglobina foi investigada variando-se a ordem de adição e a concentração das soluções de proteína e de cálcio. Nestes testes, a hipótese avaliada era a diluição ainda maior da solução salina, através do aumento da concentração da proteína ou da redução do “cálcio livre”, mediante o acréscimo deste antes da proteína no tanque de ultrafiltração, que promoveria a reticulação da pele da membrana antes da adição da proteína. Entretanto, em todos os casos, foi observada a presença da metamioglobina no permeado, ou seja, o processo de síntese da membrana causou oxidação do ferro.

Tentativas de reativar a proteína na membrana foram investigadas através da adição de ditionito de sódio, o agente redutor da biomolécula, ao tanque de ultrafiltração após o preparo das membranas, mas a coloração da membrana mudou de marrom para verde, indicando que o processo não foi eficiente.

Novas membranas foram, então, preparadas sem a adição de agentes reticulantes. A razão mássica entre a mioglobina e o alginato foi variada e estabeleceu-se um valor ótimo igual a 0,5 g/g, já que concentrações maiores levam à formação de aglomerados da proteína na superfície da membrana. A análise morfológica das membranas produzidas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura e as imagens obtidas são apresentadas na Figura 4. 12.

A imagem da seção transversal revela, mais uma vez, o descolamento da camada superficial (membrana + recobrimento) do papel sem trama (*non-woven*). Esta observação indica que a adição da mioglobina à matriz de alginato de sódio não alterou a afinidade entre o polissacarídeo e a membrana de ultrafiltração de acetato de celulose, que compõe a estrutura porosa superficial da membrana de ultrafiltração.

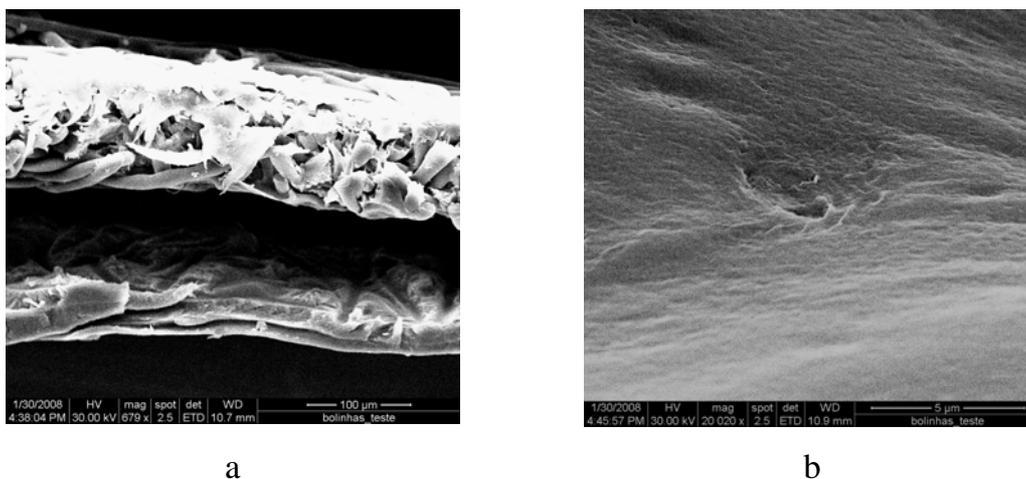


Figura 4. 12: Imagem de microscopia eletrônica obtida para a seção transversal (a) e para a camada superficial (b) das membranas compostas contendo alginato e mioglobina sem reticulantes.

Já em relação à análise da superfície, não foi possível identificar a presença de poros, mesmo com uma magnificação de 20.000 vezes, o que consiste em um bom indício de que houve formação de uma estrutura densa no topo da membrana.

4.4.4. Testes de desempenho

Testes de permeação em fase gasosa foram conduzidos para as membranas compostas de alginato com e sem mioglobina no sistema padrão de permeação existente no laboratório. Entretanto, não foi possível determinar a permeabilidade das membranas aos gases oxigênio e nitrogênio. Os resultados indicam que a permeabilidade é inferior a 0,05 Barrer, que é o limite de detecção do equipamento. Uma alternativa possível para a determinação da permeabilidade seria a utilização de pressões maiores na corrente de alimentação, mas nestas condições, pode haver saturação dos sítios do transportador, o que poderia mascarar o mecanismo reativo de transporte.

Testes conduzidos em fase líquida, por meio de uma célula de diálise, mostraram que a camada superficial da membrana, composta por alginato, KCl e mioglobina, é extraída para o meio aquoso durante os ensaios, comprometendo a confiabilidade dos resultados.

4.5. Conclusão

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho revelaram a compatibilidade entre o alginato de sódio e a mioglobina, uma vez que a estrutura nativa da proteína foi mantida nos filmes densos deste polissacarídeo por mais de 60 dias. Em relação à síntese das membranas compostas, verificou-se que a escolha do acetato de celulose como material do suporte foi adequada, já que a afinidade com o alginato e a mioglobina foi comprovada. Observou-se uma retenção de 95% do polissacarídeo na membrana de ultrafiltração, o que corresponde a 1,67 mg/cm². Mais de 65% da proteína também ficaram retidos no suporte.

O procedimento para a síntese das membranas compostas de alginato contendo mioglobina foi estabelecido, com razão proteína/polissacarídeo ótima de 0,5 g/g. Entretanto, a imobilização adequada da proteína no suporte deve ser investigada visando caracterizar a permeabilidade do oxigênio e do nitrogênio através das membranas, comprovando o transporte facilitado de oxigênio.

4.6. Referências bibliográficas

- BAKER, R. W., 2004, *Membrane technology and applications*, 2nd Ed., New York, John Wiley & Sons Ltd.
- DE, S., ROBINSON, D., 2003, "Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-L-lysine-alginate nanospheres", *Journal of Controlled Release*, v. 89, n. 1 (Apr), pp. 101-112.
- DRAGET, K. I., SMIDSRØD, O., SKJAK-BRAEK, G., 2005, "Alginates from algae", In: Steinbuchel, A., Rhee, S. K. (eds.), *Polysaccharides in the food industry. Properties, Production, and Patents*, chapter 8, Weinheim, Germany, John Wiley & Sons Ltd.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K. *et al.*, 1956, "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, pp. 350-356.
- FATIN-ROUGE, N., DUPONT, A., VIDONNE, A., *et al.*, 2006, "Removal of some divalent cations from water by membrane-filtration assisted with alginate", *Water Research*, v. 40, n. 6 (Mar), pp. 1303-1309.
- FUNDUEANU, G., NASTRUZZI, C., CARPOV, A., *et al.*, 1999, "Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods", *Biomaterials*, v. 20, n. 15 (Ago), pp. 1427-1435.
- GEORGE, M., ABRAHAM, T. E., 2006, "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan – a review", *Journal of Controlled Release*, v. 114, n. 1 (Ago), pp. 1-14.

- GRANT, G. T., MORRIS, E. R., REES, D. A. *et al.*, 1973, “Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model”, *Febs Letters*, v. 32, n. 1, pp. 195-198.
- JERMANN, D., PRONK, W., Meylan, S., *et al.*, 2007, “Interplay of different NOM fouling mechanisms during ultrafiltration for drinking water production”, *Water Research*, v. 41, n. 8 (Apr), pp. 1713-1722.
- KIM, M. J., PARK, Y. M., YOUM, K. H., *et al.*, 2004, “Facilitated transport of CO₂ through ethylenediamine-fixed cation-exchange polysaccharide membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 245, n. 1-2 (Dec), pp. 79-86.
- LEE, S., ANG, W. S., ELIMELECH, M., 2006, “Fouling of reverse osmosis membrane by hydrophilic organic matter: implications for water reuse”, *Desalination*, v. 187, pp. 313-321.
- SILVA, C. M., RIBEIRO, A. J., FIGUEIREDO, M., *et al.*, 2005, “Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation”, *The AAPS Journal*, v. 7, n. 4, pp. E903-E913.
- SHI, Y., WANG, X., CHEN, G., *et al.*, 1998, “Preparation and characterization of high-performance dehydrating pervaporation alginate membranes”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 68, n. 6 (May), pp. 959-968.
- SHI, Y., WANG, X., CHEN, G., 1996, “Pervaporation characteristics and solution-diffusion behaviors through sodium alginate dense membrane”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 61, n. 8 (Aug), pp. 1387-1394.
- VAN DE VEN, W. J. C., VAN’T SANT, K., PUNT, I. G. M., *et al.*, 2008, “Hollow fiber dead-end ultrafiltration: Influence of ionic environment on filtration resistance of alginates”, *Journal of Membrane Science*, v. 308, n. 1-2 (Feb), pp. 218-229.
- YE, Y., CLECH, P. L., CHEN, V., *et al.*, 2005, “Fouling mechanisms of alginate solutions as model extracellular polymeric substances”, *Desalination*, v. 175, n. 1 (May), pp. 7-20.
- YEOM, C. K., LEE, K. H., 1998a, “Characterization of sodium alginate and poly(vinyl alcohol) blend membranes in pervaporation separation”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 67, n. 5 (Jan), pp. 949-959.
- YEOM, C. K., LEE, K. H., 1998b, “Characterization of sodium alginate membrane crosslinked with glutaraldehyde in pervaporation separation”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 67, n. 2 (Jan), pp. 209-219.

Capítulo 5:

Estabilização do poli(álcool vinílico) através da reticulação

Nesta etapa do trabalho, a reticulação do poli(álcool vinílico) pelo glutaraldeído foi investigada na ausência de catalisadores ácidos minerais e solventes orgânicos com o objetivo de melhorar a resistência dos filmes deste polímero hidrofílico e biocompatível. O uso destas condições operacionais mais amenas pode permitir a imobilização de biomoléculas visando a aplicação como biossensores, membranas de transporte facilitado contendo biotransportadores e dispositivos de liberação controlada de drogas. O glutaraldeído foi escolhido como agente reticulante porque favorece a reação intermolecular com o poli(álcool vinílico) e é capaz de se ligar às proteínas. Os efeitos da temperatura da reação e da razão entre o polímero e o agente reticulante foram investigados através de testes de DSC, TGA, inchamento em água e permeação de gases.

5.1. Introdução

A imobilização de biomoléculas e células em um suporte hidrofílico biocompatível é o calcanhar de Aquiles de uma ampla variedade de processos biotecnológicos, uma vez que a técnica utilizada deve considerar as restrições para preservar a estrutura destas substâncias, como o pH do meio, a temperatura e a concentração de certos solventes (LOZINSKY *et al.*, 2003). Desta forma, a investigação de uma rota experimental não deletéria para fixar biomoléculas em matrizes poliméricas é um desafio que pode viabilizar a comercialização de novos produtos ou desonerar certas etapas de processos já existentes (PARK e CHANG, 2000).

O poli(álcool vinílico), PVA, é um dos principais polímeros utilizados como suporte para a imobilização de biomoléculas e células devido às propriedades de hidrossolubilidade e biocompatibilidade (LOZINSKY e PLIEVA, 1998). Produzido através da alcoólise do poli(acetato de vinila), PVAc, as propriedades físicas do PVA variam bastante, dependendo principalmente do grau de hidrólise obtido e da extensão

da cadeia polimérica (TOYOSHIMA, 1973). A investigação da plastificação do poli(álcool vinílico) pelos glicóis é apresentada no Anexo 2, enquanto a relação entre as propriedades do PVA e sua estrutura é descrita no Anexo 3. A versatilidade do PVA permite a utilização do polímero em uma série de aplicações, como em membranas para pervaporação (XIAO *et al.*, 2006), permeação de gases (PARK e LEE, 2001) e transporte facilitado (ZOU e HO, 2006, KIM *et al.*, 2004), bem como em biossensores (SEHITOGULLARI e USLAN, 2002, VIDAL *et al.*, 1996) e dispositivos para liberação controlada de drogas (LIM e WAN, 1994, BACHTSI *et al.*, 1996).

Quando empregado em processos de separação, a habilidade do PVA para a formação de filmes com boa resistência mecânica é utilizada para separar substâncias hidrofílicas de uma mistura (SHAO e HUANG, 2007) ou imobilizar transportadores para a síntese de membranas de transporte facilitado (FERRAZ *et al.*, 2007) ou biossensores (VIDAL *et al.*, 1999 a e b). Na área biotecnológica e farmacêutica, a flexibilidade e o elevado teor de água que os hidrogéis de PVA podem reter são explorados com o intuito de incorporar substâncias biologicamente ativas, como as lipases (WANG e HSIEH, 2008). Em outro tipo de aplicação, implantes do tipo reservatório são empregados para promover a liberação controlada de drogas. Nestes casos, o PVA é utilizado não só como material formador da estrutura, mas também como regulador da taxa de liberação da droga (BOURGES *et al.*, 2006).

Os hidrogéis de PVA não modificado apresentam pouca estabilidade em água, o que pode comprometer a integridade do filme e reduzir seu desempenho. Assim, através da reticulação do PVA, é possível diminuir a hidrofílicidade e fornecer uma rede adequada para a imobilização de biomoléculas. As principais técnicas utilizadas para alcançar a insolubilização do polímero em meio aquoso são baseadas em tratamentos térmicos, físicos ou químicos (HAN *et al.*, 2003).

Por meio do tratamento térmico do PVA, a energia fornecida é usada para modificar a organização espacial das cadeias e estabelecer ligações de hidrogênio mais fortes entre os grupos hidroxila, levando a uma maior cristalinidade do material (HYDER *et al.*, 2006). Embora este método aumente a resistência dos filmes à fase aquosa, a faixa de temperatura empregada para se obter resultados significativos – em geral, maior que

100°C e frequentemente igual a 150°C (NÓBREGA *et al.*, 1988) –, é muito maior que o limite tolerado pelas biomoléculas.

O envelhecimento das soluções aquosas do PVA, por outro lado, pode causar a gelificação, especialmente quando o sistema sofre ciclos de resfriamento e aquecimento consecutivamente (CASCONE *et al.*, 2002a e b). Esta é uma alternativa bastante utilizada para imobilizar biomoléculas e células (LOZINSKY *et al.*, 2003), com formação de macroporos devido às ligações de hidrogênio, conforme ilustrado na Figura 5. 1.

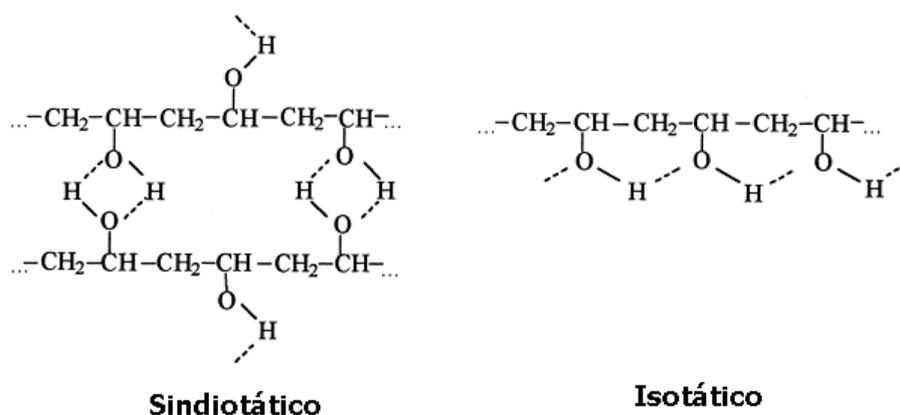


Figura 5. 1: Esquema ilustrativo dos pontos de junção da rede do PVA reticulado fisicamente em função da taticidade do polímero (LOZINSKY e PLIEVA, 1998).

Por outro lado, filmes quimicamente reticulados são baseados na reação entre um agente reticulante e a elevada quantidade de grupos hidroxila do polímero. Existe uma grande variedade de agentes reticulantes para o PVA, como o ácido maleico, o formaldeído e o glutaraldeído. Reações inter ou intramoleculares podem ser ajustadas usando agentes reticulantes ou condições operacionais específicas (HAN *et al.*, 2003).

A reticulação do PVA através da reação química com uma substância provoca a redução da hidrofiliabilidade do filme, já que a reação reduz o número de grupos hidroxila livres na cadeia polimérica. Como consequência, espera-se um menor grau de inchamento dos filmes em água. Entretanto, o efeito da reticulação na permeabilidade das membranas depende bastante do tipo de substância usada na reação (HAN *et al.*, 2003).

No caso do formaldeído, por exemplo, a ocorrência da reação intramolecular provoca um aumento no volume livre do polímero devido à combinação de dois fatores: a

formação de um anel de seis átomos dificulta o empacotamento das cadeias poliméricas, o que leva a um arranjo menos compacto da estrutura e a diminuição dos grupos hidroxila livres consumidos na reação reduz o número de ligações de hidrogênio entre as cadeias (HAN *et al.*, 2003).

Para o caso de ácidos dicarboxílicos ou dialdeídos, em que a reação intermolecular é geralmente favorecida, a alteração no volume livre dos filmes poliméricos é mais complicada. Se por um lado, o consumo dos grupos hidroxila diminui a interação entre as cadeias, aumentando a área efetiva para permeação, a ligação entre as diferentes cadeias poliméricas limita a mobilidade segmental, restringindo o caminho médio livre dos permeantes através da membrana. O resultado observado na permeabilidade depende de uma compensação entre estes dois fatores (HAN *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, o uso do glutaraldeído, GA, como reticulante para o PVA vem sendo intensificado uma vez que o método dispensa o tratamento térmico para completar a reação. Além disso, o glutaraldeído é uma substância que pode se ligar às biomoléculas como as proteínas, e tem sido freqüentemente utilizado com este propósito, muito embora ainda haja desconhecimento em relação à estrutura formada (MIGNEAULT *et al.*, 2004). A polimerização da hemoglobina para a produção da primeira geração dos HBOCs (*hemoglobin-based oxygen carriers*) usados como sangue artificial é um exemplo da habilidade deste dialdeído em conectar cadeias polipeptídicas (BUEHLER *et al.*, 2005). Como o glutaraldeído tem dois grupos funcionais, ele pode ser empregado para ligar covalentemente as proteínas e o PVA, por exemplo. Esta propriedade permite o desenvolvimento de estruturas personalizadas para serem usadas em diversas aplicações, desde que as restrições impostas pelas biomoléculas sejam consideradas.

A reticulação do PVA pelo glutaraldeído consiste em uma reação de acetalização. O mecanismo consiste na formação do hemiacetal, através da adição nucleofílica da molécula do álcool à carbonila do aldeído. Detentor das funções álcool e éter, este intermediário dificilmente é isolado, sendo hidrolisado na presença de ácidos minerais. Entretanto, nestas condições, o hemiacetal, funcionando como álcool, também pode reagir com uma segunda hidroxila – que no caso do PVA pode ser o –OH adjacente –, formando um acetal via reação de substituição S_N1 através de um carbocátion, conforme

apresentado na Figura 5. 2. A formação de acetal a partir de álcool e aldeído de baixa massa molar é acelerada pela remoção de água do meio (ALLINGER *et al.*, 1978).

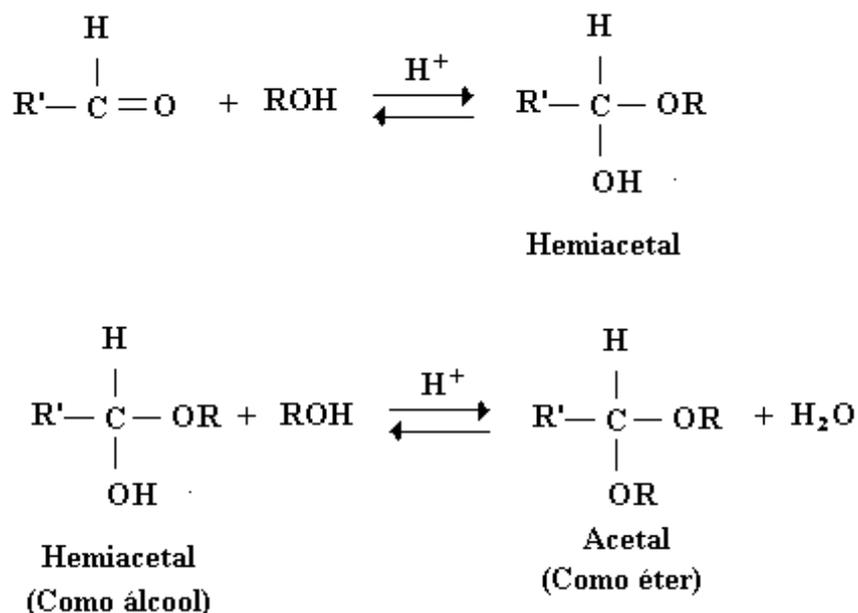


Figura 5. 2: Mecanismo da reação de acetalização evidenciando a adição nucleofílica a um grupo carbonila e a formação de éter através de um carbocátion.

O método usualmente utilizado para reticular as membranas de PVA com o glutaraldeído é baseado na imersão do filme em uma solução alcoólica contendo o reticulante e um ácido mineral, geralmente HCl ou H₂SO₄ (GUO *et al.*, 2007). O meio alcoólico é usado para inchar a membrana, permitindo a difusão das moléculas de dialdeído, bem como os íons H⁺, usados para catalisar a reação. Alternativamente, ácidos de Lewis vêm sendo investigados, como o Zn(NO₃)₂ (XU *et al.*, 2004).

Embora as condições operacionais descritas acima sejam adequadas para o preparo de membranas de PVA para pervaporação, por exemplo, a imobilização de biomoléculas requer o uso de condições mais amenas, como a ausência de meio ácido, de solventes orgânicos ou da adição de sais. Trabalhos que estudam a reticulação do PVA pelo GA na ausência de catalisadores ácidos não são do nosso conhecimento e esta investigação foi conduzida nesta etapa.

5.2. Objetivo

O objetivo desta etapa foi investigar a reticulação do PVA pelo glutaraldeído na ausência de catalisadores ácidos, visando a imobilização da mioglobina e da hemoglobina em um estágio posterior. Os efeitos da temperatura e do teor de glutaraldeído foram avaliados e a reticulação foi realizada simultaneamente à formação da membrana para simplificar o procedimento de síntese. A caracterização dos filmes obtidos foi efetuada através de testes de inchamento em água, DSC, TGA, FTIR e permeação de oxigênio e nitrogênio. Filmes de PVA reticulados pelo ácido maleico e pelo glutaraldeído na presença de HCl foram usados como referência. A seleção de condições operacionais mais amenas que as empregadas na literatura para promover a insolubilização do PVA pelo glutaraldeído sem afetar a atividade fisiológica das proteínas é de suma importância para o desenvolvimento de biossensores e membranas de transporte facilitado contendo biotransportadores.

5.3. Materiais e métodos

5.3.1 Materiais

Os reagentes utilizados foram o PVA (Aldrich, massa molar entre 85.000 e 146.000 Da, com grau de hidrólise de 99,5%), glutaraldeído (Aldrich, solução aquosa 50% em massa), ácido maleico (Vetec, teor mínimo de 99%) e HCl (Vetec, 36,5% em massa).

5.3.2. Preparo das membranas

Para a síntese das membranas, o PVA previamente seco em estufa era dissolvido em água destilada. A dissolução foi acelerada aquecendo-se o sistema a 100°C em banho de glicerol e sob agitação magnética. Após resfriamento até a temperatura ambiente, adicionava-se a solução de glutaraldeído na proporção desejada, mantendo-se a concentração final de PVA na solução de espalhamento igual a 4% em massa. O pH final da solução foi igual a 6,2, que é o pH da água destilada utilizada nos ensaios. Uma vez homogeneizada a solução, esta era vertida para placas de petri de poliestireno e secas na temperatura desejada para produzir membranas planas densas e livres de defeitos.

Os efeitos da concentração de glutaraldeído, definida aqui como a razão molar entre o glutaraldeído e a unidade monomérica do PVA, bem como da temperatura da reação nas propriedades das membranas obtidas foram investigados. A razão GA/PVA foi variada de 0,0022 a 1,8 mol/mol, enquanto as temperaturas de reação utilizadas foram 10, 25 e 40°C. Para o preparo das membranas a 10°C, as placas contendo a mistura reativa foram transferidas para um dessecador a vácuo, que foi colocado em um refrigerador. A sílica presente no recipiente era trocada de dois em dois dias para garantir a remoção da água e, conseqüentemente, a formação da membrana. Membranas preparadas a 25°C foram secas em capela, usando o ar condicionado da sala como regulador da temperatura. Já para a reação conduzida a 40°C, os sistemas foram transferidos para uma estufa (Nova ética, Shaker incubadora 430 RDB).

Membranas de PVA reticuladas com ácido maleico foram preparadas e usadas como controle. Desta forma, as quantidades desejadas de reticulante foram adicionadas a uma solução de PVA que foi agitada magneticamente para dissolver o ácido carboxílico. As membranas foram secas em estufa Quimis a 100°C e tratadas termicamente em seguida, a 150°C por 30 minutos.

O preparo de filmes de PVA reticulados por glutaraldeído na presença de HCl também foi realizado, com o intuito de averiguar a efetividade do tratamento usando as condições propostas por VIDAL *et al.* (1999a) para estabilizar o PVA. Para isto, glutaraldeído e HCl foram adicionados à solução aquosa de PVA e a mistura foi homogeneizada. O sistema foi transferido em seguida para placas de Petri e as membranas foram secas a 25°C por cerca de 20 horas.

Todas as membranas foram armazenadas em dessecador à vácuo após o preparo para evitar absorção de água ou modificação de suas propriedades até que fossem devidamente caracterizadas e tivessem suas permeabilidades ao O₂ e ao N₂ determinadas.

5.3.3. Caracterização das membranas

A caracterização das membranas foi realizada através de ensaios de inchamento em água, testes de análise térmica, bem como espectroscopia no infravermelho. Para

determinação do grau de inchamento em água, foi usado o mesmo procedimento descrito no Capítulo 4 para as membranas integrais, ou seja, as membranas foram imersas em água a 40°C por 48 horas e a alteração na dimensão dos lados das amostras quadradas foi usada para mensurar o inchamento.

Análise térmica

A análise térmica foi realizada através de ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC, Perkin Elmer DSC7) e termogravimetria (TGA, Perkin Elmer TGA7). Na análise de DSC, cerca de 15 mg da membrana foram submetidos a uma razão de aquecimento de 10°C/min, de 30 a 250°C, sob atmosfera de nitrogênio a 25 mL/min. Foram realizados dois estágios de aquecimento, sendo que a temperatura de transição vítrea e a entalpia de fusão do segundo aquecimento foram considerados na análise.

Para a análise de TGA, aproximadamente 8 mg da membrana foram mantidos a 50°C por 1 minuto, seguido pelo aquecimento, a 10°C/min, até 600°C, sob atmosfera de N₂.

FTIR

A determinação da estrutura química dos filmes formados foi investigada através de ensaios de infravermelho (Perkin Elmer, 1720X). Os espectros foram determinados através de 20 varreduras, com resolução de 2 cm⁻¹ e permitiram identificar as alterações estruturais provocadas pela adição da proteína às membranas.

5.3.4. Testes de desempenho

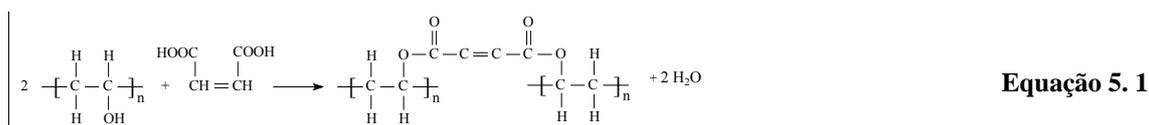
A permeabilidade ao oxigênio foi determinada tanto em ensaios em fase gasosa, usando o sistema padrão existente no laboratório, descrito no Anexo 2, quanto em fase líquida, por meio da célula de diálise, apresentada no Capítulo 4. Porém, para aumentar a resistência mecânica das membranas densas integrais de PVA, os filmes foram inseridos entre duas membranas de microfiltração de acetato de celulose (Millipore), com diâmetro médio de poros igual a 0,45 µm, antes do início dos ensaios.

5.4. Resultados e discussão

Nesta seção, são apresentados os resultados da reticulação do PVA tanto pelo ácido maleico, como pelo glutaraldeído com e sem a presença de HCl como catalisador. O objetivo foi comparar as propriedades obtidas nos diferentes tipos de tratamento e, conseqüentemente, avaliar a efetividade da reação entre o glutaraldeído e o PVA na ausência de ácidos minerais.

5.4.1. Reticulação com ácido maleico

O ácido maleico é um agente reticulante utilizado para estabilizar as membranas de PVA empregadas em pervaporação (HAN *et al.*, 2003). A estrutura do produto formado é apresentada na Equação 5. 1. Entretanto, para que a reação se complete, é necessário tratar termicamente os filmes a 150°C por 30 minutos. Como estas condições são bastante severas e provocariam a desnaturação de proteínas, a reticulação do PVA com o ácido maleico foi usada como sistema modelo, para comparar as propriedades obtidas pelo método convencional de reticulação com as das membranas modificadas pelo glutaraldeído. Foram preparadas membranas com razão molar entre o ácido maleico e a unidade monomérica do PVA iguais a 0,1 e a 0,2, com base em resultados anteriores do grupo de pesquisa (NÓBREGA *et al.*, 1988).



Foram obtidos filmes transparentes, homogêneos e com espessura média de 20 µm. Os resultados dos testes de inchamento em água líqüida são apresentados na Tabela 5. 1.

Tabela 5. 1: Inchamento em água das membranas de PVA reticuladas com ácido maleico.

Membrana*	Inchamento (%)
PVA	∞
Ácido maleico/PVA = 0,1	32 ± 3
Ácido maleico/PVA = 0,2	29 ± 2

* Razão entre ácido maleico e a unidade monomérica do PVA em mol/mol.

Observa-se que a reticulação com ácido maleico reduziu consideravelmente a solubilidade dos filmes em água. Membranas de PVA não modificadas apresentam

inchamento infinito, que corresponde à dissolução da membrana durante os ensaios. As membranas reticuladas, por outro lado, apresentam cerca de 30% de inchamento, sem grande alteração no valor em função do acréscimo de mais agente reticulante no meio. Os testes foram realizados em duplicata e os desvios foram inferiores a 10%.

As curvas de termogravimetria para as membranas de PVA reticuladas com ácido maleico são apresentadas na Figura 5. 3. Observa-se um aumento na estabilidade térmica dos filmes com o aumento da concentração do agente reticulante nas membranas, conforme evidenciado pelo aumento da temperatura em que a perda de massa do material se inicia. Além disso, o perfil de degradação foi alterado. O acréscimo de ácido maleico aos filmes diminuiu a hidrofiliçidade dos mesmos, reduzindo bastante as perdas de massa em temperaturas inferiores a 300°C. A segunda etapa de perda de massa da membrana não modificada, correspondente à formação de políenos, bem como a reticulação térmica intermediária são suprimidas, provavelmente devido à redução da quantidade dos grupos hidroxila adjacentes livres para promover a reação. Nota-se, ainda, que uma quantidade significativa de material, ou seja, mais de 10% em massa, permanece no recipiente de análise quando a amostra atinge os 600°C. Estas alterações no perfil de degradação confirmam a efetividade da reticulação do PVA pelo ácido maleico.

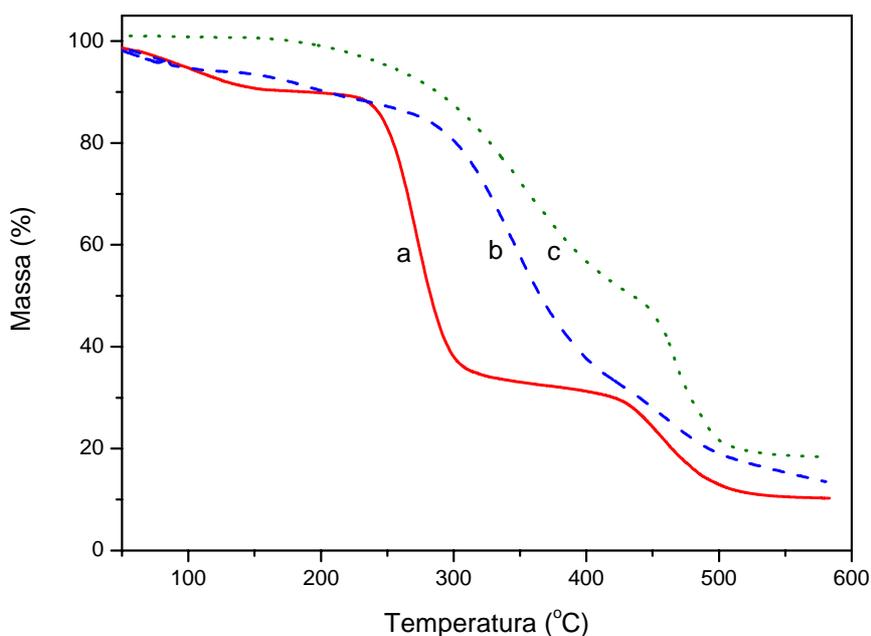


Figura 5. 3: Curvas da análise termogravimétrica das membranas de PVA reticuladas com ácido maleico. a - membrana de PVA; b - ácido maleico/PVA = 0,1; c - ácido maleico/PVA = 0,2.

As curvas de calorimetria exploratória diferencial são apresentadas na Figura 5. 4. Os perfis encontrados para as amostras reticuladas com ácido maleico foram comparados com os obtidos para a membrana não modificada. A ausência de cristalinidade das amostras indicou que a modificação dos filmes pelo ácido maleico foi efetiva. Desta forma, o tratamento com este ácido dicarboxílico provocou um distanciamento entre as cadeias do polímero, impedindo a formação de estruturas organizadas. Como conseqüência, a hidrofiliçidade das membranas foi reduzida e uma maior resistênciã dos filmes à degradação térmica foi alcançada, conforme esperado.

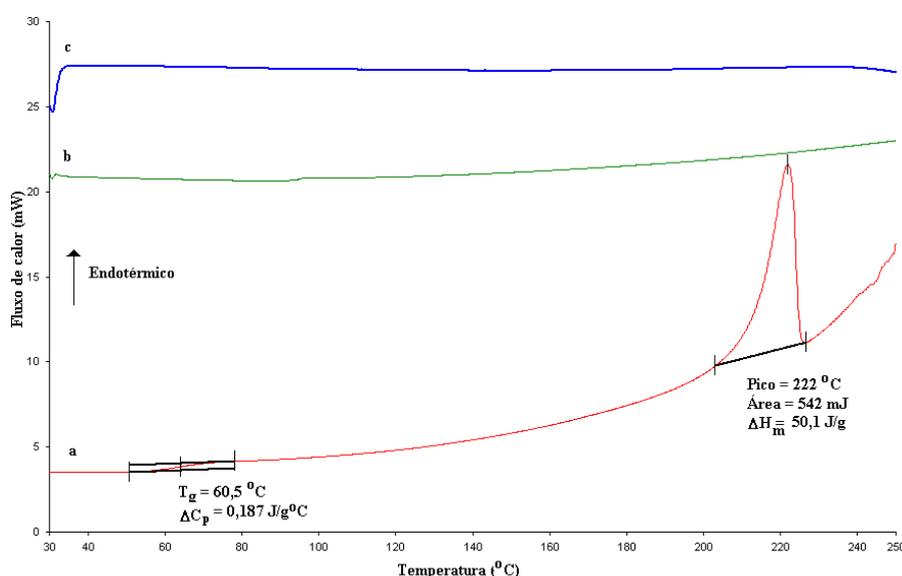


Figura 5. 4: Curvas de calorimetria exploratória diferencial das membranas de PVA reticuladas com ácido maleico. a - membrana de PVA; b – ácido maleico/PVA = 0,1; c - ácido maleico/PVA = 0,2.

Não foi possível determinar a temperatura de transição vítrea, T_g , das membranas reticuladas com ácido maleico. A realização de um estudo mais detalhado seria importante para averiguar o efeito da adição do reticulante na transição vítrea do polímero, mas esta investigação foge ao escopo deste trabalho.

As permeabilidades aos gases oxigênio e nitrogênio das membranas reticuladas foram investigadas usando o sistema padrão de permeação de gases. Entretanto, não foi possível mensurar esta propriedade, já que os valores foram abaixo do limite de detecção do equipamento, que é da ordem de 10^{-2} Barrer. Este resultado, porém, corrobora as observações de que a reticulação foi efetiva. Do ponto de vista estrutural, a

reticulação intermolecular diminuiu o volume livre do polímero e a mobilidade segmental o que ocasionou a redução da permeabilidade das moléculas através da membrana.

5.4.2. Reticulação com glutaraldeído catalisada pelo ácido clorídrico

A reticulação das membranas de PVA pelo glutaraldeído usando ácido clorídrico como catalisador foi baseada nos resultados promissores apresentados por Vidal e colaboradores (VIDAL *et al.*, 1999a). Os autores relataram que a hemoglobina foi imobilizada com sucesso nesta matriz polimérica, com manutenção da capacidade de degradação da bilirrubina.

O mecanismo proposto para a estabilização do PVA em meio aquoso pelo glutaraldeído é apresentado na Figura 5. 5, mostrando a formação da ligação acetal catalisada por ácidos minerais.

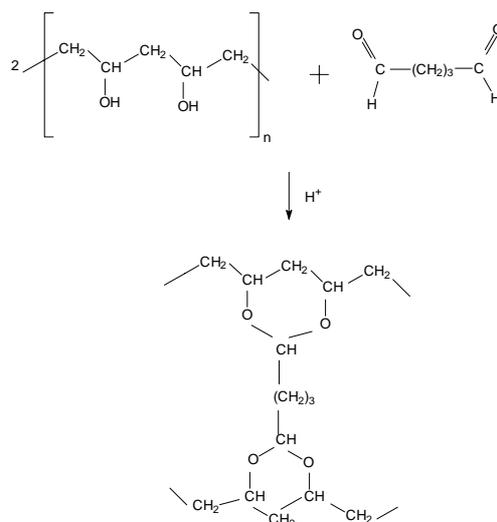


Figura 5. 5: Mecanismo proposto para a reação de acetalização do aldeído (VIDAL *et al.*, 1999a).

Nestes ensaios, foram reproduzidas as condições usadas pelos autores para a concentração de agente reticulante e de catalisador. A razão molar GA/PVA foi variada de 0,018 a 1,8 mol/mol, enquanto o teor de HCl foi estudado de 0,015 a 0,045 mol/L. Para concentrações de HCl maiores ou iguais a 0,030 mol/L e razão mássica GA/PVA maiores ou iguais a 0,13 mol/mol, observou-se uma intensa reticulação, o que reduziu a flexibilidade da membrana e impediu a realização de testes com o material.

Para as demais condições, foram obtidos filmes homogêneos, transparentes e com espessura média igual a 30 μm . O grau de inchamento em água dos filmes é apresentado na Tabela 5. 2. Observa-se a redução da hidrofiliicidade com o aumento da concentração de glutaraldeído nas membranas. Este resultado indica que os grupos hidroxila foram consumidos na reação, reduzindo a afinidade pela água.

Tabela 5. 2: Inchamento em água das membranas de PVA reticuladas por GA/HCl.

Membrana*	Inchamento (%)
PVA	∞
GA/PVA = 0,018	56 ± 8
GA/PVA = 0,035	29 ± 6

* A concentração de HCl foi de 0,015 mol/L. Razão entre GA e PVA em mol/mol.

Comparando-se os resultados de inchamento em água das membranas de PVA reticuladas com GA/HCl e com ácido maleico, observa-se que um inchamento de 30% é alcançado para concentrações menores do glutaraldeído, ou seja, para uma proporção molar de 0,035. Como não foram preparadas membranas com menores teores de ácido maleico, não é possível comparar diretamente os resultados, mas o fato de o aumento na quantidade do ácido orgânico não afetar significativamente o inchamento dos filmes indica que a densidade máxima de reticulação já foi alcançada. Portanto, concentrações relativamente baixas de glutaraldeído são capazes de promover uma alteração eficiente na hidrofiliicidade das membranas, o que justifica a utilização deste dialdeído em substituição ao ácido carboxílico.

As curvas de termogravimetria para as membranas reticuladas por GA na presença de HCl são apresentadas na Figura 5. 6. Houve uma melhoria na estabilidade térmica com o aumento da adição do dialdeído. Observou-se também a supressão da etapa de reticulação intermediária, observada para o PVA não modificado. Comparando estes resultados com os perfis de TGA para as amostras modificadas pelo ácido maleico, observa-se que o ácido orgânico possui desempenho ligeiramente superior ao dialdeído, já que os eventos de degradação ocorrem em temperaturas um pouco maiores.

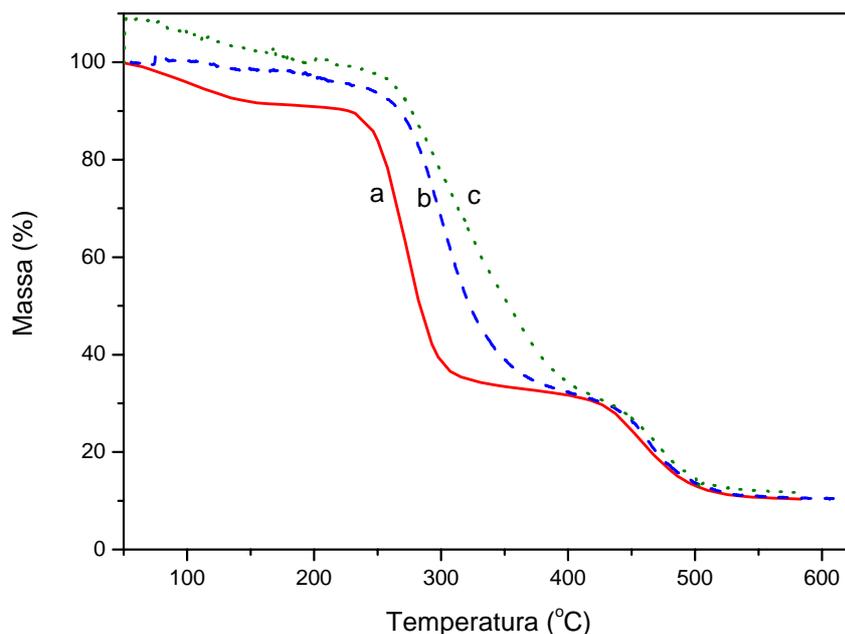


Figura 5. 6: Curvas da análise termogravimétrica das membranas de PVA reticuladas com GA/HCl. a - membrana de PVA; b – GA/PVA = 0,018 e [HCl] = 0,015 mol/L; c – GA/PVA = 0,035 e [HCl] = 0,015 mol/L.

As curvas de DSC são apresentadas na Figura 5. 7 e mostram que uma maior concentração de glutaraldeído é capaz de reduzir a cristalinidade do material como resultado do afastamento das cadeias (PARK *et al.*, 2001). Estas observações confirmam os dados de inchamento em água e evidenciam que para uma razão molar entre o GA e a unidade monomérica do PVA igual a 0,035 mol/mol, a densidade de reticulação alcançada é máxima. De modo semelhante ao tratamento com ácido maleico, não foi possível determinar a T_g das amostras.

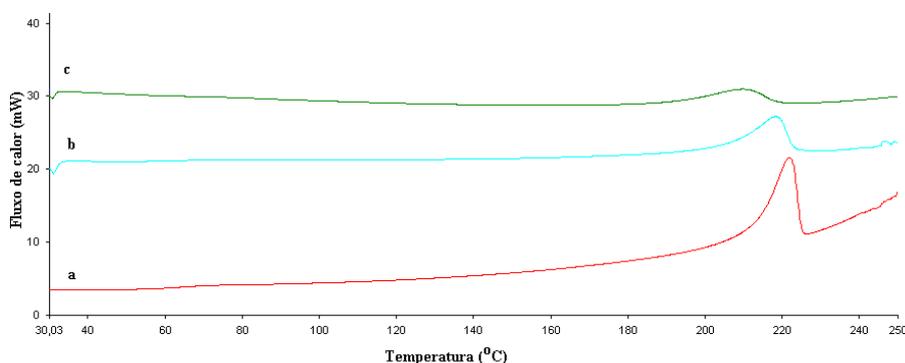


Figura 5. 7: Curvas de calorimetria exploratória diferencial das membranas de PVA reticuladas com GA/HCl. a - membrana de PVA; b – GA/PVA = 0,018 e [HCl] = 0,015 mol/L; c – GA/PVA = 0,035 e [HCl] = 0,015 mol/L.

Com o intuito de evitar a interferência da cristalinidade do polímero nos resultados, membranas com razão molar GA/PVA maiores que 0,035 mol/mol foram usadas nos testes de permeação de gases. A determinação da permeabilidade ao oxigênio e ao nitrogênio revelou uma enorme flutuação dos dados, conforme apresentado na Figura 5. 8. Para a amostra com razão GA/PVA de 0,044 mol/mol, não foi possível definir nenhuma tendência em relação à permeabilidade. Já para as membranas com GA/PVA de 0,088 mol/mol, o comportamento observado foi semelhante àquele obtido para as membranas de PVA reticuladas com etileno glicol, ou seja, um decréscimo da permeabilidade no primeiro dia, seguido por um aumento exponencial do transporte. Por outro lado, a seletividade foi mantida constante, mas com valores baixos, em torno de 1,5.

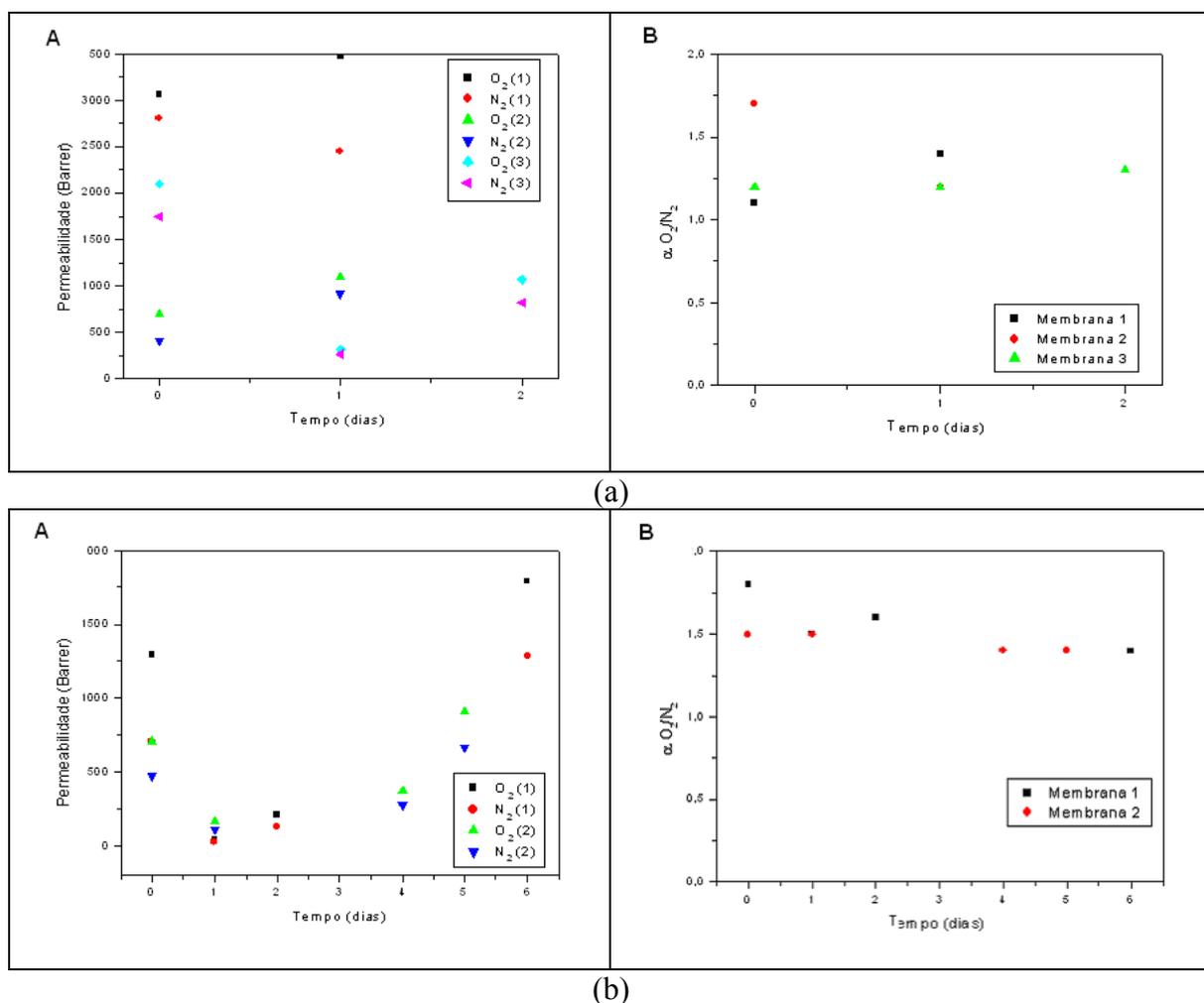


Figura 5. 8: Permeabilidade (A) e seletividade (B) das membranas de PVA reticuladas com glutaraldeído/HCl. (a) GA/PVA = 0,044 e [HCl] = 0,015 mol/L (b) GA/PVA = 0,088 e [HCl] = 0,015 mol/L.Os números 1, 2 e 3 correspondem às réplicas das membranas.

Acredita-se que este comportamento seja o resultado da plastificação das membranas pela água. A existência de umidade residual pode ter causado o aumento da taxa de transporte em algumas ordens de grandeza. De fato, a determinação da forma em que a água está presente nestes sistemas ainda é bastante estudada, visando esclarecer os mecanismos de permeação nestes géis inchados (WANG *et al.*, 2003, PING *et al.*, 2001, NGUYEN *et al.*, 1996). A baixa seletividade confirma a hipótese de plastificação, já que o nitrogênio passa a ser co-transportado com o oxigênio, reduzindo a seletividade intrínseca das membranas de PVA, que é de 3,3 (MULDER, 1996).

Os resultados obtidos indicaram a instabilidade das membranas face a permeação de gases e motivaram a investigação da taxa de permeação de oxigênio em fase aquosa, através de uma célula de diálise em etapas futuras.

Outro fator que merece destaque é a desativação das hemoproteínas em valores tão baixos de pH. Tentativas de sintetizar membranas contendo mioglobina revelaram perda da conformação nativa da proteína e aglomeração das biomoléculas em solução. Portanto, a síntese de membranas de PVA reticuladas por glutaraldeído na ausência de catalisadores ácidos mostrou-se importante e é apresentada a seguir.

5.4.3. Reticulação com glutaraldeído sem ácidos minerais

A estratégia usada para investigar a reação entre o PVA e o GA na ausência de catálise ácida baseou-se na avaliação dos efeitos da temperatura e da concentração de reticulante na membrana. O primeiro estágio da pesquisa consistiu em um estudo exploratório usando uma ampla faixa das variáveis para investigar se a reação podia se completar usando condições tão amenas. Os testes de inchamento dos filmes em água foram usados para inferir a respeito da densidade de reticulação alcançada. Os resultados são apresentados na Tabela 5. 3. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A espessura da membrana foi de 100 μm .

Vale destacar que a formação da membrana e a reticulação do polímero foram realizados simultaneamente e, portanto, o tempo da reação corresponde ao tempo total em que a solução foi evaporada da placa de petri. Os valores foram de 45, 110 e 170 horas para as membranas secas a 40, 25 e 10°C, respectivamente.

Tabela 5. 3: Inchamento em água para as membranas de PVA reticuladas com GA na ausência de catálise ácida.

Temperatura (°C)	Razão molar GA/PVA	Inchamento (%)
10	0,0044	∞
	0,044	∞
	0,44	∞
25	0,0044	> 300
	0,044	∞
	0,44	∞
40	0,0022	54 ± 6
	0,0044	44 ± 5
	0,013	53 ± 4
	0,044	∞
	0,44	∞
	0,88	∞
	1,8	∞

As membranas secas a 10°C foram solúveis em água, indicando que não houve reação entre o PVA e o GA. Este resultado provavelmente deve-se ao fato de que os reagentes não tinham energia de ativação suficiente para reagir em temperatura tão baixa. Antes mesmo da análise de inchamento, os filmes apresentaram elevado teor de água, conforme verificado por inspeção visual, o que sugere a formação de um gel físico.

O mesmo comportamento foi observado para os filmes preparados na temperatura ambiente, exceto para a amostra com razão molar GA/PVA igual a 0,0044, em que a membrana não apresentou solubilidade completa, mas o grau de inchamento ainda foi bastante elevado para a aplicação como matriz sólida para imobilização de biomoléculas.

Para o caso da reação conduzida a 40°C, a tendência observada a 25°C foi confirmada: baixas concentrações de GA levam a maiores densidades de reticulação. A existência de uma concentração de GA em que a densidade de reticulação atinge um valor máximo pode ser explicada pelo mecanismo da reação proposto na literatura (YEOM e LEE, 1996). Um esquema ilustrativo das estruturas formadas é apresentado na Figura 5. 9.

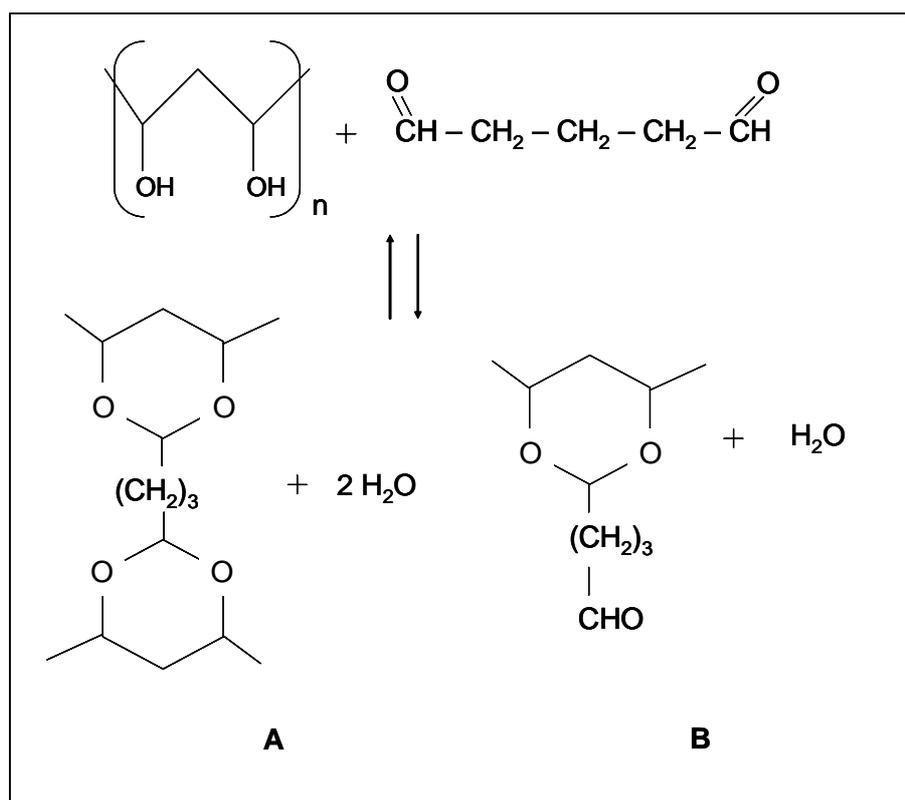


Figura 5. 9: Mecanismo proposto para a reação entre o PVA e o GA (YEOM e LEE, 1996).

Para baixas concentrações de GA, as poucas moléculas do dialdeído não são capazes de promover uma rede adequada para prevenir a solubilidade em água e a membrana apresenta elevado grau de inchamento. A adição de mais reticulante à solução polimérica favorece a reação em ambas as extremidades da molécula do dialdeído e reduz o volume livre do material, melhorando o desempenho do mesmo em fase aquosa. A maior densidade de reticulação foi observada para uma razão molar GA/PVA de 0,0044. Um aumento maior ainda na concentração de GA provoca a ramificação do PVA ao invés da reticulação, possivelmente porque a solução está mais viscosa que as demais, o que compromete a mobilidade das moléculas. Deve-se destacar que a reação é limitada pela difusividade dos reagentes em todos os sistemas investigados, pois a água é evaporada, aumentando a viscosidade da solução até a formação dos filmes. A ramificação do PVA aumenta o espaço entre as cadeias e provoca maior solubilidade em água, já que a capacidade de empacotamento diminui.

Outra hipótese, talvez mais plausível do que a ramificação do polímero sugerida por YEOM e LEE (1996), seria a reação entre moléculas do dialdeído, quando a concentração do mesmo no sistema é aumentada. A literatura tem registrado uma

grande variedade de produtos da oligomerização do glutaraldeído (MIGNEAULT *et al.*, 2004).

Os resultados de inchamento das membranas revelaram que a maior densidade de reticulação foi obtida para as amostras preparadas a 40°C e com razão molar GA/PVA de 0,0044. Estas condições são mais amenas que as usadas na literatura para estabilizar o PVA em meio aquoso (HYDER *et al.*, 2006, KIM *et al.*, 2004, DURMAZ-HILMIOLGLU *et al.*, 2001). Em relação à síntese de biossensores e membranas de transporte facilitado contendo biotransportadores, estes parâmetros operacionais podem preservar a conformação nativa das biomoléculas, pois a temperatura é semelhante à do corpo humano e a concentração de glutaraldeído é cerca de 10 vezes menor que as membranas contendo hemoglobina usadas para degradação de bilirrubina, por exemplo (VIDAL *et al.*, 1999a).

A análise térmica dos filmes reticulados pelo GA a 40°C foi realizada com o intuito de comparar as diferenças no arranjo das cadeias poliméricas. As curvas de termogravimetria são apresentadas na Figura 5. 10. Para a amostra de PVA não modificado, há três estágios principais de perda de massa: o primeiro, em torno de 100°C, é atribuído à liberação de compostos voláteis, principalmente água presente no material hidrofílico. O segundo estágio, a 270°C, corresponde à eliminação de ácido acético e formação de polienos, enquanto a terceira etapa, em torno de 450°C, corresponde à cisão da cadeia principal (MCNEILL, 1997).

As curvas de termogravimetria para as amostras com razão molar GA/PVA de 0,0044 e 0,044 mostram três principais estágios de degradação. Em comparação com o PVA não modificado, observa-se que o primeiro estágio de perda de massa foi diminuído consideravelmente, o que indica uma diminuição na hidroflicidade da membrana, com redução do teor de voláteis nos filmes. Também deve ser destacado que os eventos de degradação ocorrem em temperaturas maiores, ou seja, a 290 e a 470°C, indicando aumento na estabilidade térmica como resultado da reticulação pelo glutaraldeído.

O aumento na razão molar GA/PVA para 0,44 alterou o perfil da curva de termogravimetria. A perda de massa foi contínua e não houve diferença significativa entre os estágios de degradação. Para temperaturas maiores que 300°C, a estabilidade

foi ainda maior que as outras amostras com concentração de GA menor. Este comportamento pode ser atribuído à gelificação do PVA ramificado e à formação de outras estruturas, talvez resultantes da oligomerização do GA, já que o aspecto visual da amostra era opaco.

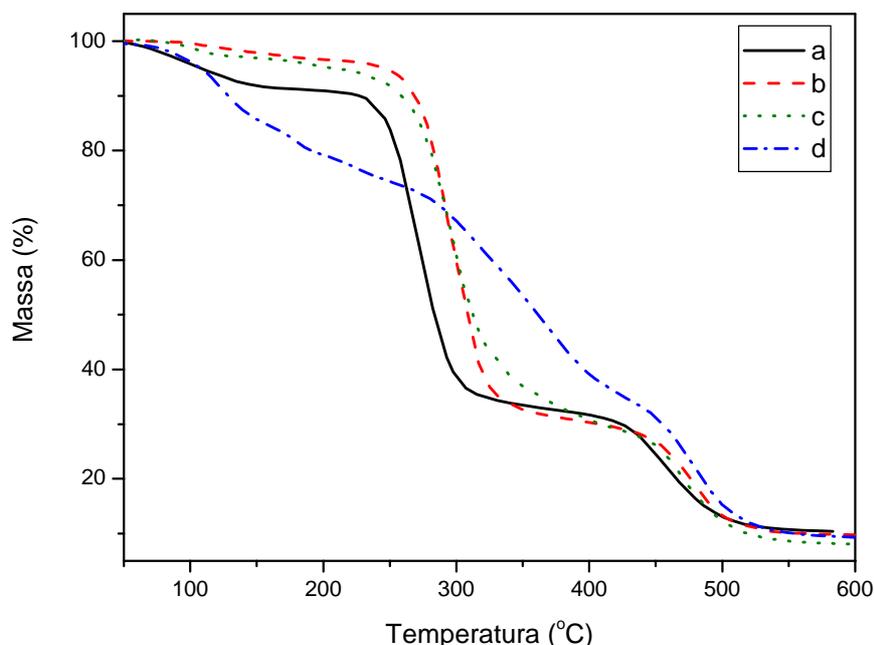


Figura 5. 10: Curvas de termogravimetria para as membranas de PVA reticuladas pelo GA a 40°C. a) PVA, b) GA/PVA = 0,0044, c) GA/PVA = 0,044, d) GA/PVA = 0,44.

As curvas de DSC das amostras de PVA reticuladas com GA a 40°C são apresentadas na Figura 5. 11. As amostras com razão GA/PVA de 0,0022 e 0,013 foram incluídas para investigar o comportamento dos filmes de forma mais detalhada. Houve uma redução no teor de cristalinidade das amostras como resultado do aumento da concentração do agente reticulante às membranas. Conforme mencionado anteriormente, esta observação está de acordo com o comportamento esperado, uma vez que a reticulação do PVA pelo GA promove o afastamento das cadeias poliméricas e reduz sua mobilidade segmental, impedindo o polímero de se organizar na unidade cristalina característica (PARK *et al.*, 2001).

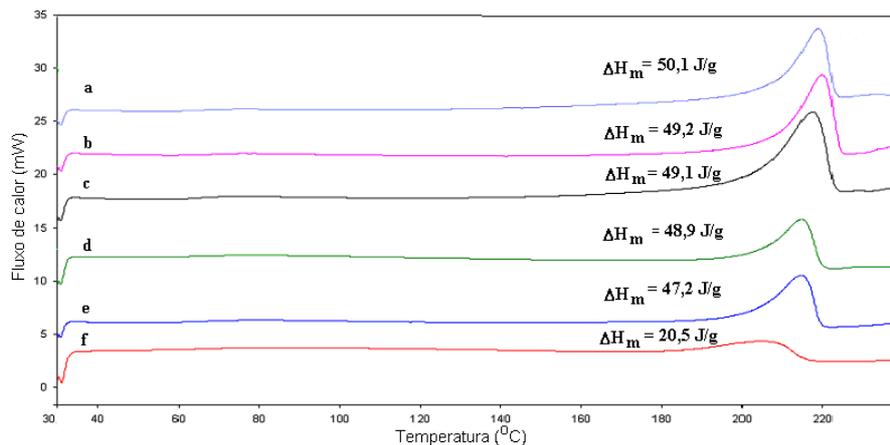


Figura 5. 11: Curvas de DSC para as membranas de PVA reticuladas pelo glutaraldeído a 40°C. a) PVA, b) GA/PVA = 0,0022, c) GA/PVA = 0,0044, d) GA/PVA = 0,0132, e) GA/PVA = 0,044, f) GA/PVA = 0,44.

Visando quantificar e comparar as modificações nas propriedades térmicas das membranas com a variação da concentração de glutaraldeído, o comportamento dos parâmetros de calorimetria exploratória diferencial com a razão molar GA/PVA foi analisado. Na Figura 5. 12, pode-se visualizar a variação da temperatura de transição vítrea, T_g , em função do teor de GA na membrana.

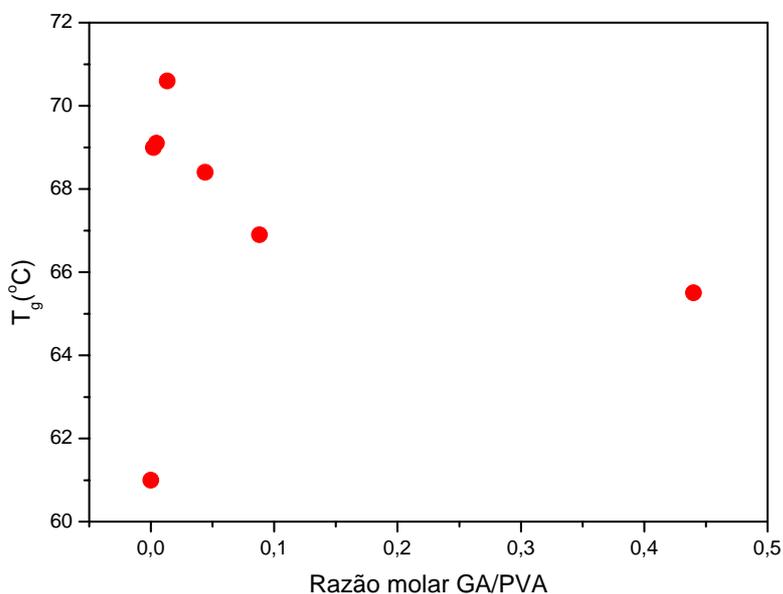


Figura 5. 12: Temperatura de transição vítrea em função do teor de GA para as membranas de PVA preparadas a 40°C.

A T_g alcança um valor máximo para a amostra com razão molar entre GA e PVA de 0,013. Nesta condição, o acréscimo é de 10°C em relação à membrana não modificada.

Este comportamento pode ser explicado pela perda de mobilidade segmental das cadeias do polímero devido à reação intermolecular com o glutaraldeído. Entretanto, para concentrações de GA maiores, o decréscimo na temperatura de transição vítrea reflete a ocorrência de outro mecanismo para a reação, que corresponde à ramificação do PVA ou à reação entre as moléculas do GA, o que impede o empacotamento das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, aumenta a distância entre as mesmas.

Os comportamentos da temperatura e da entalpia de fusão das membranas com o aumento da concentração de glutaraldeído são apresentados na Figura 5. 13. O aumento da concentração de glutaraldeído nos filmes diminuiu ambos os parâmetros, confirmando que a reação do PVA com o GA reduz a cristalinidade do polímero. Em outras palavras, a adição de GA à solução polimérica aumenta a distância entre as cadeias, quer o polímero seja reticulado ou ramificado, o que torna difícil a organização do PVA em estruturas cristalinas (PARK *et al.*, 2001). Estes resultados comprovam a análise de termogravimetria e o inchamento em água.

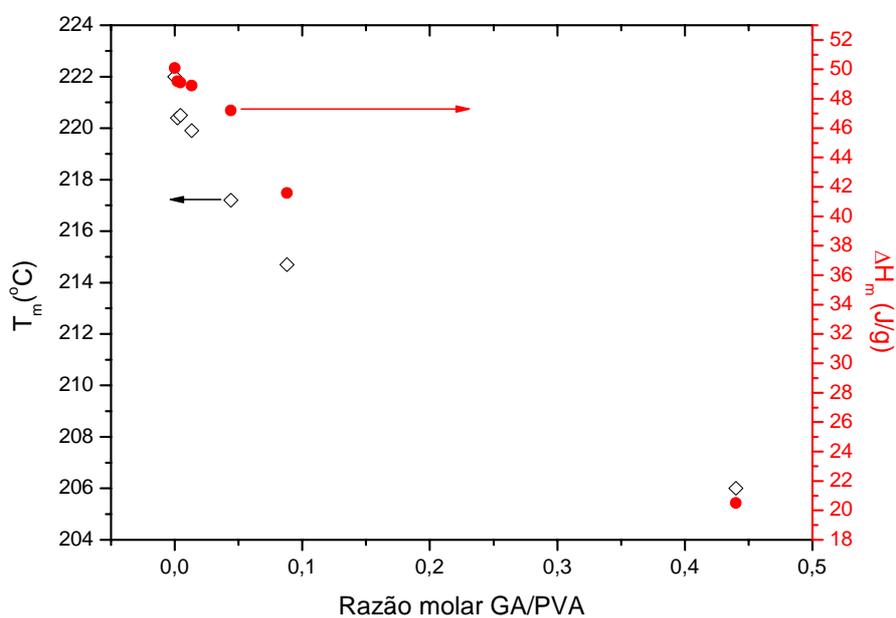


Figura 5. 13: Entalpia e temperatura de fusão em função do teor de GA para as membranas de PVA preparadas a 40°C.

As mudanças na estrutura química do PVA foram investigadas através de espectroscopia no infravermelho. As amostras foram lavadas em água destilada para remover algum

glutaraldeído não reagido presente na estrutura. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5. 14 e o perfil típico de absorção do PVA pode ser reconhecido: uma banda de absorção em torno de 3315 cm^{-1} relacionada ao estiramento do grupo hidroxila, dois picos, em 2940 e 2898 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento assimétrico e simétrico dos grupos metilênicos, respectivamente, e outra banda a 1090 cm^{-1} , atribuído ao estiramento da ligação C – O (XIAO *et al.*, 2006).

Uma análise quantitativa dos espectros de infravermelho foi conduzida para averiguar a efetividade da reticulação entre o PVA e o GA através da estrutura dos produtos formados. Desta forma, as absorbâncias das amostras a 3315 (grupos hidroxila), 1718 (grupos aldeído), e 1097 cm^{-1} (grupos acetal) foram tomadas e os quocientes entre estes valores e a absorção a 2940 cm^{-1} (grupos metilênicos) foram usados como indicativo da quantidade relativa destes grupos nas membranas.

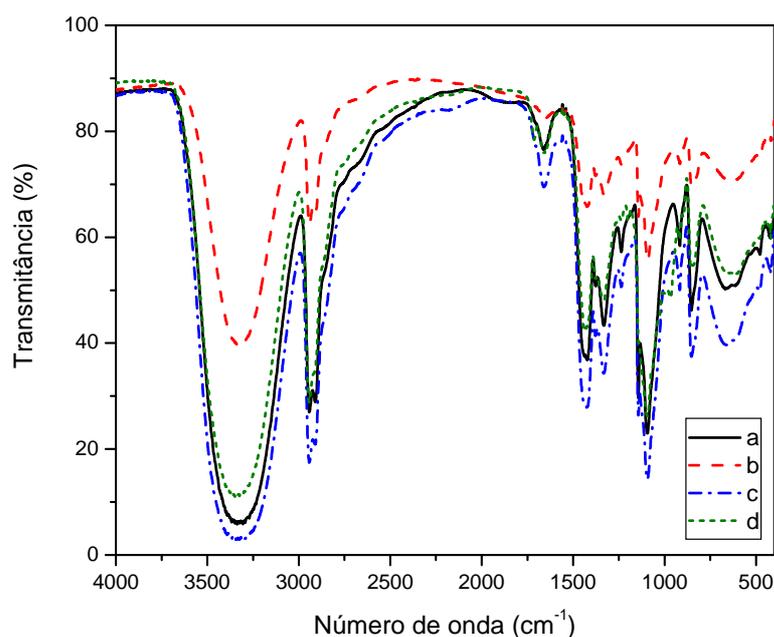


Figura 5. 14: Espectro no infravermelho das membranas de PVA reticuladas pelo glutaraldeído a 40°C . a) PVA não modificado, b) $0,0044$, c) $\text{GA/PVA} = 0,044$, d) $\text{GA/PVA} = 0,44$.

Na Figura 5. 15, são apresentados os valores da razão entre a absorção a 3315 e 2940 cm^{-1} em função do teor de glutaraldeído nos filmes. Observou-se um decréscimo na quantidade relativa de íons hidroxila para razão molar GA/PVA menor que $0,1$, conforme esperado, pois estes grupos são consumidos durante a reação de

reticulação entre o polímero e o dialdeído. Entretanto, a amostra com maior teor de glutaraldeído não apresentou a menor quantidade relativa de grupos hidroxila, indicando que outro tipo de reação ocorreu nesta amostra. Talvez a maior concentração do agente reticulante tenha favorecido a reação entre as moléculas do GA.

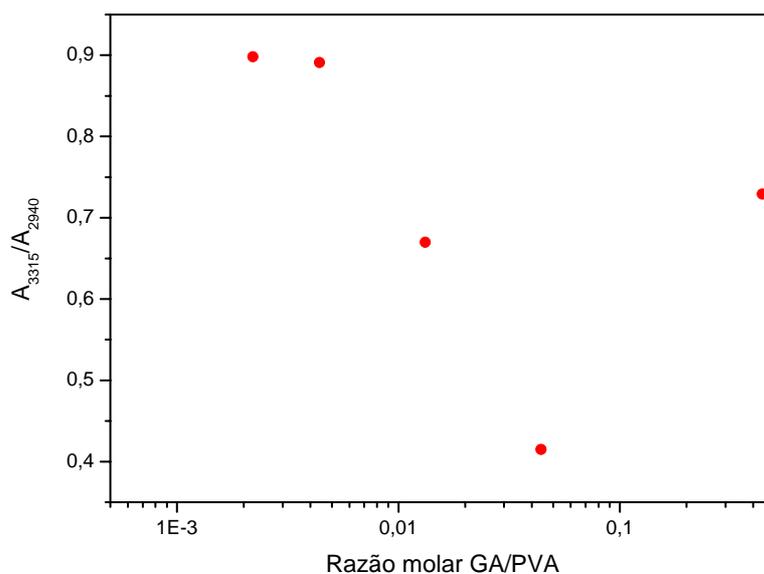


Figura 5. 15: Relação entre as absorvâncias dos grupos hidroxila e metilênicos, indicando a quantidade relativa de grupos hidroxila com o aumento da concentração de glutaraldeído nas membranas de PVA

O acompanhamento da quantidade relativa dos grupos aldeído com o aumento da adição de GA às membranas de PVA é apresentado na Figura 5. 16. Conforme esperado, a adição do dialdeído às membranas promove um aumento da concentração destes grupos até uma razão GA/PVA de 0,1. Observou-se que este acréscimo não foi linear de 0,0022 a 0,0044, indicando um consumo provável dos grupos $-CHO$ na outra extremidade da molécula, evidenciando a reticulação efetiva do polímero. Para valores maiores que 0,1, a diminuição da concentração de aldeídos livres deve estar ligada à polimerização do glutaraldeído, já que esta espécie é bastante reativa (MIGNEAULT *et al.*, 2004).

O monitoramento do teor relativo de grupos acetal com o acréscimo de glutaraldeído às membranas é apresentado na Figura 5. 17. Conforme esperado, a concentração

máxima foi obtida para a amostra com razão GA/PVA igual a 0,0044. Valores maiores do glutaraldeído provocam uma modificação no mecanismo da reação, favorecendo a reação entre as moléculas do dialdeído.

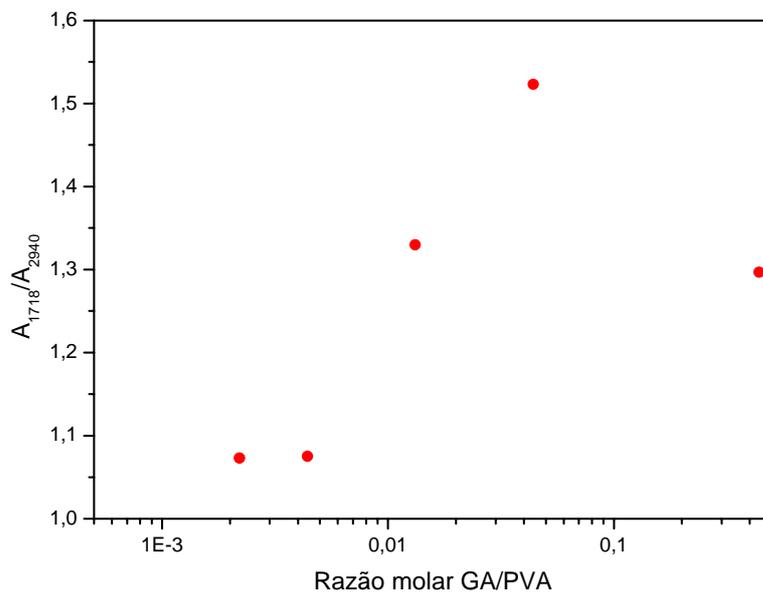


Figura 5. 16: Relação entre as absorvâncias dos grupos aldeído e metilênicos, indicando a quantidade relativa de grupos aldeído em função do aumento da concentração de reticulante nas membranas de PVA.

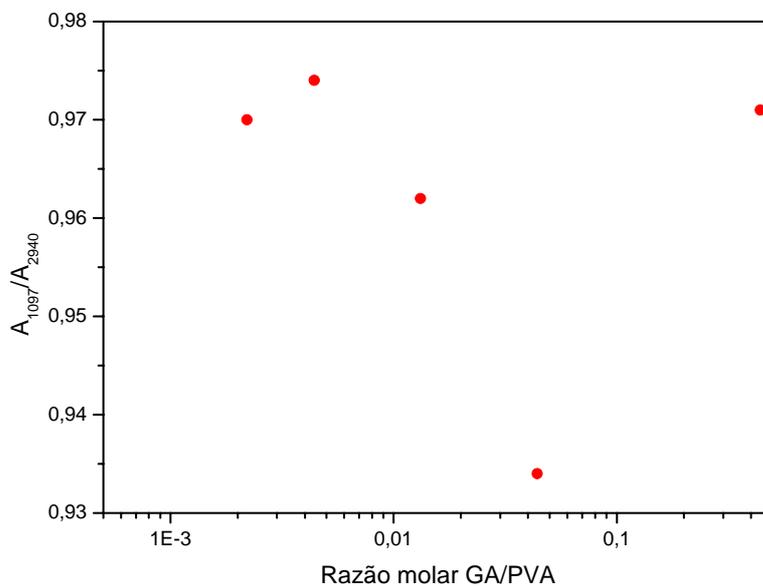


Figura 5. 17: Relação entre as absorvâncias dos grupos acetal e metilênicos, indicando a quantidade relativa de grupos acetal em função do aumento da concentração de glutaraldeído nas membranas de PVA.

Para a amostra com GA/PVA de 0,44, observa-se um comportamento divergente das demais, indicando que o mecanismo da reação neste sistema é outro. Uma investigação detalhada dos produtos formados para esta condição foge ao escopo deste estudo, principalmente porque a membrana produzida apresentou inchamento infinito em água.

Com o objetivo de caracterizar a permeabilidade dos filmes produzidos em relação ao oxigênio, testes de permeação em fase líquida foram conduzidos e os fluxos são apresentados na Tabela 5. 4. A amostra cuja razão GA/PVA é de 0,0044 foi selecionada para os testes, uma vez que apresentou o menor grau de inchamento em água. A espessura média dos filmes foi de 10 μm .

Tabela 5. 4: Fluxo de oxigênio em fase aquosa através das membranas de PVA.

Membrana*	Fluxo de O ₂ (kg/hm ²)
PVA	1,4 x 10 ⁻³
GA/PVA = 0,0044	5,1 x 10 ⁻⁴

* Razão entre GA e PVA em mol/mol.

Para a realização dos ensaios, as membranas de PVA foram inseridas entre dois suportes de microfiltração para evitar o rompimento das mesmas durante a homogeneização do sistema. As membranas de PVA não modificadas apresentaram aspecto de gel após os testes, já que apresentam solubilidade em água. Já para o filme reticulado, houve uma diminuição de 2,7 vezes no fluxo de oxigênio, indicando que o PVA foi efetivamente reticulado pelo glutaraldeído em pH de 6,2.

5.5. Conclusão

A investigação da reticulação do PVA por ácido maleico e glutaraldeído em diferentes condições operacionais revelou que as propriedades das membranas obtidas variam bastante. O ácido maleico promove a estabilização dos filmes em meio aquoso, com remoção da cristalinidade e aumento da resistência térmica. Entretanto, como é necessário tratar as membranas a 150°C por 30 minutos, condições mais amenas de reticulação foram pesquisadas.

A modificação do PVA pelo glutaraldeído na presença de HCl revelou decréscimo da hidrofiliabilidade e cristalinidade dos filmes, mas os hidrogéis formados apresentaram pequena estabilidade em testes de permeação de gases, muito provavelmente devido ao papel plastificante da água.

Por outro lado, a reação entre o PVA e o GA na ausência de catálise ácida foi alcançada. As membranas preparadas a 40°C, com pH de 6,2 e razão molar GA/PVA de 0,0044 apresentaram um inchamento em água de 44%. A adição de mais moléculas de glutaraldeído favorece a ramificação das cadeias do polímero, aumentando a solubilidade dos filmes em água devido à dificuldade de empacotamento das cadeias. Os ensaios de análise térmica mostraram um aumento na estabilidade térmica das membranas e uma diminuição da cristalinidade do polímero como resultado da reticulação. O uso destas condições torna possível a fixação de biomoléculas no PVA visando a síntese de biossensores e membranas de transporte facilitado contendo biotransportadores.

5.6. Referências bibliográficas

- ALLINGER, N. N., CAVA, M. P., JONGH, D. G., *et al.*, 1978, *Química Orgânica*, Rio de Janeiro, Guanabara Dois.
- BACHTSI, A. R., BOUTRIS, C. J., KIPARISSIDES, C., 1996, “Production of oil-containing crosslinked poly(vinyl alcohol) microcapsules by phase separation: effect of process parameters on the capsule size distribution”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 60, n. 1 (Apr), pp. 9-20.
- BOURGES, J. L., BLOQUEL, C., THOMAS, A., *et al.*, 2006, “Intraocular implants for extended drug delivery: therapeutic applications”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, n. 11 (Nov), pp. 1182-1202.
- BUEHLER, P. W., BOYKINS, R. A., JIA, Y., *et al.*, 2005, “Structural and functional characterization of glutaraldehyde-polymerized bovine hemoglobin and its isolated fractions”, *Analytical Chemistry*, v. 77, n. 11 (Jun), pp. 3466-3478.
- CASCONE, M. G., ZHU, Z., BORSELLI, F., 2002a, “Poly(vinyl alcohol) hydrogels as hydrophilic matrices for the release of lipophilic drugs loaded in PLGA nanoparticles”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 13, n. 1 (Jan), pp. 29-32.
- CASCONE, M. G., POT, P. M., LAZZERI, L., 2002b, “Release of dexamethasone from PLGA nanoparticles entrapped into dextran/poly(vinyl alcohol) hydrogels”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 13, n. 3 (Mar), pp. 265-269.
- DURMAZ-HILMIOGLU, N., YILDIRIM, A. E., SAKAOGLU, A. S. *et al.*, 2001, “Acetic acid dehydration by pervaporation”, *Chemical Engineering and Processing*, 40, n. 3 (May), pp. 263-267.

- FERRAZ, H. C., DUARTE, L. T., DI LUCCIO, M., *et al.*, 2007, “Recent achievements in facilitated transport membranes for separation processes”, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 24, n. 1 (Jan-Mar), pp. 101 – 118.
- GUO, R., HU, C., LI, B., *et al.*, 2007, “Pervaporation separation of ethylene glycol/water mixtures through surface crosslinked PVA membranes: coupling effect and separation performance analysis”, *Journal of Membrane Science*, v. 298, n. 1-2 (Feb), pp. 191-198.
- HAN, B., LI, J., CHEN, C., *et al.*, 2003, “Effects of degree of formaldehyde acetal treatment and maleic acid crosslinking on solubility and diffusivity of water in PVA membranes”, *Chemical Engineering Research & Design*, v. 81, n. A10 (Nov), pp. 1385-1392.
- HYDER, M. N., HUANG, R. Y. M., CHEN, P., 2006, “Correlation of physicochemical characteristics with pervaporation performance of poly(vinyl alcohol) membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 283, n. 1-2 (Oct), pp. 281-290.
- KIM, M. J., PARK, Y. I., YOUM, K. H. *et al.*, 2004, “Gas permeation through water-swollen polysaccharide/poly(vinyl alcohol) membranes”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 91, n. 5 (Mar), pp. 3225-3232.
- LIM, L. Y., WAN, S. C., 1994, “The effect of plasticizers on the properties of polyvinyl alcohol films”, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 20, n. 6, pp. 1007-1020.
- LOZINSKY, V. I., GALAEV, I. Y., PLIEVA, F. M., *et al.*, 2003, “Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest”, *Trends in Biotechnology*, v. 21, n. 10 (Oct), 445-461.
- LOZINSKY, V. I., PLIEVA, F. M., 1998, “Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, n. 3-4 (Aug), pp. 227-242.
- MCNEILL, I. C., 1997, “Thermal degradation mechanisms of some addition polymers and copolymers”, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 40-41, (May), pp. 21-41.
- MIGNEAULT, I., DARTIGUENAVE, C., BERTRAND, M. J., *et al.*, 2004, “Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking”, *BioTechniques*, v. 37, n. 5 (Nov), pp. 790-802.
- MULDER, M., 1996, *Basic Principles of Membrane Technology*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- NGUYEN, Q. T., FAVRE, E., PING, Z. H., *et al.*, 1996, “Clustering of solvents in membrane transport properties”, *Journal of Membrane Science*, v. 113, n. 1 (May), pp. 137-150.
- NOBREGA, R., HABERT, A. C., GARCIA, M. E. F., *et al.*, 1988, “Separation of ethanol/water mixtures by pervaporation through polyvinylalcohol membranes”. In: *Proceedings of Third International Conference on Pervaporation Processes in the Chemical Industry*, pp. 326-337, Nancy, Sep.
- PARK, J. K., CHANG, H. N., 2000, “Microencapsulation of microbial cells”, *Biotechnology Advances*, v. 18, n. 4 (Jul), pp. 303-319.

- PARK, Y. I., LEE, K. H., 2001, "Preparation of water-swollen hydrogel membranes for gas separation", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 80, n. 10 (Jun), pp. 1785-1791.
- PARK, J. S., PARK, J. W., RUCKENSTEIN, E., 2001, "On the viscoelastic properties of poly(vinyl alcohol) and chemically crosslinked poly(vinyl alcohol)", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 82, n. 7 (Nov), pp. 1816-1823.
- PING, Z. H., NGUYEN, Q.T., CHEN, S. M., *et al.*, 2001, "States of water in different hydrophilic polymers – DSC and FTIR studies", *Polymer*, v. 42, n. 20 (Sep), pp. 8461-8467.
- SEHITOGULLARI, A., USLAM, A. H., 2002, "Preparation of a potentiometric immobilized urease electrode and urea determination in serum", *Talanta*, v. 57, n. 6 (Jul), pp. 1039-1044.
- SHAO, P., HUANG, R. Y. M., 2007, "Polymeric membrane pervaporation", *Journal of Membrane Science*, v. 287, n. 2 (Jan), pp. 162-179.
- TOYOSHIMA, K., 1973, "General properties of polyvinyl alcohol in relation to its applications". In: Finch, C. A. (Ed.), *Polyvinyl alcohol – Properties and applications*, chapter 2 and 14, London, John Wiley & Sons.
- VIDAL, M. M. B., GIL, M. H., DELGADILLO, I., *et al.*, 1999a, "Swelling and thermal properties of poly(vinyl alcohol) containing hemoglobin membranes", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 14, n. 3 (May), pp. 243-257.
- VIDAL, M. M. B., GIL, M. H., DELGADILLO, I., *et al.*, 1999b, "Study of the thermal stability and enzymatic activity of an immobilized enzymatic system for the bilirubin oxidation", *Biomaterials*, v. 20, n. 8 (Apr), pp. 757-763.
- VIDAL, M. M., DELGADILLO, I., GIL, M. H. *et al.*, 1996, "Study of an enzyme coupled system for the development of fibre optical bilirubin sensors", *Biosensors & Bioelectronics*, v. 11, n. 4, pp. 347-354.
- WANG, Y., HSIEH, Y. L., 2008, "Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes", *Journal of Membrane Science*, v. 309, n. 1-2 (Feb), pp. 73-81.
- WANG, R., WANG, Q., LI, L., 2003, "Evaporation behaviour of water and its plasticizing effect in modified poly(vinyl alcohol) systems", *Polymer International*, v. 52, n. 12 (Dec), pp. 1820-1826.
- XIAO, S., HUANG, R. Y. M., FENG, X., 2006, "Preparation and properties of trimesoyl chloride crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes for pervaporation dehydration of isopropanol", *Journal of Membrane Science*, v. 286, n. 1-2 (Dec), pp. 245-254.
- XU, G. G., YANG, C. Q., DENG, Y., 2004, "Combination of bifunctional aldehydes and poly(vinyl alcohol) as the crosslinking systems to improve paper wet strength", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 93, n. 4 (Aug), pp. 1673-1680.
- YEOM, C. K., LEE, K. H., 1996, "Pervaporation separation of water-acetic acid mixtures through poly(vinyl alcohol) membranes crosslinked with glutaraldehyde", *Journal of Membrane Science*, v. 109, n. 2 (Jan), pp. 257-265.
- ZOU, J., HO, W. S. W., 2006, "CO₂-selective polymeric membranes containing amines in crosslinked poly(vinyl alcohol)", *Journal of Membrane Science*, v. 286, n. 1-2 (Dec), pp. 310-321.

Capítulo 6:

Imobilização da mioglobina e da hemoglobina em poli(álcool vinílico) através da reticulação com glutaraldeído

Neste capítulo, a imobilização da mioglobina e da hemoglobina em filmes densos de PVA através da reação com glutaraldeído é investigada. A incorporação destes biotransportadores em matrizes sólidas tem como objetivo estabilizar o sistema, além de permitir o uso mais racional das proteínas, que são produtos de alto valor agregado. Durante a etapa de síntese das membranas, as concentrações do dialdeído e do transportador foram estudadas, enquanto os efeitos do pH e da temperatura na afinidade entre o par mioglobina/oxigênio foram avaliados em testes de permeação de oxigênio em fase líquida. Os resultados indicaram que as proteínas foram efetivamente retidas na matriz polimérica, com manutenção da estrutura nativa. Observou-se um aumento da afinidade entre o transportador e a espécie de interesse, que foi atribuído à reação com o glutaraldeído e o PVA. O transporte facilitado de oxigênio foi verificado para os filmes sem reticulante, com fator de facilitação igual a 3.

6.1. Introdução

O oxigênio molecular consiste em uma matéria-prima para diversos processos, como os metalúrgicos, químicos, bioquímicos, além de aplicações mais nobres na área médica. A separação de oxigênio do ar atmosférico requer o uso de uma grande quantidade de energia para promover a destilação criogênica. Esta tecnologia é bastante eficiente e desenvolvida, de modo que poucas melhorias são esperadas para alcançar uma economia energética significativa. Assim, a pesquisa por métodos alternativos para a obtenção de oxigênio puro ou ar enriquecido em oxigênio tem motivado os cientistas, principalmente devido à demanda por este insumo (BAKER, 2002).

A necessidade de suprimento de oxigênio de modo regular e específico remete aos organismos aeróbicos, em que estas propriedades foram alcançadas graças ao

desenvolvimento de um sistema circulatório e à aquisição de moléculas transportadoras de O₂ (VOET *et al.*, 2000). De fato, a eficiência e harmonia observadas nos mecanismos biológicos têm inspirado os pesquisadores a fim de aumentar o desempenho de processos. Em relação ao transporte de oxigênio, a procura por substitutos do sangue, expressão erroneamente atribuída a substâncias capazes de aumentar a taxa de fornecimento de oxigênio, sem considerar as inúmeras outras funções desempenhadas pelo sangue, impulsionou as pesquisas a respeito da estrutura e da dinâmica molecular das hemoproteínas, sobretudo da hemoglobina. Como resultado, as principais classes de sangue artificial baseiam-se em compostos organofluorados, em que a solubilidade do oxigênio é elevada, e derivados da hemoglobina, explorando a engenharia bioquímica da natureza na evolução de espécies para garantir a ligação reversível com o O₂ (CHANG, 1993).

Embora a hemoglobina se configure como o substituto natural do sangue, tendo em vista o conhecimento adquirido ao longo do tempo em relação a sua estrutura, propriedades e mecanismo de complexação e descomplexação com o oxigênio molecular, aliada à possibilidade de síntese em grande escala por meio da tecnologia recombinante, a utilização da proteína fora dos eritrócitos é bastante tóxica ao organismo, especialmente para os rins. Fora dos glóbulos vermelhos, o tetrâmero se dissocia em dímeros $\alpha\beta$, capazes de permear através dos rins, o que causa inúmeros problemas, como a obstrução dos túbulos renais e modificação da pressão oncótica. Além disso, a proteína livre dos eritrócitos possui afinidade muito maior pelo oxigênio, o que inviabiliza a etapa de descomplexação, especialmente na ausência de efetores alostéricos como o 2,3-difosfoglicerato, no caso da hemoglobina humana (RIESS, 2001).

Como alternativa, a hemoglobina tem sido modificada para aplicações como sangue artificial. Os métodos empregados são a reticulação e o encapsulamento. No encapsulamento, as moléculas de proteína são aprisionadas em vesículas ou lipossomas fosfolipídicos (ATOJI *et al.*, 2006) ou em cápsulas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis (ZHAO *et al.*, 2007). Já a reticulação pode ser subdividida em polimerização – que, na realidade consiste na formação de oligômeros—, em que agentes bifuncionais são usados para promover a ligação entre até 5 moléculas da proteína, hemoglobina conjugada, em que a ligação é feita em polímeros, e a

hemoglobina reticulada intramolecularmente (RIESS, 2001), conforme esquematizado na Figura 6. 1.

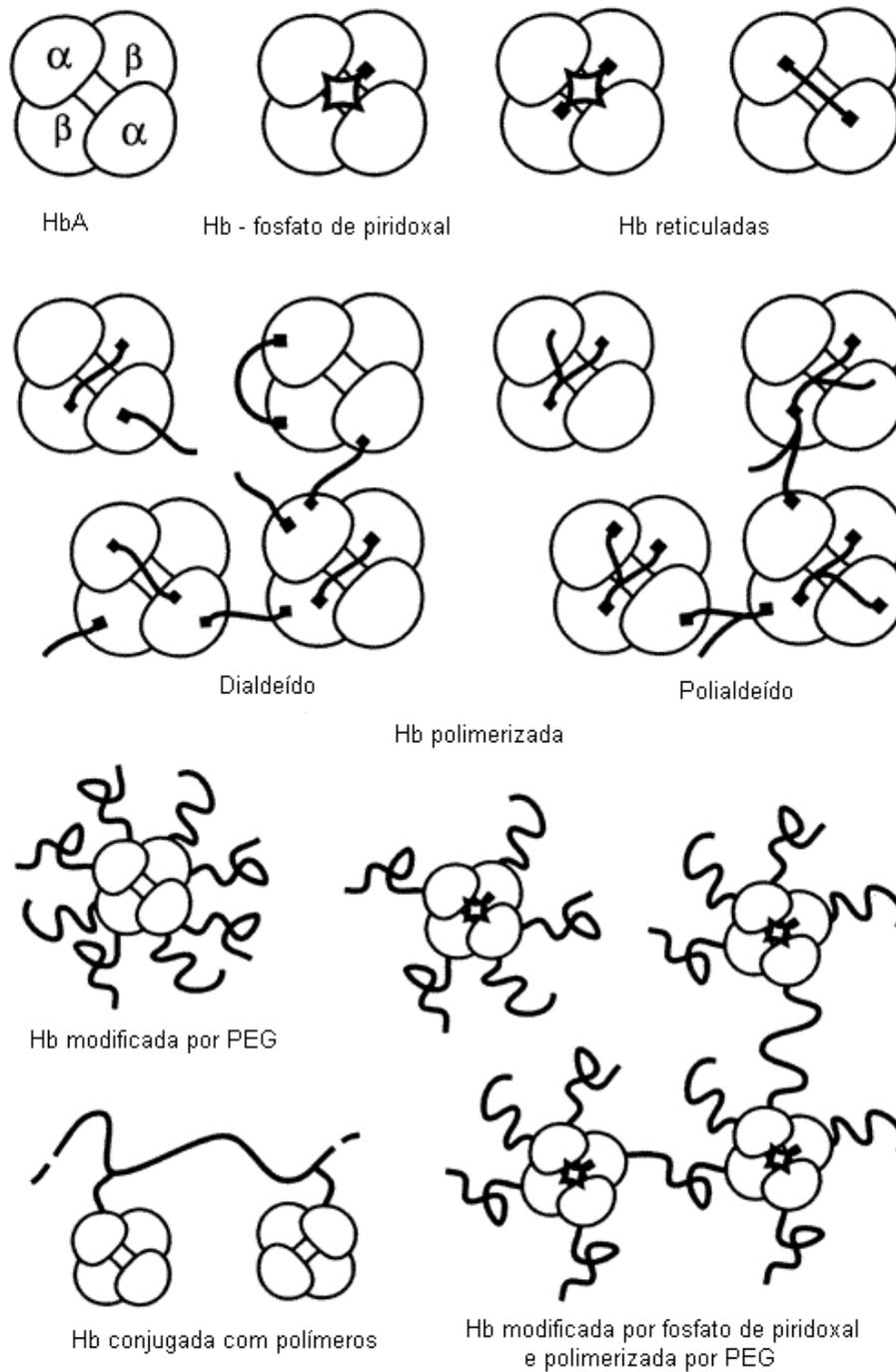


Figura 6. 1: Principais modificações efetuadas na hemoglobina para utilização como sangue artificial (RIESS, 2001).

Hemopure e *PolyHeme* são nomes comerciais de substitutos do sangue desenvolvidos a partir da reação de hemoglobinas bovina e humana com o glutaraldeído. Os fabricantes não revelam detalhes do procedimento utilizado para a síntese destes produtos, que já se

encontram em fase de testes clínicos pelas agências reguladoras (RIESS, 2001). Entretanto, a necessidade de avaliar as modificações decorrentes da oligomerização da proteína tem estimulado as pesquisas a respeito da reação entre a hemoglobina e o glutaraldeído (BUEHLER *et al.*, 2005, EIKE e PALMER, 2004, ALAYASH *et al.*, 2001). A julgar pela relevância e abrangência da aplicação do sangue artificial e o estágio atual das pesquisas, pode-se inferir que a aprovação formal pelos órgãos responsáveis dos transportadores de oxigênio baseados em hemoglobina ainda demandará alguns anos.

Vale destacar, porém, que a utilização do conhecimento adquirido no desenvolvimento de substitutos do sangue pode ser realizada em outras áreas que não requeiram a observação de tantas restrições, como no desenvolvimento de guelras artificiais. Estes dispositivos devem ser compactos e capazes de fornecer oxigênio proveniente da água e eliminar CO₂ do ar de forma rápida.

Inicialmente, AYRES (1966) e BODEL (1967) propuseram o uso de borracha de silicone como material da membrana. YANG e CUSSLER (1989) conseguiram manter animais de pequeno porte por alguns dias utilizando fibras ocas microporosas de polipropileno para favorecer as trocas gasosas. Entretanto, os próprios autores relataram a dificuldade de manter um mergulhador com suprimento adequado de oxigênio utilizando os módulos disponíveis.

A adição de transportadores de oxigênio às membranas foi investigada para aumentar a seletividade da permeação. Visando estabilizar as membranas líquidas suportadas, BONAVENTURA e BONAVENTURA (1982) patentearam um método de imobilização da hemoglobina em matrizes de poliuretano hidrofílicizado. A afinidade do biotransportador pelo oxigênio foi regulada através de mudanças no pH, que tornaram bastante trabalhosa a etapa de descomplexação. Mais recentemente, Nagase e colaboradores têm avaliado o uso de soluções concentradas de hemoglobina para a aplicação em guelras artificiais. Nestes sistemas, a afinidade da proteína pelo oxigênio vem sendo controlada pela adição de agentes alostéricos, como o inositol hexafosfato, IHP, bem como variações no pH e na temperatura das soluções. Os testes experimentais indicam que a redução do pH, conforme apresentado na Figura 6. 2, e a elevação da temperatura, cujo comportamento é ilustrado na Figura 6. 3, favorecem a liberação de

oxigênio da oxihemoglobina, com deslocamento da curva de saturação do soluto para a direita (NAGASE *et al.*, 2002).

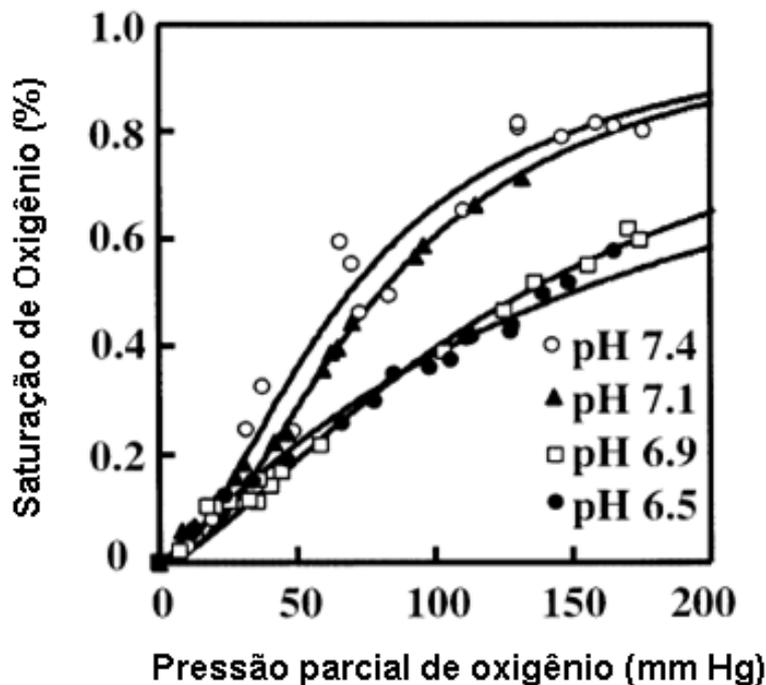


Figura 6. 2: Efeito da variação do pH na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (NAGASE *et al.*, 2002).

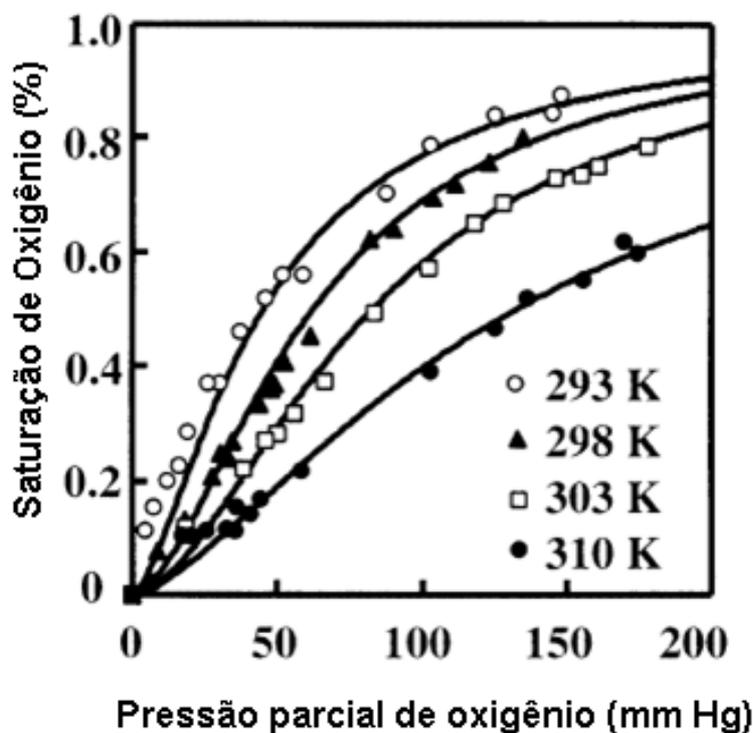


Figura 6. 3: Efeito da variação da temperatura na curva de dissociação do oxigênio molecular da hemoglobina (NAGASE *et al.*, 2002).

Como a temperatura mostrou-se mais efetiva no controle da afinidade entre a hemoglobina e o oxigênio, dada a maior amplitude em que sua variação não é deletéria à estrutura do biotransportador, as etapas de complexação e descomplexação foram realizadas a 20 e 37°C, ou seja, 293 e 310 K, respectivamente, utilizando a montagem experimental ilustrada na Figura 6. 4. O fator de facilitação observado para a etapa de complexação foi de 3, enquanto na descomplexação foi igual a 16 (NAGASE *et al.*, 2003).

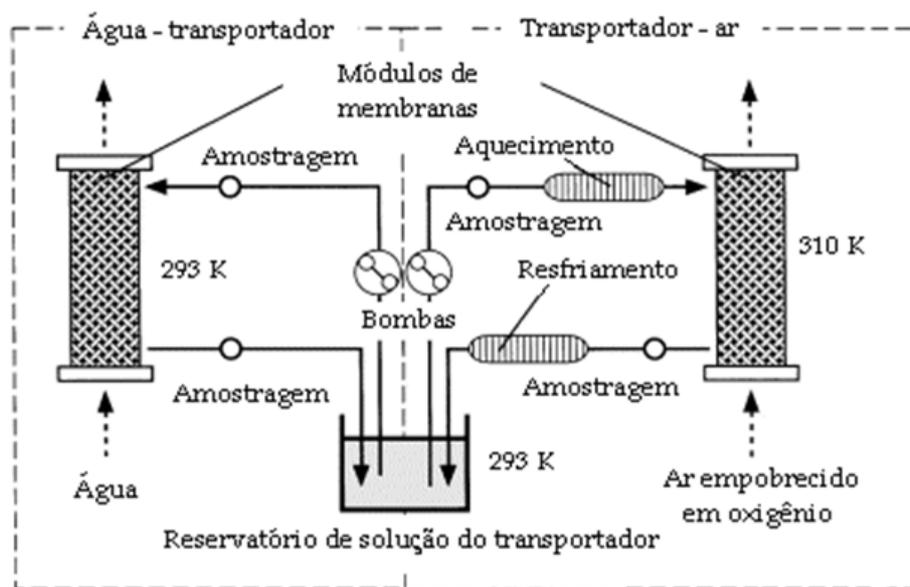


Figura 6. 4: Esquema da montagem experimental utilizada nos testes de guelras artificiais utilizando soluções de hemoglobina concentrada como transportador de oxigênio (MATSUDA *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos foram animadores, mas a utilização destes dispositivos para manter o suprimento de oxigênio necessário a um homem adulto requer uma área de troca de 64 m² (NAGASE *et al.*, 2003). Além disso, o uso de módulos miniaturizados compostos por fibras ocas de polipropileno recobertas por silicone reflete o elevado valor agregado da hemoglobina, bem como sua instabilidade em relação à autoxidação, evidenciando a inviabilidade comercial destes sistemas atualmente.

Tendo em vista a necessidade de conhecimento dos efeitos da oligomerização da hemoglobina pelo glutaraldeído para o desenvolvimento de substitutos do sangue e da determinação das condições operacionais que modifiquem a afinidade da proteína pelo

oxigênio, observa-se que a síntese de membranas de transporte facilitado utilizando biotransportadores de O₂ é um tema de pesquisa atual e relevante, que pode trazer benefícios diretos a outras áreas de aplicação.

6.2. Objetivo

O objetivo desta etapa do trabalho foi estudar a imobilização da mioglobina e da hemoglobina em filmes de poli(álcool vinílico), via reação com o glutaraldeído, para a síntese de membranas de transporte facilitado de oxigênio. A incorporação destes biotransportadores em matrizes sólidas apresenta a vantagem de propiciar uma utilização mais racional das proteínas através do preparo de filmes pouco espessos, o que reduz consideravelmente a quantidade de transportador requerida. Por outro lado, a instabilidade associada à evaporação do solvente das membranas líquidas é solucionada nesta nova configuração. Além disso, o uso da proteína imobilizada em um suporte sólido permite a realização das etapas de complexação e descomplexação em um único estágio, tornando o sistema mais compacto.

As variáveis investigadas na etapa de síntese das membranas foram a concentração e o tipo do biotransportador, bem como o teor de glutaraldeído, usado tanto para promover a reticulação do poli(álcool vinílico), como para efetuar a ligação entre a proteína e a matriz polimérica. Durante a etapa de permeação, avaliou-se os efeitos do pH da alimentação e do permeado e da temperatura do sistema na afinidade entre o par transportador/soluto, visando maximizar a eficiência da separação. Curvas de dissociação do oxigênio da mioglobina imobilizada em PVA foram determinadas com o objetivo de inferir a respeito de possíveis modificações nas propriedades da mioglobina provenientes da reação com o glutaraldeído.

6.3. Materiais e métodos

6.3.1 Materiais

Os reagentes usados foram o poli(álcool vinílico), PVA (Aldrich, com massa molar média entre 85.000 e 146.000 Da, 99% hidrolisado), glutaraldeído, GA (Aldrich, solução 50% em massa), mioglobina equina, Mb (Aldrich, teor mínimo de 90%) e

hemoglobina de sangue bovino, Hb (Fluka, teor mínimo 95%). Em todos os testes, utilizou-se água destilada, deionizada e microfiltrada.

6.3.2. Preparo das membranas

As membranas de PVA contendo mioglobina e hemoglobina foram preparadas conforme descrito no Capítulo 5, sendo que a adição do transportador foi efetuada antes do agente reticulante. Após homogeneização da solução e transferência para uma placa de petri de poliestireno, o sistema era seco a 40°C por cerca de 15 horas em estufa.

As variáveis investigadas foram o tipo e a concentração do transportador (mioglobina e hemoglobina, nas formas oxidada, Fe³⁺, e reduzida, Fe²⁺), bem como o teor de glutaraldeído. O método utilizado para promover a redução do ferro das hemoproteínas, baseado na reação com ditionito e posterior eluição em coluna contendo a resina Sephadex G25 para purificação, foi exposto no Capítulo 4.

6.3.3. Caracterização das membranas

Com o objetivo de caracterizar as membranas, foram realizados testes de inchamento em água e espectroscopia UV-visível (Shimadzu, UV mini 1240), conforme descrito no Capítulo 4 para as membranas densas integrais. A análise térmica dos filmes foi avaliada por meio de ensaios de calorimetria exploratória diferencial, DSC (Perkin Elmer, DSC7), e termogravimetria, TGA (Perkin Elmer, TGA7), seguindo o procedimento apresentado no Capítulo 5. Para averiguar as modificações na estrutura da membrana, os espectros no infravermelho (FTIR, Perkin Elmer, 1720X) determinados de acordo com o procedimento detalhado no Capítulo 5.

6.3.4. Testes de desempenho

A avaliação do desempenho das membranas em relação ao transporte de oxigênio foi realizada em fase líquida, por meio da célula de diálise apresentada no Capítulo 4. Este procedimento foi adotado devido à baixa permeabilidade dos filmes hidrofílicos de PVA aos gases atmosféricos e ao aumento da especificidade do método com a utilização de um sensor de oxigênio dissolvido no permeado.

Os filmes foram inseridos entre duas membranas de microfiltração de acetato de celulose (Millipore), com diâmetro médio de poros igual a 0,45 μm e porosidade igual a 30%, antes do início dos ensaios, visando aumentar a resistência mecânica das membranas densas integrais de PVA.

Nos testes de desempenho, variou-se tanto o pH como a temperatura do sistema com o intuito de modificar a afinidade das biomoléculas pelo oxigênio, alterando as taxas de complexação e de descomplexação. As modificações no pH do permeado foram efetuadas borbulhando-se CO_2 , ao invés de N_2 , para promover a desoxigenação do meio antes do início dos testes. Para avaliar os efeitos da temperatura de 40°C, a célula de diálise foi transferida para um banho térmico, onde os ensaios foram realizados.

6.3.5. Testes de afinidade pelo oxigênio

Com o objetivo de verificar as mudanças na afinidade entre as proteínas e o oxigênio em decorrência da imobilização das primeiras em filmes de PVA, as curvas de afinidade foram determinadas. O método estático desenvolvido consistiu em transferir uma amostra de 2 por 0,4 cm para a cubeta do espectrofotômetro. Em seguida, adicionou-se água e o sistema foi fechado para a atmosfera, sendo que uma entrada e uma saída de gases foram construídas na tampa de vedação. Misturas gasosas com diferentes composições, ou seja, nitrogênio puro (White Martins), O_2/N_2 de 5:95, 10:90 e 15:85 em massa (Linde), ar comprimido e oxigênio puro (Aga), foram borbulhadas na cubeta por um período superior a 2 horas.

Uma vez alcançado o equilíbrio, o sistema era completamente vedado e os espectros na região do visível eram determinados. As intensidades de absorção nos picos característicos das formas oxi e desoxi dos biotransportadores foram utilizadas para quantificar as concentrações das formas oxi e desoxi das proteínas. Desta forma, foi possível inferir a respeito da afinidade entre o biotransportador e o oxigênio e avaliar o formato da curva de dissociação do O_2 .

6.4. Resultados e discussão

A imobilização dos biotransportadores na matriz do PVA foi investigada através da reação com glutaraldeído, que é um agente bifuncional capaz de reagir tanto com os

grupos hidroxila do PVA quanto com as proteínas, embora a ligação do dialdeído com estas últimas não seja específica (BUEHLER *et al.*, 2005, MIGNEAULT *et al.*, 2004). Porém, a eficácia da imobilização do transportador exige a utilização de condições reacionais mais amenas do que as da literatura, em que ácidos minerais são utilizados para catalisar a reação do GA com o PVA (HYDER *et al.*, 2006). Meios ácidos são bastante deletérios à estrutura da mioglobina eqüina, como foi apresentado no Capítulo 3. Considerando a restrição no pH do meio, a síntese das membranas foi realizada utilizando soluções aquosas, com pH igual a $6,2 \pm 0,1$, de acordo com o procedimento estabelecido no Capítulo 5.

Como a mioglobina possui uma estrutura relativamente mais simples que a hemoglobina e foi estudada com maior detalhamento neste trabalho, os testes iniciais foram realizados com esta proteína, que possui apenas um sítio para a ligação com oxigênio molecular, não apresentando propriedades alostéricas.

A imobilização da mioglobina na membrana foi investigada inicialmente sem a redução prévia do ferro presente no sítio ativo, já que o principal objetivo desta etapa era estabelecer as condições em que a proteína fosse fixada na matriz polimérica. As faixas de investigação da razão entre o PVA e o GA foram determinadas a partir dos resultados do Capítulo 5. Assim, o valor ótimo obtido para a reticulação do PVA pelo GA, ou seja, razão GA/PVA de 0,0044 mol/mol, consistiu no valor mínimo a ser empregado para a fixação da proteína. Por outro lado, o trabalho de EIKE e PALMER (2004) foi utilizado como referência para estabelecer a faixa inicial de investigação da concentração de proteína, que foi de 1 a 3 vezes inferior à do glutaraldeído.

As membranas preparadas inicialmente revelaram concentrações muito altas da mioglobina e baixas do glutaraldeído, originando filmes heterogêneos e com elevada solubilidade em água. Entretanto, para membranas cuja razão GA/PVA foi de 0,088 mol/mol, equivalente a 0,2 g/g, os filmes apresentaram aspecto homogêneo, com inchamento moderado em água. Uma vez fixada a concentração de GA, avaliou-se o efeito da concentração de proteína nos filmes. Foram obtidas membranas com espessura média de 30 μm e uma coloração vermelha, característica da oximioglobina, conforme apresentado na Figura 6. 5.

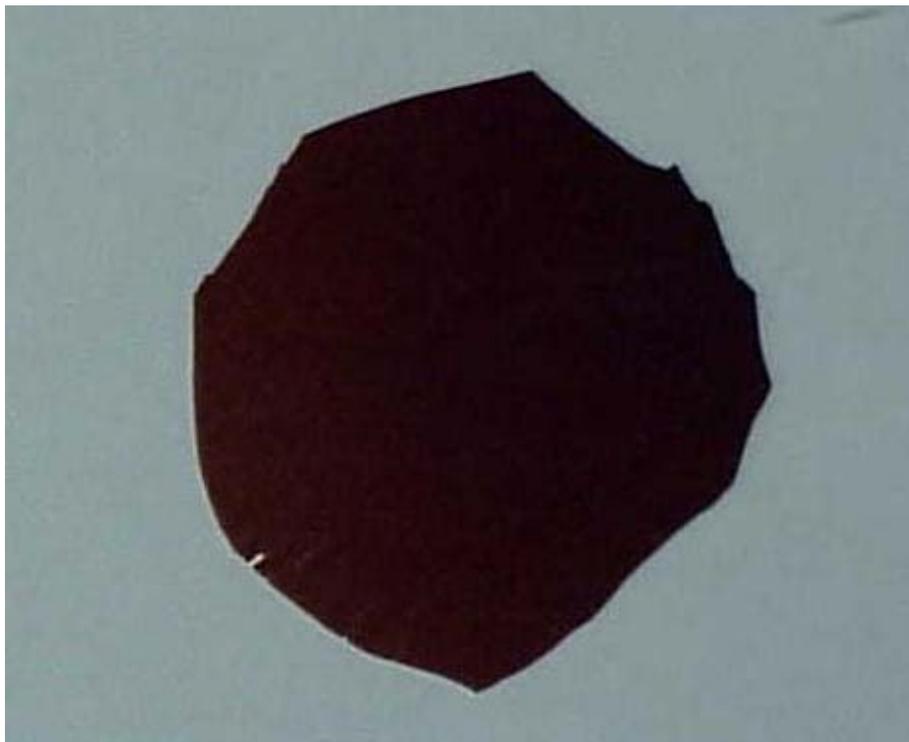


Figura 6. 5: Fotografia da membrana de PVA contendo mioglobina imobilizada através da reação com GA.

Ainda em relação ao aspecto visual das membranas, observou-se que o aumento da concentração de mioglobina resultou em filmes mais quebradiços, dificultando seu manuseio. Para uma razão Mb/PVA igual a 2, parece que o limite de incorporação da proteína no polímero foi alcançado. Em outras palavras, a dificuldade de remover as membranas intactas da placa comprometeu a etapa de caracterização.

Testes de inchamento em água foram realizados para inferir a respeito da densidade de reticulação dos filmes. Conforme mencionado anteriormente, os filmes de PVA não modificados são solúveis em água e a reticulação é um tratamento utilizado para aumentar a estabilidade das membranas durante a aplicação das mesmas em fase aquosa. Porém, existe uma concentração ótima de glutaraldeído para promover a reticulação do PVA. Maiores concentrações do agente reticulante promovem a ramificação do polímero. A influência da adição da mioglobina nas propriedades dos filmes tratados com glutaraldeído pode ser visualizada na Tabela 6. 1.

Tabela 6. 1: Resultados dos testes de inchamento em água das membranas de Mb imobilizada em PVA.

Amostra	Razão mássica PVA/Mb/GA	Inchamento (%)
1	1 : 0 : 0,2	∞
2	1 : 0,2 : 0,2	∞
3	1 : 0,4 : 0,2	19
4	1 : 0,9 : 0,2	23 ± 0
5	1 : 1,4 : 0,2	15 ± 5
6	1 : 1,9 : 0,2	20 ± 2

Considerando a amostra 1, ou seja, na ausência de mioglobina, houve a dissolução da membrana em água, confirmando os resultados apresentados no Capítulo 5, em que um excesso de GA promove a ramificação das cadeias do PVA. Comparando-se as amostras 2 e 3, observa-se que o aumento da concentração de mioglobina promoveu uma redução no inchamento, indício de que a ligação da proteína à cadeia polimérica aumenta a densidade de reticulação. Entretanto, para concentrações maiores do transportador, ou seja, amostras 4, 5 e 6, não há variação considerável no grau de inchamento em água. Em outras palavras, a densidade de reticulação máxima já havia sido alcançada. É interessante observar que o inchamento das membranas contendo mioglobina foi de 19% em média, o que é mais de duas vezes menor que o melhor resultado obtido para a reticulação do PVA com GA no Capítulo 6, 44%, mostrando que a adição da mioglobina reduz o volume livre entre as cadeias do polímero.

Vale ressaltar que não foi verificada a extração da mioglobina dos filmes para a fase aquosa durante os testes, o que comprova a efetividade da imobilização da proteína. O comportamento das membranas frente aos testes de inchamento revelou que a mioglobina foi incorporada aos filmes de PVA na ausência de catálise ácida, usando pH 6,2, condição muito mais branda do que as relatadas na literatura (VIDAL *et al.*, 1999), o que representa uma vantagem significativa em relação a outros métodos.

Uma vez caracterizado o pequeno inchamento das membranas em fase aquosa, investigou-se a forma fisiológica da mioglobina presente nos filmes através da espectroscopia no UV-visível. Esta análise foi motivada porque a cor vermelha dos filmes no final da etapa de secagem contrastou com o marrom, característico da metamioglobina (Fe^{3+}) usada nos testes. A amostra 1, membrana sem mioglobina, foi usada como referência. Os resultados são apresentados na Figura 6. 6.

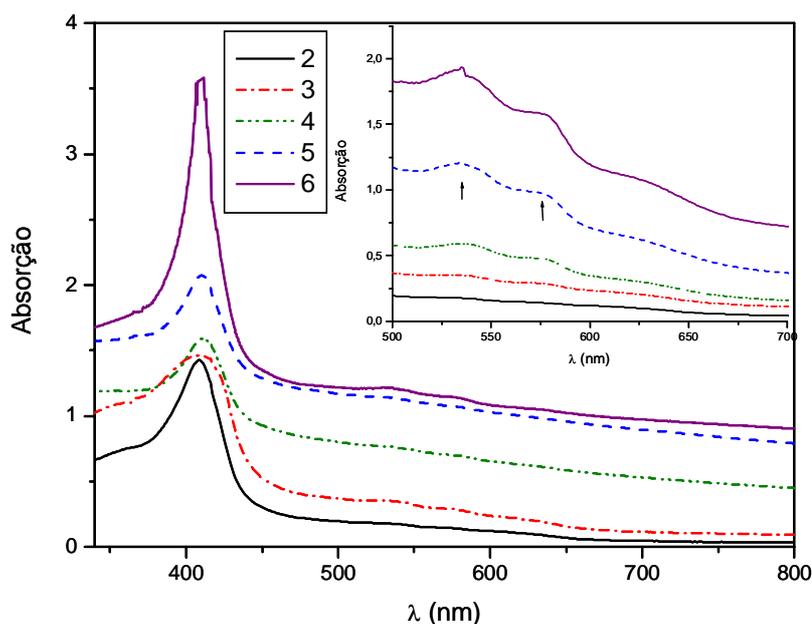


Figura 6. 6: Espectros de absorção no visível das membranas de PVA contendo Mb imobilizada. A designação de 2 a 6 corresponde às amostras apresentadas na Tabela 6. 1.

Os espectros mostram a presença da mioglobina nos filmes, embora haja deslocamento da linha de base, provavelmente devido ao fato de termos utilizado filmes sólidos para a análise com variações locais na espessura. Além dos picos na região do Soret (409 a 434 nm), houve absorção também em torno de 535 e 580 nm, conforme destacado no detalhe da Figura 6. 6, indicando que há oximioglobina nas membranas, além da metamioglobina original, com pico mais fraco a 630 nm. Este resultado não era esperado e indica que as condições reacionais promoveram a redução do ferro para seu estado de oxidação ferroso, biologicamente ativo. Portanto, o método empregado para a imobilização da mioglobina também provocou a ativação da proteína, permitindo a complexação deste transportador com o oxigênio molecular. O procedimento de síntese

da membrana torna-se bastante simplificado desta forma, uma vez que as etapas de redução da proteína comercial e purificação podem ser evitadas.

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos, a amostra 3 foi tratada com ditionito de sódio, agente redutor de ferro, e com uma solução de água oxigenada, para averiguar a oxidação do transportador. No caso do tratamento com solução aquosa de ditionito, verificou-se que os espectros foram mantidos, o que reforça a hipótese de que a proteína já estava com ferro ferroso na membrana. Já a imersão dos filmes em água oxigenada 30% em volume provocou a degradação dos mesmos, inviabilizando a análise espectrofotométrica posterior.

A análise térmica das membranas foi realizada por meio de ensaios de termogravimetria (TGA) e de calorimetria de varredura diferencial (DSC), a fim de comparar o efeito da adição de mioglobina nas propriedades das amostras. As curvas de TGA são apresentadas na Figura 6. 7. As curvas correspondentes às amostras 3, 4 e 5 não foram incluídas na figura para efeito de clareza, já que não obtiveram comportamento diferenciado.

A comparação das curvas a e b indica que a reticulação do PVA pelo glutaraldeído altera o perfil de degradação da membrana, que passa a apresentar apenas um estágio de degradação. A adição de mioglobina às membranas (curvas c e d) mantém a degradação em uma única etapa e ainda aumenta a estabilidade térmica dos filmes. Assim, por exemplo, a amostra 6 apresenta início de degradação térmica apenas em temperaturas superiores a 350°C, semelhante ao perfil obtido para as membranas tratadas com ácido maleico, comprovando que a adição da mioglobina ajudou a aumentar a densidade de reticulação das membranas, resultando em uma maior resistência térmica do material.

As curvas referentes à análise de DSC são apresentadas na Figura 6. 8. A curva a corresponde à membrana de PVA não modificada. As demais curvas correspondem a membranas com razão mássica GA/PVA igual a 0,2 e com concentração crescente de mioglobina.

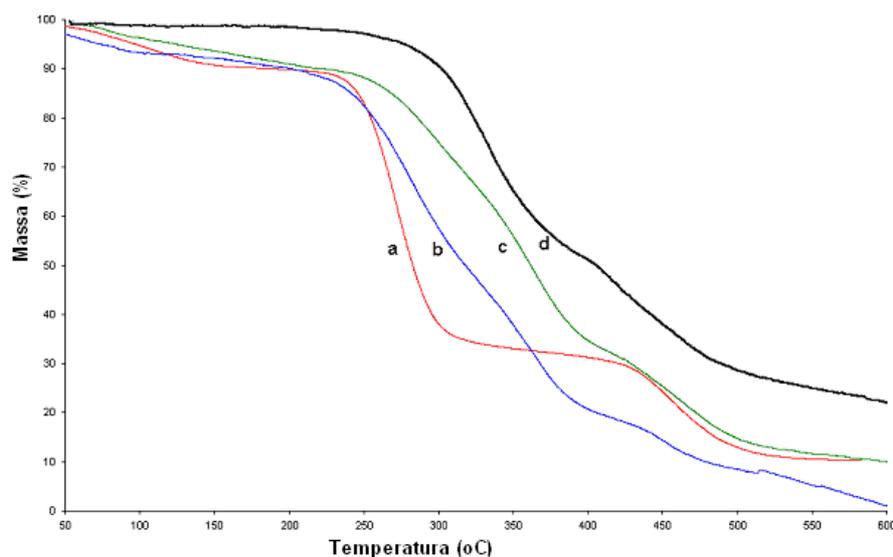


Figura 6. 7: Curvas de TGA das membranas de Mb imobilizada em PVA através da reação com GA. a) Membrana de PVA não modificada; b) Amostra 1 (sem mioglobina); c) Amostra 2 (PVA/Mb/GA = 1:0,2:0,2); d) Amostra 6 (PVA/Mb/GA = 1:1,9:0,2).

A temperatura de transição vítrea, T_g , não é mais observada para as membranas de PVA modificado, devido às modificações impostas pela reação com GA ou GA/Mb. Houve também redução progressiva na entalpia de fusão, que chegou a desaparecer a partir da amostra e. Desta forma, os resultados de DSC indicaram que a adição da mioglobina aos filmes de PVA via reação com glutaraldeído promoveu uma alteração significativa no arranjo das cadeias do polímero, impedindo a organização em estruturas cristalinas.

Considerados em conjunto, os resultados da análise térmica das amostras apontam para uma mudança significativa na forma com que as cadeias do PVA se empacotaram após a incorporação da mioglobina. Há evidências de que a proteína tenha atuado como um reticulante do polímero, diminuindo o volume livre e a hidroflicidade das membranas, outrora disponíveis para a adsorção ou absorção de moléculas de água. Além disso, a reação com o dialdeído e a proteína consumiu os grupos hidroxila responsáveis pela formação de polímeros a 250°C durante a etapa de degradação do PVA, o que deslocou o início da degradação para cerca de 350°C. Outra consequência da redução de grupos –OH livres foi o aumento de domínios amorfos no material, que deixou de se organizar em estruturas cristalinas.

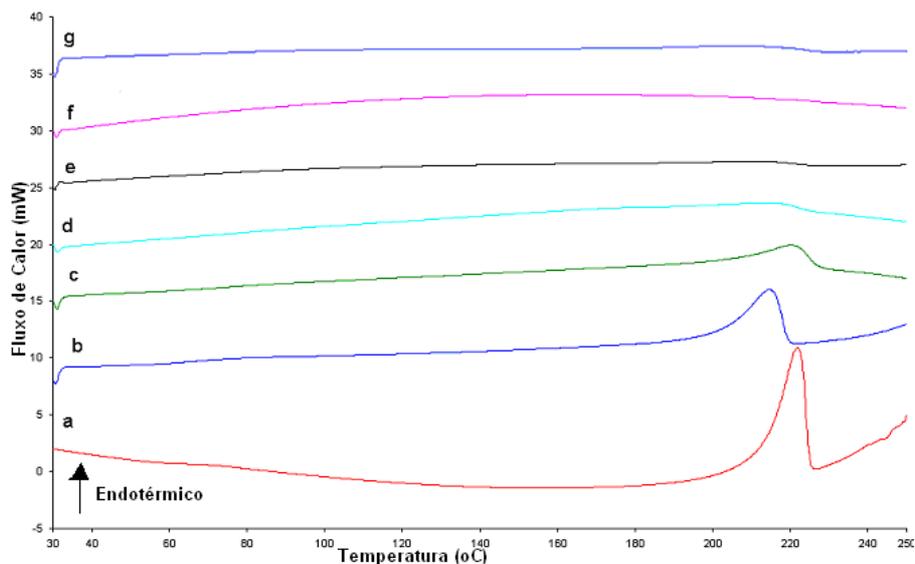


Figura 6. 8: Curvas de DSC das membranas de Mb imobilizada em PVA através da reação com GA. a) Membrana de PVA não modificada; b) Amostra 1 (sem mioglobina); c) Amostra 2 (PVA/Mb/GA = 1:0,2:0,2); d) Amostra 3 (PVA/Mb/GA = 1:0,4:0,2); e) Amostra 4 (PVA/Mb/GA = 1:0,9:0,2); f) Amostra 5 (PVA/Mb/GA = 1:1,4:0,2); g) Amostra 6 (PVA/Mb/GA = 1:1,9:0,2).

Com o objetivo de caracterizar as modificações químicas nas membranas preparadas, as amostras foram submetidas à espectroscopia de infravermelho. Para avaliar adequadamente os resultados, os espectros da mioglobina e da membrana de PVA não modificada foram determinados. Os resultados são apresentados na Figura 6. 9. As curvas obtidas para as amostras 3, 4 e 5 foram suprimidas do gráfico para aumentar a clareza, já que não fornecem informações diferentes das demais.

A curva de FTIR para a mioglobina indica dois picos característicos de absorção das proteínas, denominados amida I, de 1615 a 1700 cm^{-1} , e amida II, de 1650 a 1515 cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al.*, 1991). As maiores intensidades de absorção foram observadas a 1652 e 1544 cm^{-1} , assinalados através de setas na figura, da mesma forma que nas membranas contendo a proteína imobilizada. Este resultado é um indício de que a proteína manteve sua conformação nativa ao ser incorporada nos filmes, uma vez que a absorção a 1652 cm^{-1} é característica de proteínas α -helicoidais como a mioglobina (SUREWICZ *et al.*, 1993, WANG *et al.*, 2004). Uma breve revisão a respeito da utilização do FTIR como ferramenta para determinação da estrutura secundária de biomoléculas é apresentada no Anexo 4.

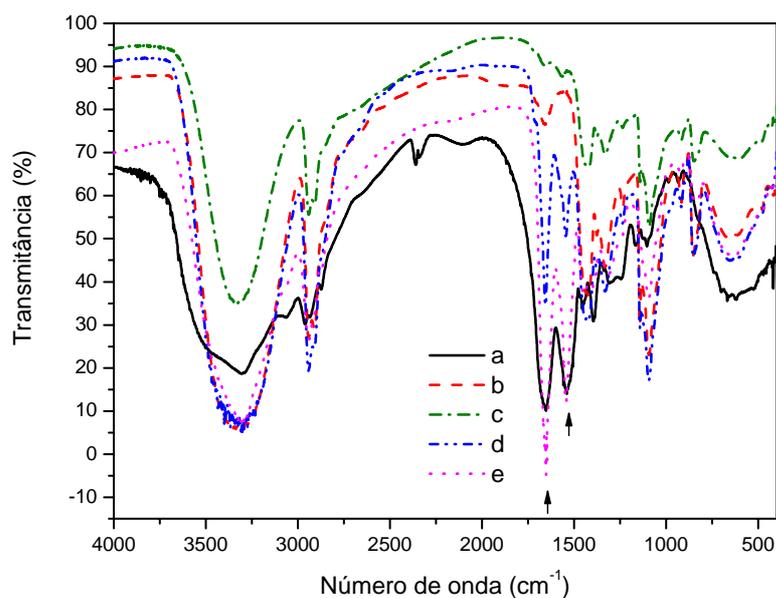


Figura 6. 9: Espectros de FTIR de transmissão das membranas de mioglobina imobilizada em PVA. a) Mioglobina comercial; b) Membrana de PVA não modificada; c) Amostra 1 (PVA/GA = 1:5, sem mioglobina); d) Amostra 2 (PVA/Mb/GA = 1:0,2:0,2); e) Amostra 6 (PVA/Mb/GA = 1:1,9:0,2).

Visando caracterizar o transporte de oxigênio através destas membranas, testes de permeação foram realizados em uma célula de diálise. Os fluxos de O₂ em cada uma das membranas são apresentados na Figura 6. 10. Os desvios foram inferiores a 10% em todos os ensaios. Vale destacar que os fluxos correspondentes à membrana impermeável e ao suporte foram acrescentados na figura como referência. O teste com a membrana impermeável refere-se à utilização de uma membrana metálica, usada para verificar a qualidade de isolamento do permeado, já que a dissolução do oxigênio proveniente da atmosfera pode alterar os resultados.

Como as membranas foram sintetizadas com espessura média de 30 µm, dois suportes microfiltração foram usados para fornecer resistência mecânica ao sistema. O teste assinalado como “suporte” corresponde, portanto, à verificação do fluxo de oxigênio através destas membranas porosas, sem filmes de PVA no seu interior.

A comparação dos resultados obtidos para as membranas mostrou que o inchamento do PVA não modificado em fase aquosa é tão grande que o fluxo de oxigênio é igual ao fluxo do suporte, indicando que o filme polimérico não ofereceu resistência extra à

permeação. Para a amostra 4, porém, o fluxo foi ligeiramente inferior àquele observado para o suporte, indicando que não houve transporte facilitado de oxigênio, mas apenas difusão simples através das cadeias do polímero reticulado.

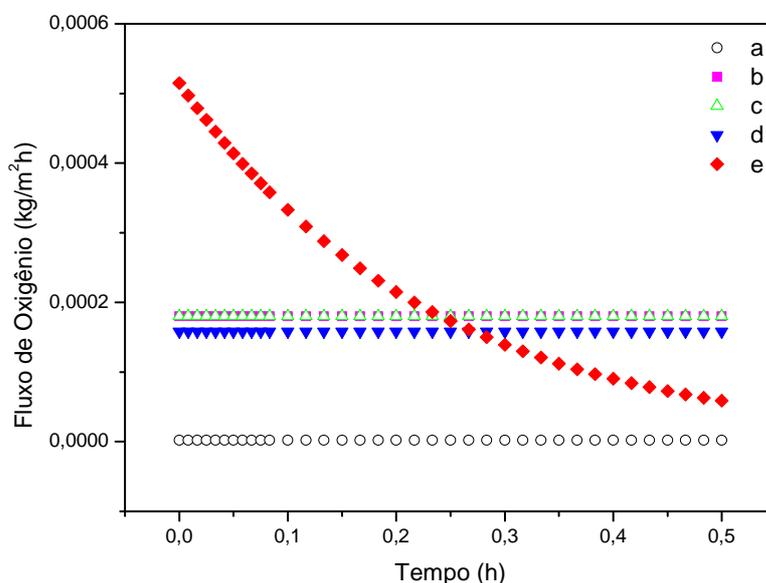


Figura 6. 10: Fluxos de oxigênio em fase aquosa através das membranas. a) Membrana impermeável; b) Suportes; c) Membrana de PVA não modificada; d) Amostra 4 (PVA/Mb/GA = 1:0,9:0,2), e) Membrana de PVA com Mb 1:0,9 sem GA.

Ainda na Figura 6. 10, apresenta-se o fluxo de oxigênio para uma membrana preparada nas mesmas condições que a amostra 4, ou seja, razão mássica Mb/PVA igual a 0,9, mas sem reticulação com GA. Observa-se um fluxo inicial cerca de três vezes maior para o oxigênio através desta membrana, indicando que houve transporte facilitado de oxigênio. Entretanto, o elevado inchamento do polímero provocou a extração da proteína da membrana para a fase líquida, reduzindo o fluxo de oxigênio ao longo do experimento.

Estes resultados confirmam o fato de que, apesar de a mioglobina apresentar uma afinidade mais elevada pelo oxigênio que a hemoglobina, ela é capaz de atuar como transportador de oxigênio. Outro aspecto que deve ser ressaltado é que a observação do transporte facilitado em testes realizados com três diferentes membranas valida o método utilizado para verificar o transporte de oxigênio.

Uma possível explicação para justificar a ausência de transporte facilitado nas membranas com glutaraldeído é a ocorrência de alteração estrutural provocada pela reação. Embora haja indícios de que a proteína esteja na forma ativa e tenha mantido sua conformação original, como verificado pelas análises espectrofotométricas, a reação pode ter aumentado a afinidade da proteína pelo oxigênio, o que inviabilizou a descomplexação entre o transportador e o soluto. Cabe destacar que a polimerização (ou melhor, oligomerização) da hemoglobina com o glutaraldeído no preparo de substitutos do sangue também provoca o mesmo deslocamento da curva de dissociação do oxigênio para a esquerda (BUEHLER *et al.*, 2005).

Para averiguar a curva de dissociação de oxigênio da mioglobina imobilizada em PVA, misturas de O₂ e N₂ em diferentes proporções foram borbulhadas em soluções aquosas contendo amostras das membranas. Os espectros no visível dos filmes após alcançarem equilíbrio com o sistema são apresentados na Figura 6. 11. Nestes testes, esperava-se que o contato das membranas com nitrogênio puro ou misturas gasosas com baixas concentrações de oxigênio favorecesse a descomplexação, indicando a concentração limite de oxigênio tolerada no permeado.

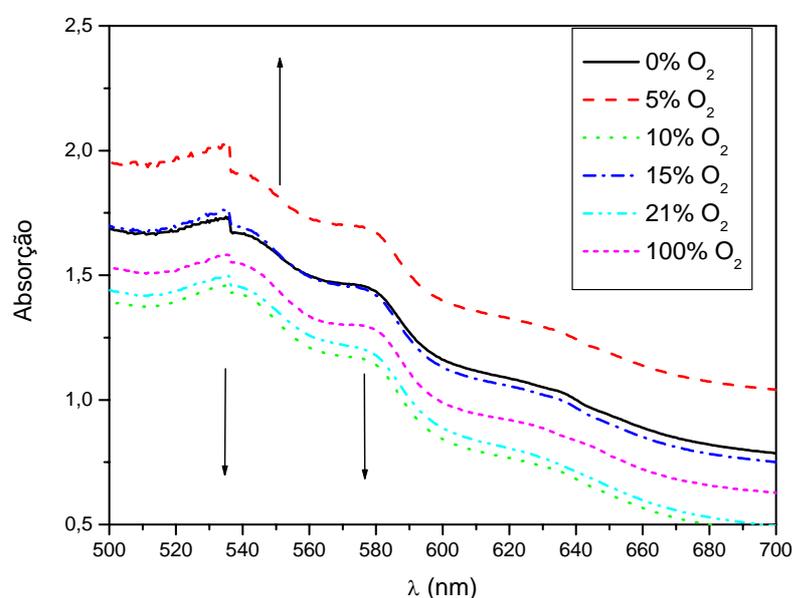


Figura 6. 11: Espectros no visível da amostra PVA/Mb/GA = 1:0,9:0,2 após contato com misturas O₂/N₂ em diferentes proporções.

A análise da figura revela que não houve alteração nos espectros com a diminuição da concentração de oxigênio em contato com as membranas. As setas indicam o comportamento esperado, ou seja, redução da absorção a 540 e 580 nm e aumento da absorção a 556 nm, característico da desoximioglobina. Estes resultados corroboram os testes de permeação e indicam que a incorporação da proteína no filme provocou uma redução ou mesmo perda na reversibilidade da reação de complexação da proteína com o oxigênio.

Como alternativa, o pH da fase aquosa correspondente ao permeado nos testes de permeação foi reduzido, através do borbulhamento de CO₂ no compartimento específico. O pH da alimentação e do permeado durante os ensaios foi de 6 e 5, respectivamente. Entretanto, o transporte facilitado de oxigênio não foi observado. A realização de testes a 40°C também foi investigada, porém, sem observação do transporte facilitado de O₂.

Novas membranas foram preparadas utilizando a mioglobina previamente reduzida, para eliminar a possibilidade de a redução da proteína estar causando alterações significativas no sítio ativo da mesma. Entretanto, esta alteração não foi suficiente para promover a liberação do oxigênio para o permeado e o fluxo foi inferior ao do suporte de microfiltração.

A utilização da hemoglobina como transportador foi efetuada devido ao fato de a proteína apresentar menor afinidade pelo oxigênio que a mioglobina. Desta forma, foram preparadas membranas com a proteína na forma férrica, nas mesmas concentrações empregadas anteriormente, ou seja, razão proteína/PVA de 2 g/g. Testes preliminares revelaram que a solubilidade em água da proteína tetramérica é muito inferior à da mioglobina. Como alternativa, soluções tampão fosfato pH 7 na concentração de 10 mM foram utilizadas para favorecer a dissolução.

Com o intuito de avaliar a estrutura e a pureza da hemoglobina, espectros no visível foram determinados para as formas metahb, oxihb e desoxihb. Os resultados foram muito semelhantes aos apresentados no Capítulo 3 para a mioglobina. Desta forma, a síntese de membranas de PVA contendo a hemoglobina como transportador por meio da

reação com glutaraldeído foi investigada. As principais observações são apresentadas na Tabela 6. 2.

Tabela 6. 2: Membranas contendo hemoglobina imobilizada em PVA através da reação com glutaraldeído.

Sistema	Condição	Observação
1	PVA/Hb(Fe ³⁺)/GA 1:1:0,2 e 1:1,5:0,2	Filmes heterogêneos.
2	PVA/Hb(Fe ³⁺)/GA 1:0,5:0,2 e 1:0,25:0,2	Membranas homogêneas. Inchamento elevado.
3	PVA/Hb(Fe ²⁺)/ GA 1:0,5:0,2	Filmes heterogêneos. Sem transporte facilitado.
4	PVA/Hb(Fe ²⁺)/ GA 1:0,5:0,02	Membrana homogênea. Proteína extraída para a fase aquosa.

Os resultados indicaram que as quantidades de hemoglobina e de glutaraldeído precisam ser otimizadas para o preparo da membrana. A adição da hemoglobina aos filmes é bastante limitada pela solubilidade da mesma em fase aquosa. Por outro lado, a diminuição da quantidade da proteína aumenta muito o inchamento da membrana. Outra observação importante foi a velocidade da reação do glutaraldeído com a Hb. A reação ocorre instantaneamente, com formação de aglomerados da proteína, revelando que houve desnaturação da mesma. Isso comprometeu bastante a homogeneidade dos filmes. Como alternativa, as soluções de espalhamento foram filtradas antes de serem transferidas para a placa de petri, sem sucesso.

Não se observou a redução do ferro durante a etapa de síntese das membranas contendo Hb, que apresentaram aspecto marrom. Para os sistemas em que a proteína foi reduzida previamente, não foi possível quantificar o transporte facilitado de oxigênio, mesmo com as alterações de pH e da temperatura, indicando que mais estudos devem ser conduzidos de modo a esclarecer como a reação com o dialdeído afeta a afinidade da proteína pelo oxigênio. Conforme relatado por BUEHLER *et al.* (2005), há evidências de que a reação com GA seja distante da cavidade hidrofóbica da hemoglobina, mas ainda assim parece haver uma transmissão de informações ao longo da cadeia polipeptídica que aumenta a afinidade da proteína pelo oxigênio.

6.5. Conclusão

A incorporação da mioglobina e da hemoglobina em filmes de PVA através da reação com o glutaraldeído foi alcançada com sucesso. Em particular, a adição da mioglobina aos filmes reduziu o inchamento das membranas em água e aumentou significativamente a estabilidade térmica do material, indicando que houve aumento na densidade de reticulação do polímero. As condições de síntese das membranas promoveram a redução do ferro da metamioglobina, o que permitiu a imobilização da oximioglobina no filme hidrofílico.

As análises espectroscópicas de infravermelho e no visível indicaram a manutenção da estrutura secundária da proteína mesmo após a imobilização. Testes de permeação, por outro lado, revelaram que a afinidade da proteína pelo oxigênio é bastante elevada, comprometendo o transporte do soluto. Modificações nas condições operacionais e na síntese da membrana evidenciaram a dificuldade em promover a descomplexação. Entretanto, na ausência de agente reticulante, observou-se um fator de facilitação de 3 para o oxigênio, comprovando que a efetividade do transporte depende de melhorias na metodologia de síntese das membranas.

6.6. Referências bibliográficas

- ALAYASH, A. I., SUMMERS, A. G., WOOD, F., *et al.*, 2001, “Effects of glutaraldehyde polymerization on oxygen transport and redox properties of bovine hemoglobin”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 391, n. 2 (Jul), pp. 225-234.
- ATOJI, T., AIHARA, M., SAKAI, H., *et al.*, 2006, “Hemoglobin vesicles containing methemoglobin and L-Tyrosine to suppress methemoglobin formation in vitro and in vivo”, *Bioconjugate Chemistry*, v. 17, n. 5 (Sep), pp. 1241-1245
- AYRES, W. A., 1966, “Gill-type underwater breathing equipment and methods for reoxygenating exhaled breath”, *U.S. Patent*, 3.228.394.
- BAKER, R. W., 2002, “Future directions of membrane gas separation technology”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 41, n. 6 (Mar), pp. 1393-1411.
- BODEL, B. R., 1967, “Artificial gill”, *U. S. Patent*, 3.333.583.
- BONAVENTURA, J., BONAVENTURA, C., 1982, “Immobilized hemoglobin and processes for extracting oxygen from fluids using the same”, *U. S. Patent*, 4.343.715.

- BUEHLER, P. W., BOYKINS, R. A., JIA, Y., *et al.*, 2005, “Structural and functional characterization of glutaraldehyde-polymerized bovine hemoglobin and its isolated fractions”, *Analytical Chemistry*, v. 77, n. 11 (Jun), pp. 3466-3478.
- CHANG, T. M. S., 1993, “Blood substitutes based on modified hemoglobin prepared by encapsulation or crosslinking: an overview”. In: CHANG, T. M. S. (Ed.), *Blood substitutes and oxygen carriers*, New York, Marcel Dekker Inc.
- EIKE, J. H., PALMER, A. F., 2004, “Effect of NaBH₄ concentration and reaction time on physical properties of glutaraldehyde-polymerized hemoglobin”, *Biotechnology Progress*, v. 20, n. 3 (May-Jun), pp. 946-952.
- HYDER, M. N., HUANG, R. Y. M., CHEN, P., 2006, “Correlation of physicochemical characteristics with pervaporation performance of poly(vinyl alcohol) membranes”, *Journal of Membrane Science*, v. 283, n. 1-2 (Oct), pp. 281-290.
- MATSUDA, N., SAKAI, K., NAKAMURA, T. *et al.*, 2001, “Temperature-controlled enhancement of oxygen uptake from water using oxygen carrier solution”, *Journal of Membrane Science*, v. 184, n. 1 (Mar), pp. 17-26.
- MIGNEAULT, I., DARTIGUENAVE, C., BERTRAND, M. J., *et al.*, 2004, “Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking”, *BioTechniques*, v. 37, n. 5 (Nov), pp. 790-802.
- NAGASE, K. I., KOHORI, F., SAKAI, K., 2003, “Development of a compact artificial gill using concentrated hemoglobin solution as the oxygen carrier”, *Journal of Membrane Science*, v. 215, n. 1-2 (Apr), pp. 281-292.
- NAGASE, K. I., MATSUDA, N., SAKAI, K., 2002, “Optimum control of oxygen affinity of hemoglobin as an oxygen carrier solution for an artificial gill”, *Journal of Artificial Organs*, v. 5, n. 1 (Mar), pp. 44-49.
- RIESS, J. G., 2001, “Oxygen carriers (“blood substitutes”) – Raison d’Etre, chemistry and some physiology”, *Chemical Reviews*, v. 101, n. 9 (Sep), pp. 2797-2919.
- SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C., 1991, *Spectrometric identification of organic compounds*, 5 ed., New York, John Wiley & Sons Inc.
- SUREWICZ, W. K., MANTSCH, H. H., CHAPMAN, D., 1993, “Determination of protein secondary structure by fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment”, *Biochemistry*, v. 32, n. 2 (Jan), pp. 389-394.
- VIDAL, M. M. B., GIL, M. H., DELGADILLO, I., *et al.*, 1999a, “Swelling and thermal properties of poly(vinyl alcohol) containing hemoglobin membranes”, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 14, n. 3 (May), pp. 243-257.
- VOET, D., VOET, J. G., PRATT, C. W., 2000, “Função das Proteínas”. In: *Fundamentos de Bioquímica*, capítulo 4, Brasil, Artmed Editora.
- WANG, Q., LU, G., YANG, B., 2004, “Myoglobin/sol-gel film modified electrode: direct electrochemistry and electrochemical catalysis”, *Langmuir*, v. 20, n. 4 (Feb), pp. 1342-1347.
- YANG, M. C., CUSSLER, E. L., 1989, “Artificial gills”, *Journal of Membrane Science*, v. 42, n. 3 (Mar), pp. 273-284.
- ZHAO, J., LIU, C. S., YUAN, Y., *et al.*, 2007, “Preparation of hemoglobin-loaded nano-sized particles with porous structure as oxygen carriers”, *Biomaterials*, v. 28, n. 7 (Mar), pp. 1414-1422.

Capítulo 7:

Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

Este capítulo consiste na descrição das conclusões do trabalho. Em seguida, algumas perguntas ainda sem resposta são apresentadas como sugestões para trabalhos futuros.

7.1. Conclusão

A síntese de membranas de transporte facilitado de oxigênio utilizando biotransportadores imobilizados em matrizes poliméricas foi investigada neste trabalho, tendo em vista a necessidade de utilização de ar enriquecido em oxigênio ou oxigênio puro em diversas aplicações. A originalidade do trabalho consistiu na imobilização de hemoproteínas como a hemoglobina e, principalmente, a mioglobina em matrizes sólidas hidrofílicas visando a estabilização do sistema. A utilização destas proteínas como transportadores de O₂ se justifica pela comprovada eficiência da cadeia polipeptídica na proteção do grupo prostético hemo contra a autoxidação, aumentando a vida útil da biomolécula.

Na primeira etapa do trabalho, a estabilidade conformacional da mioglobina equina comercial foi avaliada através da dissolução da proteína em diversos solventes orgânicos, visando a síntese de membranas poliméricas. Os espectros no visível e de dicroísmo circular revelaram que os solventes polares próticos são mais adequados para manter a estrutura secundária da proteína. Em particular, soluções aquosas de glicerol e etileno glicol na proporção de 1:1 apresentaram desempenho superior aos demais, pois foi verificado um teor de α -hélices da biomolécula superior a 50%.

Membranas de alginato de sódio foram avaliadas como matriz para a imobilização da mioglobina e revelaram que a estrutura da proteína permaneceu intacta. Entretanto, o polissacarídeo apresentou pouca estabilidade mecânica, o que justificou a escolha de um suporte poroso de acetato de celulose para melhorar seu manuseio. A vantagem das membranas compostas está na possibilidade de controlar a espessura da camada superficial, visando minimizar a resistência ao transporte no filme sólido. As análises de microscopia eletrônica e os ensaios de inchamento mostraram elevada adesão do alginato ao material do suporte. Porém, a etapa de reticulação do alginato com íons cálcio e ferro (Fe^{2+}) acelerou a oxidação da mioglobina. Na ausência de reticulação, as membranas apresentaram elevada solubilidade em água. Por outro lado, a permeabilidade ao oxigênio foi pequena, dada a hidrofiliabilidade do material. Isto impossibilitou a medição do transporte no sistema disponível no laboratório e motivou a análise da taxa de permeação em fase aquosa desde que os polímeros fossem reticulados para aumentar a estabilidade neste meio.

A dificuldade em analisar as modificações sofridas pela proteína imobilizada na camada superficial das membranas compostas sugeriu que, no estágio atual da pesquisa, a síntese de membranas integrais era mais prudente, permitindo avaliar os efeitos das variáveis nas propriedades da membrana de modo mais preciso. Então, optou-se por investigar a imobilização dos biotransportadores em membranas densas de PVA, uma vez que os filmes deste polímero apresentam maior resistência mecânica.

Desta forma, a síntese de membranas de transporte facilitado de oxigênio foi direcionada para a utilização do PVA como matriz polimérica, em que os biotransportadores seriam imobilizados para permitir o transporte de oxigênio em fase aquosa, usando uma célula de diálise. Visando aumentar a estabilidade do polímero neste meio, investigou-se a reticulação do PVA pelo glutaraldeído como alternativa, já que este dialdeído também tem sido usado para a polimerização de hemoglobinas no desenvolvimento de substitutos do sangue. Deve-se destacar, entretanto, que o desafio consistiu em promover a estabilização do polímero e a imobilização das proteínas em condições operacionais suficientemente amenas para garantir a atividade biológica dos transportadores no filme sólido. As principais conclusões do estudo são apresentadas a seguir:

- a) A reticulação do PVA pelo glutaraldeído na ausência de catalisadores ácidos foi alcançada com sucesso. O tratamento do polímero, conduzido a 40°C, alterou a estrutura química do mesmo e reduziu significativamente o inchamento dos filmes em água. A análise térmica indicou aumento na estabilidade e diminuição da cristalinidade do material, revelando que mesmo em condições mais brandas do que as empregadas na literatura, é possível alterar o empacotamento das cadeias e diminuir o volume livre do polímero através da reação com o glutaraldeído em pH 6,2.

- b) A imobilização da mioglobina e da hemoglobina nos filmes de PVA através da reação com o glutaraldeído foi comprovada. No caso da mioglobina, os testes de inchamento e análise térmica revelaram que a adição da proteína aumentou a densidade de reticulação, com redução ainda maior do grau de inchamento, aumento da estabilidade e diminuição da cristalinidade, indicando que a proteína foi efetivamente incorporada entre as cadeias do polímero.

- c) As condições utilizadas para fixar a mioglobina no PVA promoveram a redução do ferro presente no grupo hemo, ativando a proteína. Estudos espectroscópicos mostraram que a oximioglobina estava presente nas membranas, o que simplificou o procedimento de síntese dos filmes, já que as etapas de redução e purificação da proteína puderam ser suprimidas.

- d) A análise de infravermelho das membranas de PVA contendo mioglobina imobilizada indicou a manutenção do pico correspondente aos grupos amida I e II. Aliado ao espectro no visível dos filmes sólidos, estes resultados revelam a manutenção da conformação nativa da proteína na matriz sólida.

- e) A elevada afinidade da mioglobina imobilizada em PVA pelo oxigênio comprometeu a etapa de descomplexação do soluto. Alterações no pH do permeado e na temperatura do sistema não surtiram o efeito desejado, ou seja, o transporte facilitado de oxigênio não foi verificado. Entretanto, embora instáveis, as membranas de PVA contendo mioglobina sem reticulação apresentaram fator de facilitação para o oxigênio igual a três.

- f) A metodologia utilizada para a fixação da hemoglobina nos filmes de PVA deve ser otimizada para permitir o estudo da permeação de oxigênio usando esta proteína alostérica como transportador. Resultados preliminares indicaram elevada reatividade da proteína com o glutaraldeído, o que provavelmente levou à desnaturação da biomolécula.

7.2. Sugestões para trabalhos futuros

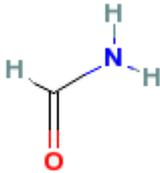
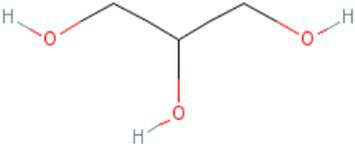
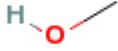
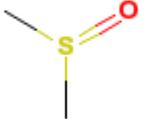
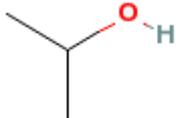
Considerando as questões suscitadas durante o desenvolvimento deste estudo, as seguintes alternativas são sugeridas para trabalhos posteriores:

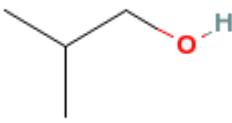
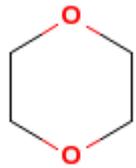
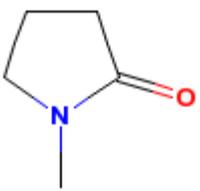
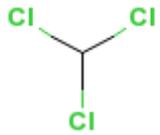
- a) Investigar o encapsulamento dos biotransportadores através da utilização do PVA ou do alginato de sódio através do preparo de emulsões, para garantir controle do tamanho das partículas, semelhantes aos eritrócitos sangüíneos;
- b) Otimizar a imobilização da hemoglobina no PVA via reação com glutaraldeído e explorar as alterações na afinidade da mesma pelo oxigênio através do uso de agentes alostéricos, pH e temperatura;
- c) Utilizar outros métodos de imobilização dos biotransportadores na matriz polimérica, como a reticulação do alginato de sódio pelo glutaraldeído.

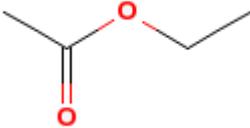
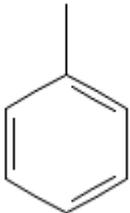
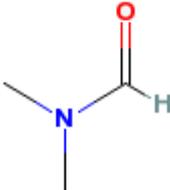
Anexo 1:

Características dos compostos orgânicos investigados como solventes da mioglobina

Tabela A.1.1: Fórmula química, solubilidade em água, densidade e polaridade dos compostos investigados como solventes da mioglobina.

Solvente	Fórmula	S _{água} (w/w)	ρ (g/mL)	Polaridade
Formamida		∞	1,134	7,3
Etileno glicol		∞	1,1155	-
Glicerol		∞	1,26	-
Metanol		∞	0,7928	5,1
Etanol		∞	0,7893	5,2
Dimetil sulfóxido		∞	1,1	7,2
2-Propanol		∞	0,7854	3,9

Solvente	Fórmula	S _{água} (w/w)	ρ (g/mL)	Polaridade
1-Butanol		7,81	0,80978	3,9
Acetona		∞	0,792	5,1
2-Metil-1-Propanol		8,5 (9,5)	0,8169	4,0
1,4-Dioxano		∞	1,0353	4,8
Tetrahidrofurano		∞	0,88	4,0
N-Metilpirrolidona		∞	1,03	6,7
Hexano		0,014	0,6603	0,1
Clorofórmio		0,815	1,49845	4,1

Solvente	Fórmula	S _{água} (w/w)	ρ (g/mL)	Polaridade
Acetato de Etila		8,7	0,901	4,4
Tolueno		0,052	0,866	2,4
N, N - Dimetilformamida		∞	0,944	6,4

Referências bibliográficas

Os dados foram obtidos no sítio da internet:

www.bandj.com/BJProducts/SolProperties/honeywell.htm.

Anexo 2:

Estudo da plastificação do poli(álcool vinílico)

O efeito da adição de plastificantes como o etileno glicol, o glicerol e o PEG 300 ao poli(álcool vinílico) foi estudada visando a estabilização das membranas de transporte facilitado através da gelificação do polímero. A proporção entre o plastificante e o polímero foi variada em uma ampla faixa de concentração. Os efeitos do tipo e da concentração dos glicóis nas membranas preparadas por evaporação de solventes foram verificados pela análise térmica, ou seja, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria, bem como testes de permeação de gases.

A.2.1. Introdução

A utilização do poli(álcool vinílico), PVA, como polímero para a síntese de membranas empregadas na separação de gases é limitada, já que este material é semi-cristalino e, portanto, a permeabilidade é reduzida significativamente devido aos domínios cristalinos, que diminuem a área efetiva para a permeação (JANG e LEE, 2004). Apesar disso, a hidrofilicidade do PVA o torna uma matriz ideal para a imobilização de biomoléculas, como hemoglobina e mioglobina, visando a síntese de membranas de transporte facilitado de oxigênio (CHEN et al., 1996) ou biossensores (VIDAL *et al.*, 1999), desde que as restrições impostas por estas proteínas sejam consideradas. Portanto, a estabilização destas membranas contendo biotransportadores é um desafio que precisa ser vencido para viabilizar a substituição da tecnologia criogênica usada atualmente para a separação do ar (BAKER, 2002).

Uma das alternativas para solucionar os problemas provenientes das perdas do solvente e do transportador das membranas líquidas suportadas é a utilização de uma solução polimérica gelificada nos poros de um suporte microporoso (HEMMINGSSEN e SCHOLANDER, 1960). Neste sistema, a evaporação da solução líquida é consideravelmente reduzida. A gelificação do PVA em solventes diferentes e misturas

de solventes tem possibilitado um estudo sistemático sobre a morfologia da rede tridimensional obtida, o que pode fornecer evidências sobre o mecanismo de formação do gel (TAKESHITA *et al.*, 2001). Esta habilidade de reticulação física em condições operacionais amenas garante ao PVA uma utilização potencial para a síntese de membranas gelificadas.

A investigação da separação de CO₂ de misturas gasosas contendo nitrogênio, hidrogênio e/ou metano através do emprego de membranas de transporte facilitado baseadas em PVA é uma tendência atual (ZOU e HO, 2006). Os ensaios realizados com filmes inchados em água visam aumentar a solubilidade do gás na membrana e evitar a formação de domínios cristalinos, que reduziriam a área efetiva para a permeação (KIM *et al.*, 2004, PARK e LEE, 2001).

No caso da separação oxigênio/nitrogênio, a água tem um papel secundário na solubilidade dos gases na membrana e poderia ser substituída por um outro solvente, com melhores propriedades plastificantes e de solubilização. Os glicóis são considerados os melhores agentes de plastificação para o PVA, pois apresentam uma boa interação com as cadeias poliméricas e são capazes de aumentar a flexibilidade das mesmas, com redução da temperatura de transição vítrea do polímero em testes de calorimetria exploratória diferencial (TOYOSHIMA, 1973, LIM e WAN, 1994). Além disso, a diminuição do teor cristalino da matriz polimérica aumenta a área disponível para a permeação dos gases, causando um conseqüente aumento no fluxo permeado (MILLER e LUTZMANN, 1985).

A.2.2. Objetivo

O objetivo desta etapa do trabalho foi investigar o uso de glicerol, etileno glicol e PEG 300 como plastificantes das membranas de PVA. Foram utilizadas soluções aquosas dos glicóis em uma ampla faixa de concentração, visando a formação de géis para a imobilização de mioglobina e hemoglobina. A escolha destes glicóis como plastificantes foi baseada nos resultados apresentados no Capítulo 3, em que a manutenção da estrutura nativa da mioglobina nas soluções aquosas destes co-solventes foi comprovada por testes de dicroísmo circular. O comportamento térmico dos filmes produzidos e as permeabilidades ao oxigênio e ao nitrogênio foram utilizados como parâmetros para

inferir a respeito da organização das cadeias poliméricas. O uso destas membranas como preenchimento dos poros de um suporte adequado pode representar uma melhoria significativa na estabilidade das membranas de transporte facilitado em aplicações de longa duração.

A.2.3. Materiais e métodos

A.2.3.1. Materiais

Os reagentes utilizados foram o poli(álcool vinílico), PVA, (Aldrich, com massa molecular média entre 85.000 e 146.000 Da, 99% hidrolisado), glicerol (Invitrogen, pureza maior que 99,5%), etileno glicol (Vetec, teor maior que 99%) e poli(etileno glicol) 300, PEG 300 (Aldrich). Utilizou-se água destilada, deionizada e microfiltrada para o preparo das soluções.

A.2.3.2. Preparo das membranas

As membranas foram preparadas a partir da dissolução em água do PVA previamente seco em estufa. O sistema foi aquecido a 100°C e agitado magneticamente sob refluxo, até dissolução completa e liberação de todas as bolhas formadas.

Uma vez dissolvido o polímero, a solução era retirada do aquecimento/agitação, resfriada até a temperatura ambiente, vertida para uma placa de acrílico e espalhada, com auxílio de uma faca de aço inoxidável, na espessura nominal de 130 µm. Em seguida, solução foi seca em estufa a 60°C, para favorecer a formação do gel, por 20 horas. Antes dos testes de permeação, as membranas eram mantidas em dessecador por 30 minutos, no mínimo.

O efeito da adição de plastificantes foi investigado utilizando-se glicerol, etileno glicol e PEG 300. Os dois primeiros foram estudados em uma ampla faixa de composição, ou seja, para razão mássica plastificante/PVA de 3 a 12. Já o PEG 300 foi avaliado para razão mássica monomérica PEG 300/PVA igual a 0,5; 1 e 2. Para estes ensaios, a concentração de PVA na solução de espalhamento foi mantida em 6% em massa.

A.2.3.3. Caracterização das membranas

A caracterização das membranas de PVA foi realizada através de ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC, Perkin Elmer DSC7) e termogravimetria (TGA, Perkin Elmer TGA7). Na análise de DSC, cerca de 15 mg da membrana foram submetidos a uma razão de aquecimento de 10°C/min, de 30 a 250°C, sob atmosfera de nitrogênio a 25 mL/min.

Para a análise de TGA, aproximadamente 8 mg da membrana foram mantidos a 50°C por 1 minuto, seguido pelo aquecimento, a 10°C/min, até 600°C, sob atmosfera de N₂.

A.2.3.4. Testes de permeação gasosa

A permeabilidade das membranas ao O₂ (White Martins, 99,8 % em massa) e ao N₂ (Aga, 99,9% em massa) foi determinada através do sistema padrão de permeação de gases existente no laboratório, conforme Figura A.2. 1. A variação de pressão no permeado é convertida em sinal elétrico com o auxílio de um transdutor de pressão.

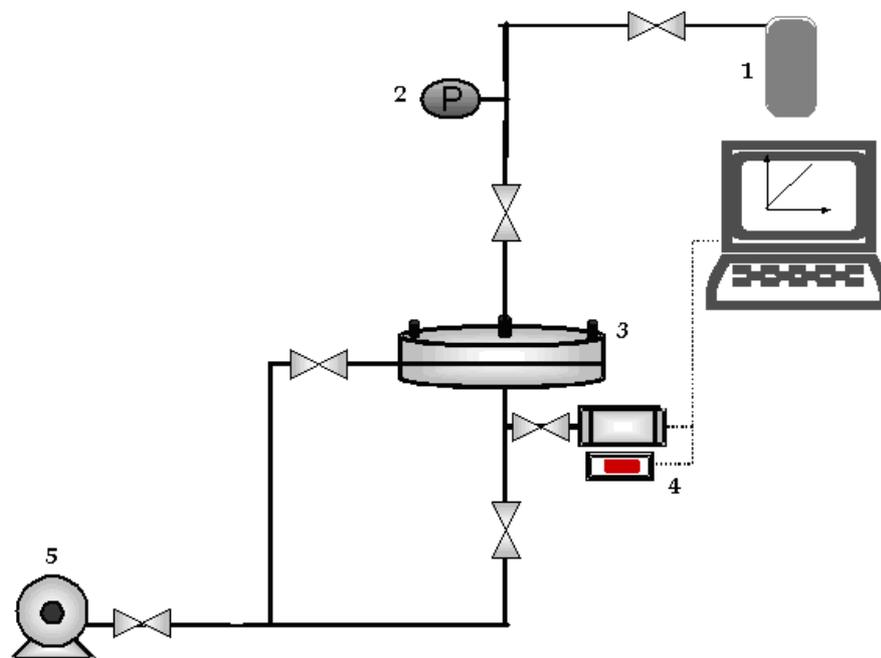


Figura A.2. 1: Esquema ilustrativo do sistema de permeação de gases utilizado nos ensaios de permeação. Legenda: 1 – cilindro de gás, 2 – medidor de pressão, 3 – célula de permeação, 4 – sistema de aquisição de dados, 5 – bomba de vácuo.

Inicialmente, a espessura da membrana preparada foi medida com auxílio de um micrômetro (Mitutoyo). Em seguida, a membrana foi transferida para a célula de permeação, que foi hermeticamente fechada. A válvula do gás de interesse foi aberta antes dos testes por alguns minutos, para evitar contaminação de outros gases que pudessem estar presentes na linha. Após efetuar vácuo da linha de permeado, a pressão de alimentação foi ajustada ao valor desejado e o cronômetro foi acionado. A voltagem foi medida em intervalos regulares de tempo através de um sistema de aquisição de dados.

A permeabilidade foi calculada ao final dos testes, considerando uma área de permeação igual a 5,6 cm². Como a permeabilidade das membranas de PVA ao oxigênio e ao nitrogênio é pequena, utilizou-se nos testes uma pressão de alimentação de 8 kgf/cm². Os testes foram realizados em duplicata. A estabilidade das membranas com o tempo foi avaliada, efetuando testes em dias consecutivos até aproximadamente 10 dias.

Determinação da permeabilidade e seletividade das membranas

Considerando o escoamento unidirecional do gás através da membrana, a permeabilidade (\mathcal{P}) pode ser descrita pela Equação A.2. 1.

$$\mathcal{P} = \frac{J}{\Delta p/l} \quad \text{Equação A.2. 1}$$

J é o fluxo do gás através da membrana, Δp é a diferença de pressão e l é a espessura da membrana. As unidades mais utilizadas para a permeabilidade são GPU (*gas permeation unit*, equivalente a 10⁻⁶ cm³(CNTP).cm⁻².s⁻¹.cmHg⁻¹) e Barrer (correspondente a 10⁻¹⁰ cm³(CNTP).cm.cm⁻².s⁻¹.cmHg⁻¹).

Considerando comportamento ideal dos gases, o fluxo pode ser calculado conforme apresentado na Equação A.2. 2.

$$J = \frac{dV}{dt} \frac{1}{A} = \frac{dn}{dt} \left(\frac{T_{\text{CNTP}} R}{P_{\text{CNTP}}} \right) \frac{1}{A} \quad \text{Equação A.2. 2}$$

A é a área de permeação, R é a constante dos gases, T_{CNTP} e P_{CNTP} são a pressão e a temperatura nas condições normais de temperatura e pressão, n e V são o número de moles e o volume de gás, respectivamente. Cabe destacar que a temperatura e a pressão são tomadas nas condições normais com o objetivo de se comparar as permeabilidades de diferentes membranas, determinadas em quaisquer condições de pressão e temperatura.

A variação do número de moles, dn/dt , pode ser calculada considerando comportamento ideal para o gás que ocupa o permeado, cujo volume é conhecido (V_s , igual ao volume do sistema), conforme a Equação A.2. 3.

$$\frac{dn}{dt} = \frac{dP}{dt} \frac{V_s}{T_{AMB}R} \quad \text{Equação A.2. 3}$$

T_{AMB} é a temperatura ambiente e dP/dt é a variação da pressão com o tempo, determinada pela curva de calibração para o sistema, em que o sinal elétrico (mV) é convertido em pressão. A substituição destas equações na Equação A.2. 1, resulta na Equação A.2. 4 (FERRAZ, 2003).

$$\mathcal{P}/l = \frac{dP}{dt} \left(\frac{V_s}{A\Delta p} \right) \left(\frac{T_{CNTP}}{T_{AMB}P_{CNTP}} \right) \quad \text{Equação A.2. 4}$$

A seletividade ideal ($\alpha_{i,j}$), é calculada a partir da razão entre as permeabilidades dos gases, conforme apresentado na Equação A.2. 5 (BAKER, 2004):

$$\alpha_{i,j} = \frac{\mathcal{P}_i}{\mathcal{P}_j} \quad \text{Equação A.2. 5}$$

Determinação do volume do sistema

A determinação do volume do sistema foi realizada através da permeação de nitrogênio numa membrana porosa de poli(éter sulfona). A pressão de alimentação foi variada de 2 a 5 kgf/cm², sendo que o fluxo correspondente foi medido por meio de um fluxímetro de bolhas, conectado à saída do permeado. A determinação da permeabilidade da membrana (\mathcal{P}/l) foi efetuada através da inclinação da reta de fluxo em função da diferença de pressão, usando a relação descrita pela Equação A.2. 1.

Em seguida, a pressão de alimentação foi fixada em 2,6 kgf/cm² e observou-se a variação do sinal obtido no milivoltímetro com o tempo. A partir da inclinação da reta do sinal em função do tempo (dS/dt), e usando-se a calibração do sistema, foi possível determinar a variação da pressão com o tempo (dp/dt), através da Equação A.2. 6.

$$\frac{dp}{dt} = \frac{dS/dt}{dS/dp} \quad \text{Equação A.2. 6}$$

O volume do sistema foi, então, calculado pela Equação A.2. 7.

$$V_S = \frac{P}{l} \frac{T_{amb}}{T_{CNTP}} A P_{alim} \frac{P_{CNTP}}{dp/dt} \quad \text{Equação A.2. 7}$$

onde V_S = volume do sistema, em cm³;

P/l = permeabilidade da membrana, em cm³/cm².s.cmHg;

T_{amb} = temperatura em que o teste foi realizado, em K;

T_{CNTP} = temperatura de referência, em K;

A = área de permeação, em cm²;

P_{alim} = pressão de alimentação, em cmHg;

P_{CNTP} = pressão de referência, em cmHg;

dp/dt = é a variação da pressão com o tempo, em cmHg/s.

Determinação da curva de calibração do sistema

A calibração do sistema de permeação de gases foi efetuada conectando-se a entrada da célula de permeação hermeticamente fechada e sem membrana a um manômetro do tipo coluna líquida. A variação de pressão (p) do sistema, determinada pelo deslocamento da água na coluna, provocou uma correspondente alteração no sinal (S) fornecido pelo voltímetro. Portanto, a inclinação dS/dp foi usada para converter o sinal do voltímetro em pressão.

A.2.4. Resultados e discussão

A.2.4.1. A água como plastificante do PVA

O efeito plastificante da água nos filmes de PVA foi determinado através da comparação entre as propriedades térmicas e de transporte dos grãos do polímero com as membranas preparadas por evaporação do solvente, ou seja, da água. Os filmes produzidos possuíam aspecto homogêneo e transparente, com espessura média de 20 μm .

As curvas da análise termogravimétrica das amostras de PVA – grãos e membrana – são apresentadas na Figura A.2. 2. Esta técnica foi empregada para avaliar o perfil de degradação térmica da amostra. A partir destes ensaios, é possível inferir a respeito do teor de substâncias voláteis, bem como o tipo de arranjo existente entre as cadeias do polímero, que promoverá a ocorrência dos eventos de perda de massa em temperaturas maiores ou menores.

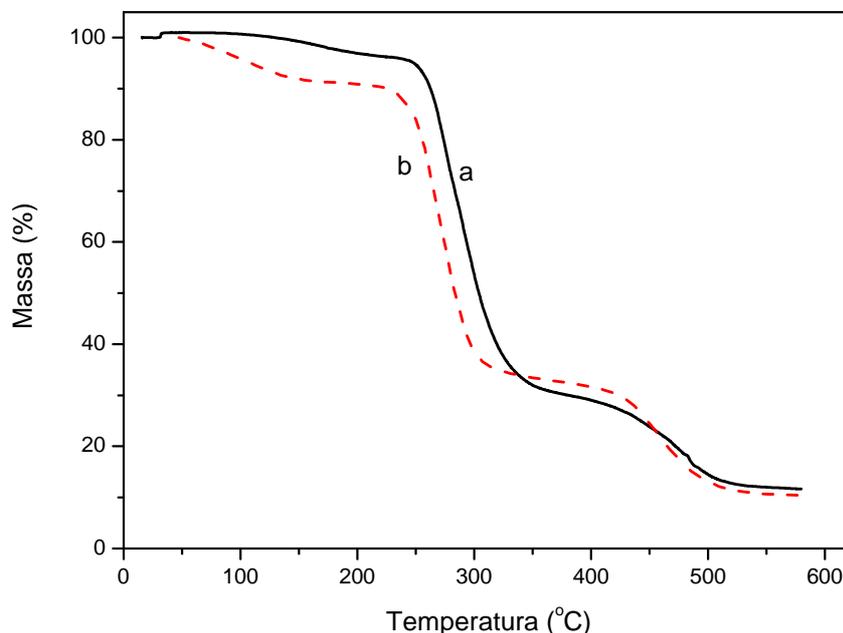


Figura A.2. 2: Curvas de termogravimetria para o PVA em grãos (a) e membrana (b).

O perfil de degradação dos grãos do polímero está de acordo com a literatura (MCNEIL, 1997). Dois principais eventos de perda de massa podem ser destacados. O primeiro, de 250 a 350°C, é atribuído às reações entre os grupos hidroxila vizinhos, com

eliminação de ácido acético. O estágio seguinte, sem alteração de massa, corresponde a uma reticulação térmica, que é seguida pela cisão da cadeia polimérica principal para temperaturas maiores que 450°C. A perda de massa dos grãos do polímero até 250°C deve-se à presença de substâncias voláteis, principalmente água, que representam apenas 1,8% da amostra. Esta umidade presente no PVA consiste na razão de se efetuar a secagem do polímero antes da pesagem para o preparo da solução de espalhamento.

Para as membranas de PVA, as principais diferenças no perfil de degradação são o teor de substâncias voláteis, cerca de 7,6% em massa, e o perfil de degradação em temperaturas ligeiramente mais baixas comparadas aos grãos do polímero. Estas observações denotam o aumento da hidrofilicidade do material e a diminuição da estabilidade térmica do filme em consequência da adição de água durante a síntese das membranas.

As curvas de DSC obtidas para as amostras de PVA são apresentadas na Figura A.2. 3. A partir desta técnica, podem ser quantificadas a temperatura de transição vítrea do polímero, T_g , além da temperatura e da entalpia de fusão, T_m e ΔH_m . De modo semelhante à análise termogravimétrica, estes parâmetros fornecem informações sobre o arranjo molecular do PVA, permitindo avaliar os efeitos da plastificação das membranas pelos solventes empregados.

Os resultados obtidos indicam uma grande similaridade entre as curvas de DSC para as amostras, exceto pelo fato de que a T_g , a T_m e o ΔH_m da membrana são menores do que os valores obtidos para os grãos do polímero. A redução da T_g da membrana é um indício de que a adição de água muda a conformação das cadeias do PVA, sendo necessária uma menor quantidade de energia para promover o aumento da mobilidade segmental. Alie-se a isto o fato de que tanto a T_m quanto o ΔH_m foram diminuídos, indicando menor teor de cristalinidade da membrana. Tomados em conjunto, estes resultados indicam que houve plastificação do PVA pela água, já que as moléculas do solvente promoveram um aumento na maleabilidade dos filmes e consequente decréscimo dos domínios cristalinos que impedem a permeação de substâncias através destas membranas.

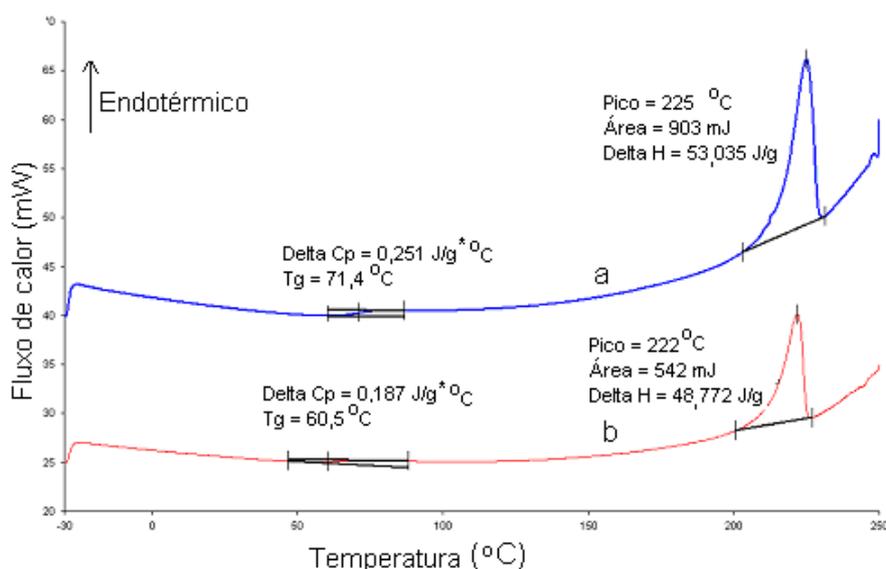


Figura A.2. 3: Curvas de DSC para o PVA em grãos (a) e membrana (b).

Testes de permeação de oxigênio e nitrogênio foram realizados usando o sistema padrão existente no laboratório. Entretanto, não foi possível quantificar a permeabilidade da membrana, uma vez que o limite de detecção do equipamento é de 0,05 Barrer. Na Tabela A. 2. 1: Permeabilidade do PVA aos principais gases atmosféricos (MULDER, 1996), são apresentados os valores médios de permeabilidade do PVA ao oxigênio e ao nitrogênio encontrados na literatura (MULDER, 1996).

Tabela A. 2. 1: Permeabilidade do PVA aos principais gases atmosféricos (MULDER, 1996).

Permeante	Permeabilidade (Barrer)
Oxigênio	0,0019
Nitrogênio	0,00057

A seletividade ideal das membranas de PVA para a mistura O₂/N₂ é de 3,3, que é um valor razoável. Entretanto, vale considerar que, atuando como plastificante do polímero, a água exerce um papel fundamental na permeabilidade e seletividade das membranas, podendo levar a uma alteração significativa nas propriedades de transporte ao longo do tempo. De fato, o emprego do PVA como embalagens de alimentos é limitado devido à perda de suas propriedades de barreira aos gases atmosféricos em função do aumento da umidade do ar (POCKEL, 1960, TOYOSHIMA, 1973).

Embora a água tenha se mostrado um plastificante para o PVA, a magnitude das alterações provocadas na morfologia do polímero foi pequena. A necessidade de utilização de plastificantes mais eficientes para o polímero tornou-se evidente e os glicóis surgiram como uma opção, tanto por sua similaridade estrutural com o PVA, quanto pela manutenção da conformação nativa da mioglobina nos ensaios de dicroísmo circular apresentados no Capítulo 3.

A.2.4.2. Os glicóis como plastificantes do PVA

O aumento da permeabilidade das membranas de PVA através da gelificação do polímero com soluções aquosas contendo PEG 300, etileno glicol ou glicerol foi investigado nesta etapa do trabalho. A utilização dos géis visa a estabilização das membranas líquidas suportadas, já que as perdas do solvente e do transportador são reduzidas. A seleção destas substâncias como plastificantes deve-se ao fato de elas serem investigadas na literatura com este propósito (LIM e WAN, 1994). Além de apresentar compatibilidade com o polímero, o plastificante deve aumentar a flexibilidade dos filmes produzidos, reduzindo sua cristalinidade e facilitando seu manuseio. Assim, propriedades como a temperatura de transição vítrea e a permeabilidade aos gases são bons parâmetros para avaliar as transformações causadas na matriz do polímero (TOYOSHIMA, 1973).

- PEG 300

A investigação do oligômero PEG 300 como plastificante das membranas de PVA foi realizada para razão mássica glicol/polímero de 0,5, 1 e 2. Entretanto, não foi observada compatibilidade entre os materiais, com separação visível de fases durante a etapa de secagem das membranas. Os filmes apresentaram uma coloração esbranquiçada, conforme apresentado na Figura A.2. 4. Desta forma, maior ênfase foi dada ao estudo do glicerol e do etileno glicol como plastificantes.



Figura A.2. 4: Fotografia da membrana de PVA plastificada por PEG 300, razão mássica oligômero/polímero igual a 2.

- Etileno glicol

A plastificação das membranas de PVA pelo etileno glicol foi avaliada variando-se a razão mássica entre o glicol e o polímero de 3 a 12. As membranas preparadas por evaporação da mistura de solventes apresentaram aspecto heterogêneo, com regiões transparentes entrecortadas por domínios opacos, indicando a ocorrência de separação de fases. Os testes de caracterização e desempenho foram efetuados na região transparente, provavelmente a fase enriquecida no polímero, por corresponder a uma maior área. A espessura média dos filmes foi de 40 μm .

As curvas de TGA das amostras plastificadas por etileno glicol são apresentadas na Figura A.2. 5. Os perfis de degradação térmica observados para as amostras contendo este glicol foram semelhantes à membrana de PVA usada como controle. Distinguem-se três principais estágios de perda de massa: a saída de substâncias voláteis até 250°C, uma queda mais acentuada na curva que provavelmente corresponde à formação de polienos e eliminação de ácido acético de 250 a 350°C, seguida pela ruptura da cadeia principal acima de 450°C. Comparativamente, as membranas contendo etileno glicol apresentaram uma pequena redução da estabilidade térmica e um aumento no teor de voláteis, como resultado da plastificação.

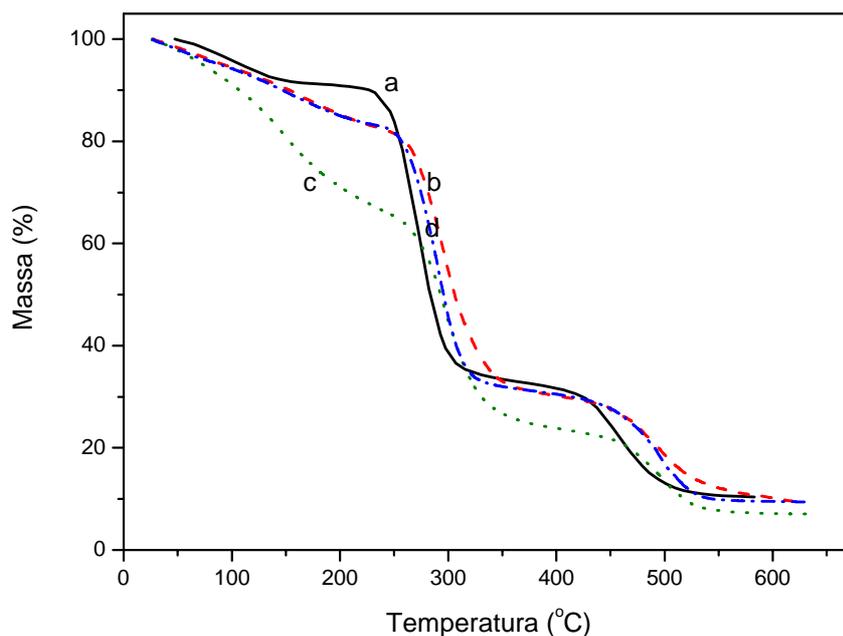


Figura A.2. 5: Curvas de termogravimetria para os filmes de PVA plastificados por etileno glicol. a) Membrana de PVA (controle), b) razão mássica etileno glicol/PVA = 3, c) razão mássica etileno glicol/PVA = 6, d) razão mássica etileno glicol/PVA = 10.

A amostra cuja razão glicol/polímero é 6 apresentou uma elevada fração de voláteis, cerca de 35% em massa, provavelmente correspondente à mistura de solventes. Como não foi observado o mesmo comportamento para as demais amostras, acredita-se que nesta condição ocorra a maior incorporação de etileno glicol na fase transparente.

As curvas de DSC correspondentes ao primeiro aquecimento das amostras contendo etileno glicol são apresentadas na Figura A.2. 6. Não foi possível identificar a T_g das membranas, indicando que houve uma redução deste parâmetro para valores inferiores a 50°C , o que comprova a efetividade da plastificação do PVA por este glicol.

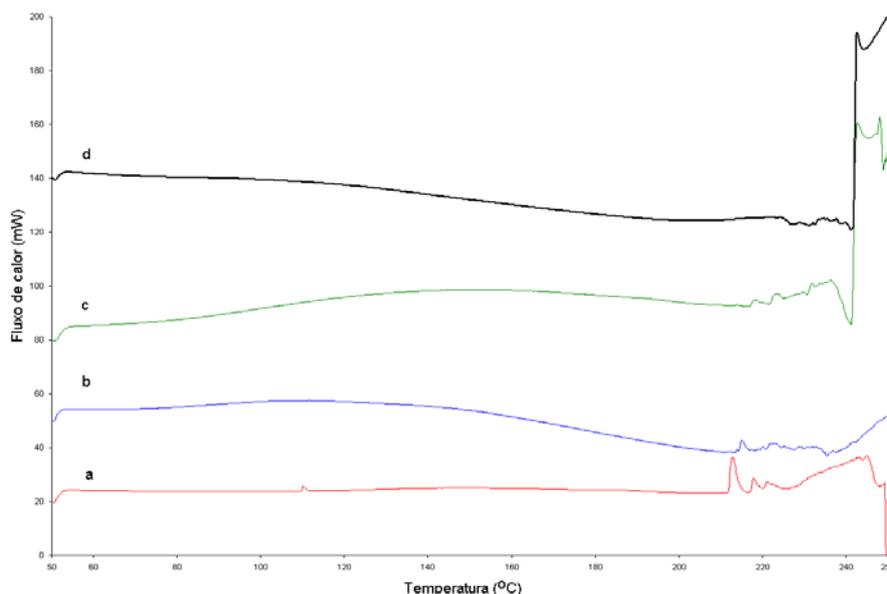


Figura A.2. 6: Curvas de DSC para os filmes de PVA plastificados por etileno glicol. a) razão mássica etileno glicol/PVA = 3, b) razão mássica etileno glicol/PVA = 6, c) razão mássica etileno glicol/PVA = 9, d) razão mássica etileno glicol/PVA = 12.

Uma análise comparativa das curvas revela diferenças no perfil à medida que o teor de etileno glicol aumenta. Para uma razão etileno glicol/PVA igual a 3, o teor de cristalinidade é semelhante ao filme plastificado pela água, embora a T_m seja menor, indicando que a interação com as moléculas do glicol modificou a organização das cadeias poliméricas na unidade cristalina. Como resultado, menos energia foi requerida para fundir estes cristalitos.

Para maiores teores de etileno glicol, a formação de cristais perfeitos é consideravelmente reduzida. Pode-se notar o aparecimento de um pico espalhado, de 80 a 180°C, usualmente atribuído à formação de géis físicos. Nestes sistemas, os inúmeros cristalitos nascentes são incapazes de crescer mais, provavelmente devido às resistências difusivas causadas pelo aumento de viscosidade da solução com a evaporação dos solventes. Portanto, o gel é formado como uma rede tridimensional, cujos pontos de junção são estes pequenos cristais (VIDAL *et al.*, 1999). As curvas c e d mostram a ebulição de substâncias voláteis, provavelmente a mistura de solventes, acima de 240°C, conforme observado em trabalhos correlatos (WANG *et al.*, 2003).

Uma vez caracterizada a plastificação do PVA pelo etileno glicol, com redução da T_g e da cristalinidade das amostras, a permeabilidade aos gases O_2 e N_2 foi investigada através de testes de permeação. Os resultados são apresentados na Figura A.2. 7.

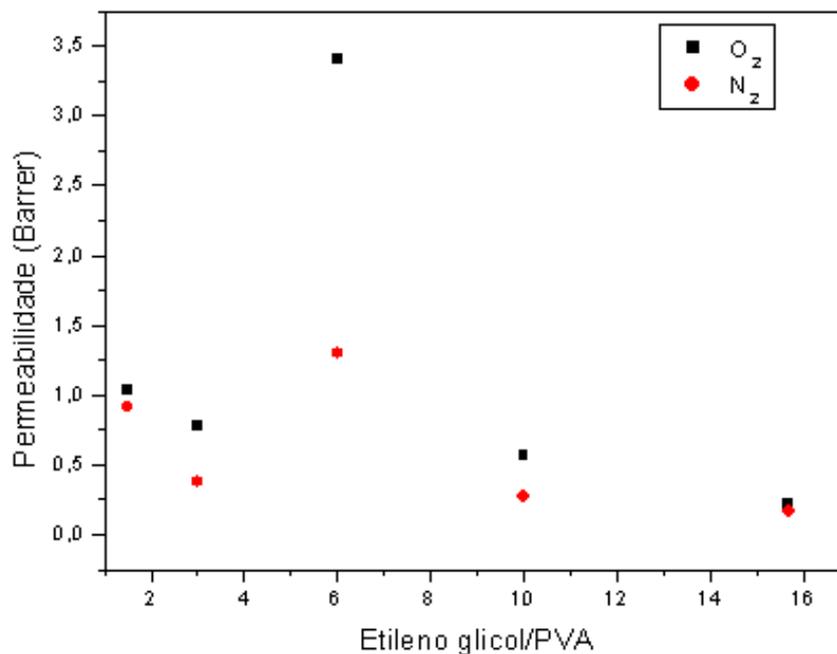


Figura A.2. 7: Permeabilidades das membranas de PVA plastificadas por etileno glicol ao oxigênio e ao nitrogênio.

Os valores obtidos variaram de 0,25 a 3,5 Barrer. A maior permeabilidade foi observada para a amostra com razão mássica etileno glicol/PVA igual a 6, que, estranhamente, também corresponde à maior seletividade, conforme observado na Figura A.2. 8.

Novos ensaios foram realizados com o objetivo de confirmar a tendência observada nestes testes, uma vez que era esperada uma diminuição na seletividade como resultado de uma maior plastificação da membrana. Como não houve reprodutibilidade, o comportamento da permeabilidade da amostra cuja razão etileno glicol/PVA é 6 foi avaliado ao longo do tempo, efetuando-se testes com oxigênio e nitrogênio alternadamente. Os resultados são apresentados na Figura A.2. 9. A denominação membrana 1 e 2 corresponde às réplicas investigadas.

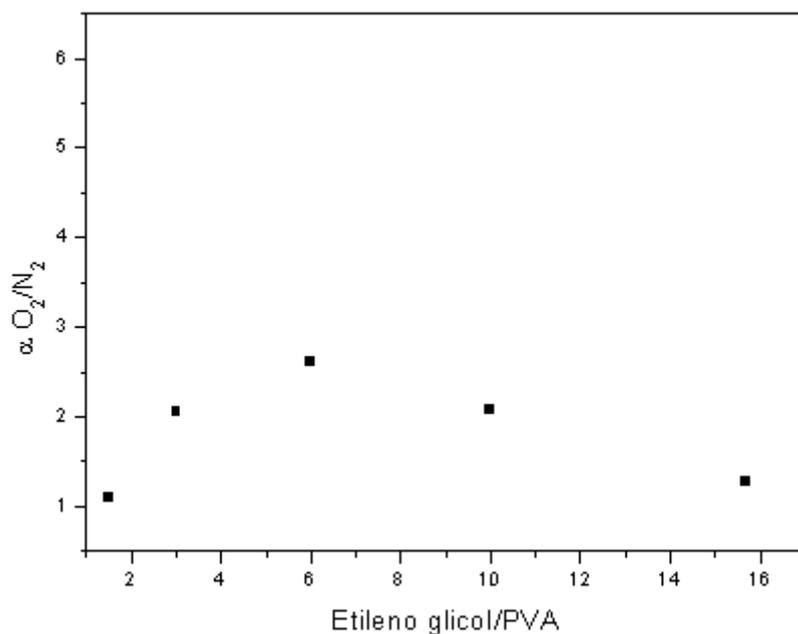


Figura A.2. 8: Seletividade O_2/N_2 das membranas de PVA plastificadas por etileno glicol.

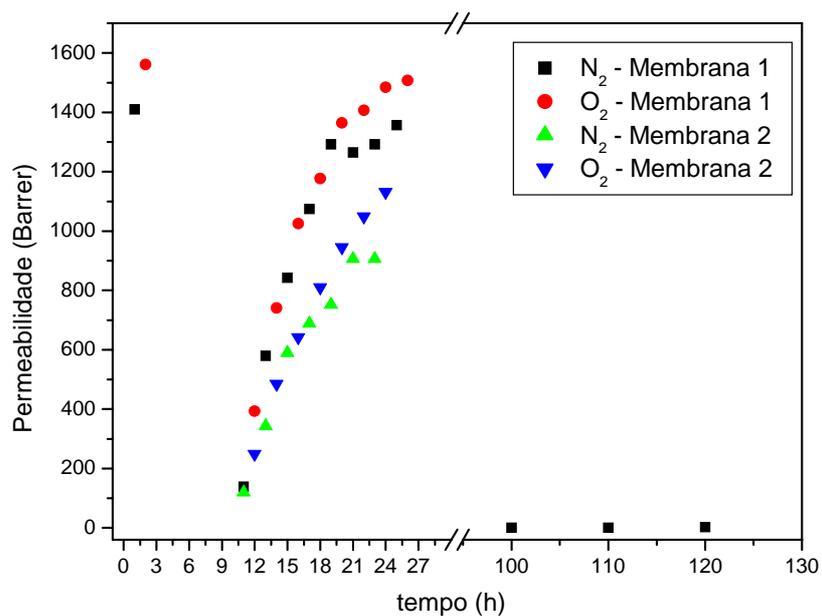


Figura A.2. 9: Variação da permeabilidade ao O_2 e ao N_2 ao longo do tempo. Membranas com razão etileno glicol/PVA igual a 6.

A permeabilidade variou de 0,2 a 1600 Barrer, indicando que a ocorrência da separação de fases para o sistema água/etileno glicol/PVA ocorre mesmo nas regiões visualmente transparentes da membrana. O decréscimo abrupto da permeabilidade 10 dias após os primeiros ensaios pode ser atribuído ao envelhecimento do filme hidrofílico (HUANG e

PAUL, 2004). A complexidade dos arranjos da rede tridimensional neste sistema ternário tem sido bastante estudada visando a determinação do tipo de mecanismo que governa a separação de fases: a decomposição espinodal ou a cristalização (HONG *et al.*, 2000).

Durante os testes de permeação, observou-se também a sinerese dos filmes de PVA plastificados com etileno glicol. Uma fotografia da membrana é apresentada na Figura A.2. 10.

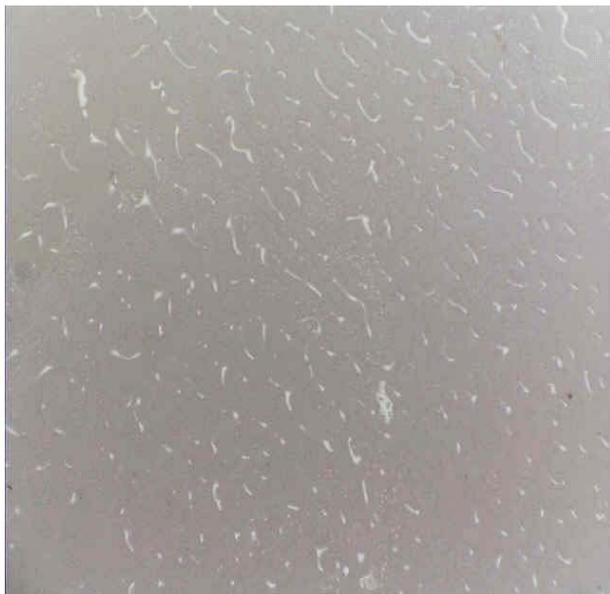


Figura A.2. 10: Fotografia da membrana de PVA plastificada pelo etileno glicol evidenciando a ocorrência de sinerese (gotas de líquido na superfície da membrana).

Este fenômeno, também observado por LIM e WAN (1994), é o resultado da remoção da mistura de solventes dos interstícios das cadeias poliméricas durante a contração volumétrica dos filmes, indicando reorganização das cadeias e aumento dos domínios cristalinos.

Métodos alternativos para a síntese das membranas foram investigados, como a adição de uma etapa de filtração da solução antes do espalhamento, para evitar a presença de partículas que atuassem como núcleos para o início da cristalização, além da secagem dos filmes a 100°C, com o objetivo de remover mais água do sistema. Entretanto, não foi possível obter filmes homogêneos, conforme apresentado na Figura A.2. 11. Observou-se uma dispersão de gotículas transparentes em uma matriz opaca, evidenciando a separação de fases que ocorreu no sistema.

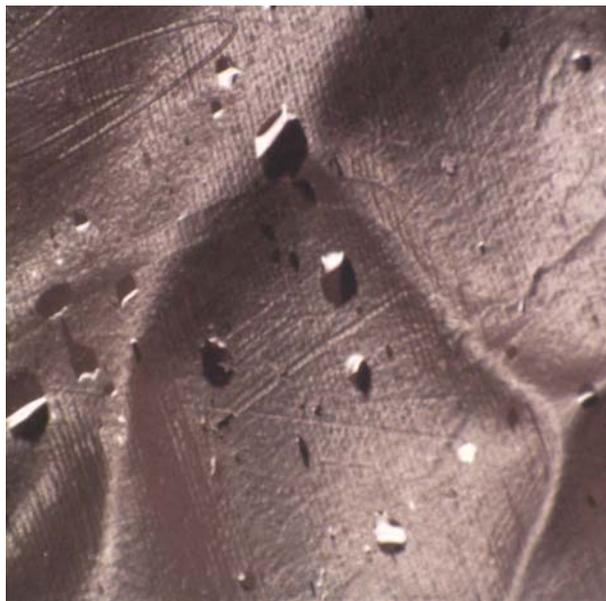


Figura A.2. 11: Fotografia da membrana de PVA plastificada pelo etileno glicol ilustrando a separação de fases nos filmes obtidos após filtração e secagem a 100°C.

Cabe ressaltar que o PVA utilizado nestes testes apresenta quase 100% de hidrólise, o que aumenta ainda mais os sítios de interação deste polímero com os plastificantes investigados, através de pontes de hidrogênio. Isto tende a favorecer a formação de géis físicos, responsáveis em grande parte pelas variabilidades encontradas (STEPHANS e FOSTER, 1998, HONG *et al.*, 1998 e 2001). Com base na complexidade do sistema água/etileno glicol/PVA, o glicerol foi investigado como plastificante dos filmes e os resultados são apresentados na seção a seguir.

- Glicerol

A plastificação das membranas de PVA pelo glicerol foi investigada variando-se a razão mássica entre o glicol e o polímero de 3 a 15,7, este último valor correspondente ao sistema sem adição de água. Foram obtidos filmes transparentes e maleáveis, com espessura média igual a 40 μm .

As curvas de termogravimetria para as amostras plastificadas pelo glicerol são apresentadas na Figura A.2. 12. Tomando como referência a membrana de PVA preparada sem a adição de glicóis, observou-se uma redução na estabilidade térmica, pois os eventos de perda de massa ocorreram em temperaturas inferiores. Além disso, distinguem-se apenas dois estágios principais de degradação: o primeiro correspondente

à saída de voláteis, principalmente água e glicerol, que compreendem cerca de 16% em massa dos filmes e o segundo, atribuído à decomposição do material. O estágio intermediário correspondente a uma reticulação térmica das membranas preparadas usando água como solvente foi suprimido.

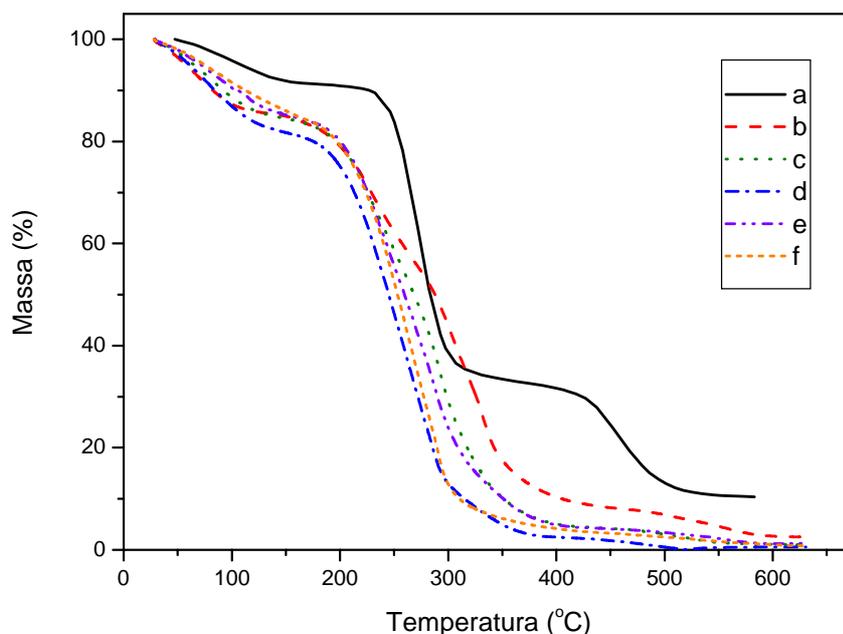


Figura A.2. 12: Curvas de termogravimetria para os filmes de PVA plastificados pelo glicerol. a) Membrana de PVA (controle), b) razão mássica glicerol/PVA = 3, c) razão mássica glicerol/PVA = 6, d) razão mássica glicerol/PVA = 9, e) razão mássica glicerol/PVA = 12, f) razão mássica glicerol/PVA = 15,7.

Não houve alteração significativa do perfil de degradação em função do aumento do teor de glicerol nas membranas, exceto pelo fato de que para uma razão mássica glicerol/PVA igual a 3, houve maior resistência à degradação térmica. Portanto, pode-se inferir que a razão mássica ótima é de 6, já que maiores concentrações de glicerol não alteram as propriedades térmicas da membrana significativamente. Talvez isso se explique pela impossibilidade de as moléculas do glicol serem incorporadas efetivamente entre as cadeias do polímero, levando a uma segregação do material.

As curvas de DSC para as amostras contendo glicerol são apresentadas na Figura A.2. 13. Nestes testes, a temperatura máxima de aquecimento foi fixada em 200°C, devido à pequena estabilidade térmica das membranas nos ensaios de TGA.

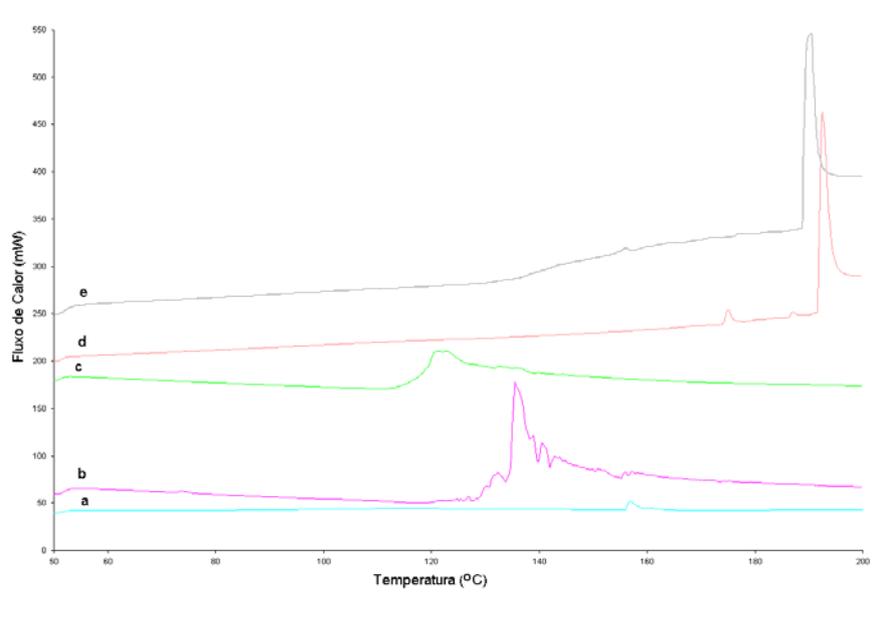


Figura A.2. 13: Curvas de DSC para os filmes de PVA plastificados pelo glicerol. a) razão mássica glicerol/PVA = 3, b) razão mássica glicerol/PVA = 6, c) razão mássica glicerol/PVA = 9, d) razão mássica glicerol/PVA = 12, e) razão mássica glicerol/PVA = 15,7.

Não foi possível determinar a T_g das amostras a partir das curvas obtidas. Há indícios de que o valor seja inferior a 30°C , ou seja, abaixo da temperatura de início dos ensaios de DSC. Esta redução significativa na T_g comprova o efeito plastificante do glicerol nas membranas de PVA.

Para o sistema com razão glicerol/PVA de 3 g/g, houve uma redução no teor cristalino do polímero em comparação com a membrana usada como referência, ou seja, sem adição de glicóis. Provavelmente isto reflete o impedimento espacial provocado pela adição do glicerol, que restringe a organização das cadeias nas unidades cristalinas características do polímero.

As amostras com razão glicol/polímero iguais a 6 e a 9 demonstraram o aparecimento de estruturas organizadas que se fundem em torno de 120°C . Entretanto, a baixa temperatura necessária para fundir estes cristalitos indica que o glicerol limitou a organização típica das cadeias em cristais, levando à formação de um outro tipo de estrutura.

Membranas com maiores teores de glicerol evidenciaram a ausência de cristalinidade dos filmes, bem como a ebulição da mistura de solventes em temperaturas maiores que

200°C. De modo análogo, acredita-se que o excesso de moléculas da mistura de solventes tenha impedido a organização das cadeias do polímero. Durante o aquecimento, a ebulição deste solvente livre indicou que o limite de incorporação do glicol na cadeia polimérica já tinha sido alcançado, embora os filmes continuassem com aspecto visual transparente.

O comportamento da permeabilidade aos gases oxigênio e nitrogênio das membranas de PVA em função do teor de glicerol é apresentado na Figura A.2. 14. Os testes foram realizados em duplicata e o desvio de cada condição experimental pode ser visualizado através da barra de erro.

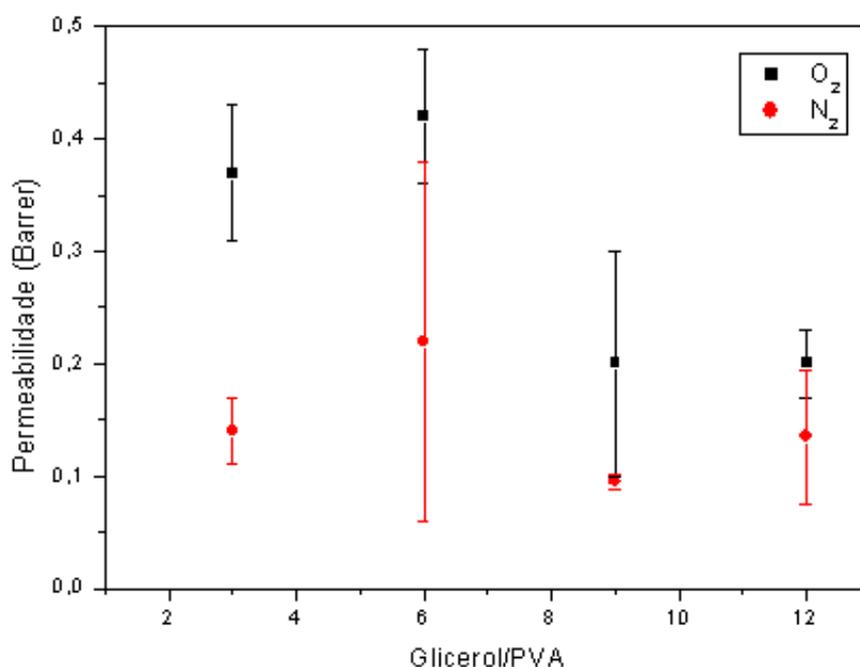


Figura A.2. 14: Permeabilidades ao oxigênio e ao nitrogênio das membranas de PVA plastificadas pelo glicerol.

As permeabilidades variaram de 0,1 a 0,5 Barrer, indicando plastificação efetiva pelo glicerol, já que estes valores são 300 vezes maiores que as membranas de PVA sem glicóis. Os valores obtidos estão de acordo com o esperado para este sistema, que é de 0,3 Barrer, segundo MILLER e LUTZMANN (1985). Outra observação que merece destaque é o comportamento da permeabilidade, que permanece aproximadamente constante, indicando uma elevada plastificação das membranas na faixa investigada. A síntese de membranas a partir da dissolução de PVA em glicerol, portanto, sem a adição

de água, mostrou-se inviável, já que a temperatura necessária para a evaporação do solvente é maior do que a de início da degradação térmica do polímero.

Embora os valores ligeiramente maiores de permeabilidade ao oxigênio e ao nitrogênio – iguais a 0,4 e a 0,21, respectivamente – tenham sido obtidos para a membrana que apresentou maior concentração de estruturas organizadas nos ensaios de DSC, a maior variabilidade observada também nesta condição fornece indícios de que a amostra apresente heterogeneidades significativas. A ocorrência de sinerese nestas amostras corrobora a observação de flutuações nas propriedades da membrana em função da cristalinidade.

A seletividade ideal calculada para as membranas é mostrada na Figura A.2. 15. Observou-se que os valores foram mantidos praticamente constantes com o aumento do teor de glicerol nas membranas, o que não era esperado, já que uma maior plastificação deve promover um decréscimo na seletividade, já que o componente não desejado pode ser mais facilmente co-transportado na matriz plastificada. Esta observação reforça a hipótese de o excesso de moléculas de glicerol não foi incorporado às cadeias do PVA, originando propriedades de transporte semelhantes em toda a faixa investigada.

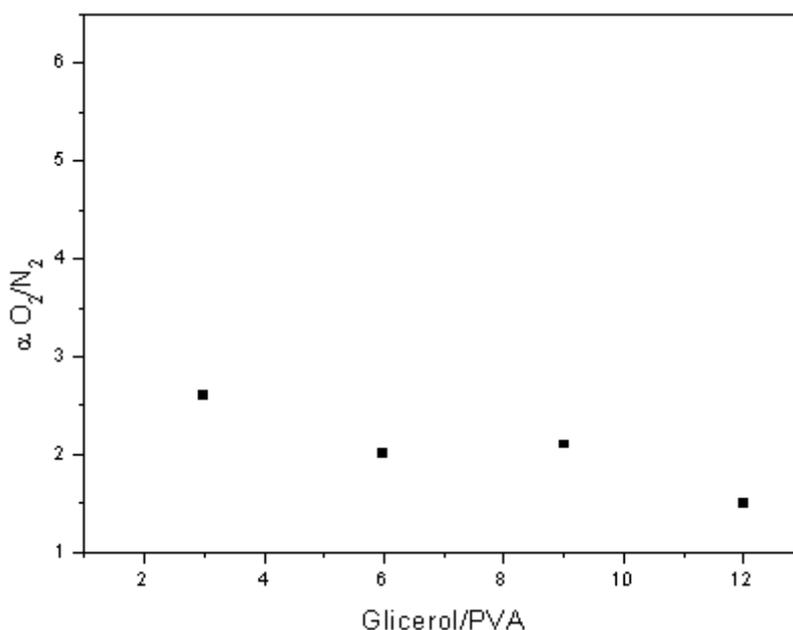


Figura A.2. 15: Seletividade O_2/N_2 das membranas de PVA plastificadas por glicerol.

Estes resultados indicam que, muito embora o glicerol tenha promovido uma plastificação efetiva das membranas de PVA, com redução da T_g dos filmes e aumento da permeabilidade aos gases O_2 e N_2 , a variabilidade observada nos testes requer a investigação da plastificação para concentrações menores do glicol. Nestes novos ensaios, o estudo do arranjo das cadeias e de sua influência nas propriedades de transporte das membranas, permitirá uma maior estabilidade das membranas ao longo do tempo. Entretanto, a redução do teor de glicerol nos filmes reduzirá a permeabilidade do PVA, que já é muito inferior a alguns polímeros elastoméricos, como o poli(dimetil siloxano), por exemplo, e consiste em uma aplicação efetiva limitada tendo em vista o escopo deste trabalho.

A.2.5. Conclusão

A investigação de glicóis como plastificantes das membranas de PVA foi efetuada visando a estabilização das membranas líquidas suportadas através da gelificação do polímero. Os resultados revelaram que o PEG 300 não possui compatibilidade com o poli(álcool vinílico), com separação de fases e formação de filmes esbranquiçados. Já o glicerol e o etileno glicol apresentaram maior afinidade pelo PVA, dando origem a filmes transparentes, em sua maioria. O efeito plastificante destes dois glicóis foi comprovado por meio da redução da temperatura de transição vítrea, diminuição da cristalinidade e aumento da permeabilidade das membranas aos gases O_2 e N_2 . Tomadas em conjunto, estas propriedades refletem um aumento da mobilidade segmental do PVA como resultado da adição do glicerol e do etileno glicol às membranas.

Estudos de reprodutibilidade e testes de longa duração mostraram uma elevada flutuação das propriedades das membranas plastificadas, como resultado da formação de estruturas organizadas e contração volumétrica dos filmes ao longo do tempo. Esta instabilidade do material revelou uma pequena afinidade entre o PVA e a mistura de solventes empregada para a síntese das membranas.

A.2.6. Referências bibliográficas

BAKER, R. W., 2004, *Membrane technology and applications*, 2nd Ed., New York, John Wiley & Sons Ltd.

- BAKER, R. W., 2002, "Future directions of membrane gas separation technology", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 41, n. 6 (Mar), pp. 1393-1411.
- CHEN, X. S., NISHIDE, H., TSUCHIDA, E., 1996, "Analysis of facilitated oxygen transport in a liquid membrane of hemoglobin", *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v. 69, n. 1 (Jan), pp. 255-259.
- FERRAZ, H. C., 2003, *Membranas de transporte facilitado para separação de oxigênio utilizando biotransportadores*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- HEMMINGSSEN, E., SCHOLANDER, P. F., 1960, "Specific transport of oxygen through hemoglobin solutions – Why is this transport abolished when opposed by a slight back pressure of oxygen?", *Science*, v. 132, n. 3437, pp. 1379-1381.
- HONG, P.-D., CHOU, C.-M., HE, C.-H., 2001, "Solvent effects on aggregation behavior of polyvinyl alcohol solutions", *Polymer*, v. 42, n. 14 (Jun), pp. 6105-6112.
- HONG, P.-D., CHOU, C.-M., HUANG, H.-T., 2000, "Phase separation behavior in polyvinyl alcohol/ethylene glycol/water ternary solutions", *European Polymer Journal*, v. 36, n. 10 (Oct), pp. 2193-2200.
- HONG, P.-D., CHEN, J.-H., WU, H.-L., 1998, "Solvent effect on structural change of poly(vinyl alcohol) physical gels", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 69, n. 12 (Sep), pp. 2477-2486.
- HUANG, Y., PAUL, D. R., 2004, "Physical aging of thin glassy polymer films monitored by gas permeability", *Polymer*, v. 45, n. 25 (Nov), 8377-8393.
- JANG, J., LEE, D. K., 2004, "Oxygen barrier properties of biaxially oriented polypropylene/polyvinyl alcohol blend films", *Polymer*, v. 45, n. 5 (Mar), pp. 1599-1607.
- KIM, M. J., PARK, Y. I., YOUM, K. H. et al., 2004, "Gas permeation through water-swollen polysaccharide/poly(vinyl alcohol) membranes", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 91, n. 5 (Mar), pp. 3225-3232.
- LIM, L. Y., WAN, S. C., 1994, "The effect of plasticizers on the properties of polyvinyl alcohol films", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 20, n. 6, pp. 1007-1020.
- MCNEILL, I. C., 1997, "Thermal degradation mechanisms of some addition polymers and copolymers", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 40-41, (May), pp. 21-41.
- MILER, G. W., LUTZMANN, H. H., 1985, "Plasticized polyvinyl alcohol compositions, forming process and formed articles", *U.S. Patent*, 4.536.532.
- MULDER, M., 1996, *Basic Principles of Membrane Technology*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- PARK, Y. I., LEE, K. H., 2001, "Preparation of water-swollen hydrogel membranes for gas separation", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 80, n. 10 (Jun), pp. 1785-1791.
- POCKEL, I., 1960, "Polyvinyl alcohol resin plasticized with ethyl acid phthalate", *U. S. Patent*, 2.963.461.

- STEPHANS, L. E., FOSTER, N., 1998, "Magnetization-transfer NMR analysis of aqueous poly(vinyl alcohol) gels: effect of hydrolysis and storage temperature on network formation", *Macromolecules*, v. 31, n. 5 (Mar), pp. 1644-1651.
- TAKESHITA, H., KANAYA, T., NISHIDA, K., *et al.*, 2001, "Spinodal decomposition and syneresis of PVA gel", *Macromolecules*, v. 34, n. 22 (Oct), pp. 7894-7898.
- TOYOSHIMA, K., 1973, "General properties of polyvinyl alcohol in relation to its applications", IN: FINCH, C. A. (Ed.), "*Polyvinyl alcohol – Properties and applications*", chapter 2 and 14, Londres, John Wiley & Sons.
- VIDAL, M. M. B., GIL, M. H., DELGADILLO, I., *et al.*, 1999, "Swelling and thermal properties of poly(vinyl alcohol) containing hemoglobin membranes", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 14, n. 3 (May), pp. 243-257.
- WANG, R., WANG, Q., LI, L., 2003, "Evaporation behaviour of water and its plasticizing effect in modified poly(vinyl alcohol) systems", *Polymer International*, v. 52, n. 12 (Dec), pp. 1820-1826.
- ZOU, J., HO, W. S. W., 2006, "CO₂-selective polymeric membranes containing amines in crosslinked poly(vinyl alcohol)", *Journal of Membrane Science*, v. 286, n. 1-2 (Dec), pp. 310-321.

Anexo 3:

Propriedades do poli(álcool vinílico)

O poli(álcool vinílico), PVA, é preparado a partir da alcoólise do poli(acetato de vinila). As características do polímero obtido variam de acordo com o grau de polimerização e de hidrólise, este último relacionado à extensão de grupos acetato que permanecem na molécula.

O PVA é caracterizado pela presença de hidroxilas, responsáveis pela hidrossolubilidade e reatividade. É um polímero atático, mas exibe cristalinidade porque os grupos –OH são pequenos o suficiente para se ajustar aos interstícios do cristal.

Os grupos -OH aumentam a intensidade da interação inter e intramolecular. O polímero hidrolisado se funde de 232 a 235°C, enquanto aqueles com 12% de acetilação apresentam uma T_m de 195°C (MILER e LUTZMANN, 1985). A umidade reduz a estabilidade térmica do material, que se decompõe por perda de água a partir de duas hidroxilas adjacentes, em temperaturas maiores que 150°C. Esta reação de decomposição origina ligações duplas na cadeia carbônica, que podem alterar a coloração do polímero.

A solubilidade do PVA em água depende dos graus de polimerização e, principalmente, de hidrólise do polímero. Grandes quantidades de grupos hidroxila promovem uma elevada afinidade pela água, com formação de ligações de hidrogênio fortes inter e intramoleculares entre os grupos –OH, reduzindo a solubilidade em água. Por outro lado, os grupos acetato residuais do PVA parcialmente hidrolisado são essencialmente hidrofóbicos e enfraquecem as interações entre os grupos hidroxila adjacentes. O aumento no grau de acetilação aumenta a solubilidade em água (TOYOSHIMA, 1973). Apresentam-se, na Figura A.3.1, as solubilidades em água do PVA com diferentes graus de polimerização e de hidrólise em função da temperatura.

A viscosidade das soluções aquosas de PVA também é muito dependente do grau de hidrólise do polímero. As curvas de energia aparente de escoamento de soluções

aquosas de PVA 100% hidrolisado são apresentadas na Figura A.3.2. Há dois pontos de inflexão: um correspondente a 2-4% e outro a 10-12% do polímero. Acredita-se que as estruturas destas soluções antes e depois dos pontos de inflexão sejam diferentes, uma vez que o tipo de interação entre as cadeias aumenta muito acima de 10% do PVA, aumentando a viscosidade.

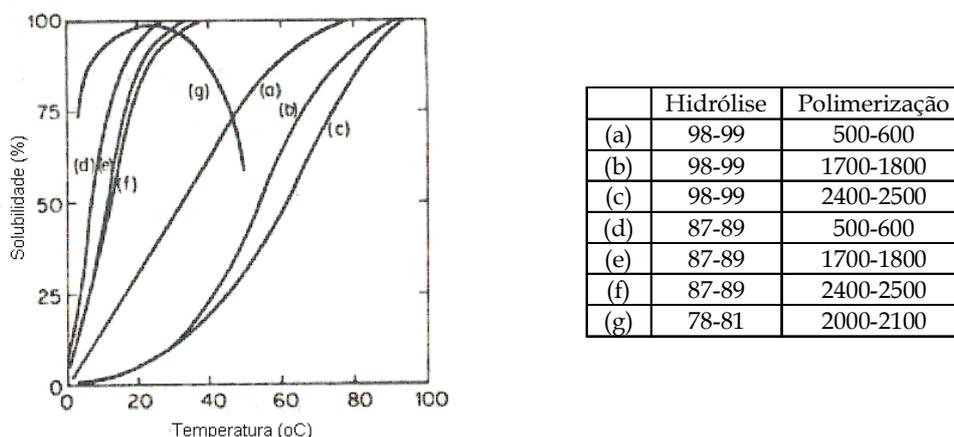


Figura A.3.1: Solubilidade em água em função da temperatura para diversos tipos de PVA. (TOYOSHIMA, 1973).

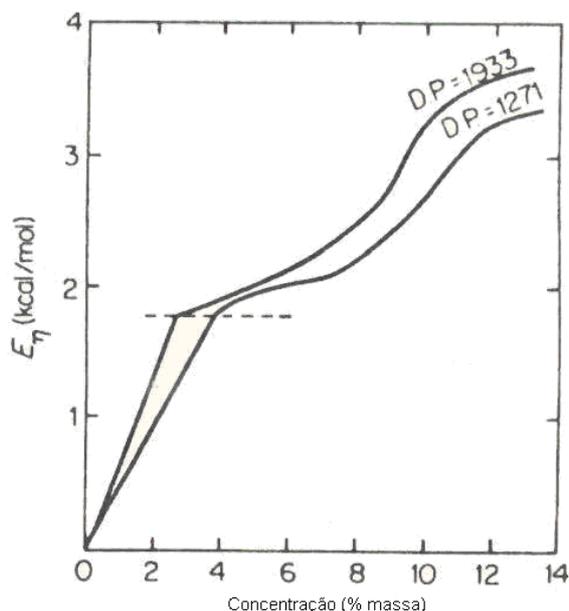


Figura A.3.2: Energia de ativação aparente de escoamento E_{η} em função da concentração de soluções aquosas de PVA com elevado grau de hidrólise (TOYOSHIMA, 1973).

As soluções aquosas de PVA com grau de hidrólise elevado (maior que 98%) não são estáveis. Elas podem sofrer uma série de reações de gelificação reversíveis ou

irreversíveis, resultando em um aumento de viscosidade através da formação de produtos insolúveis.

A gelificação pode ser definida como a formação de uma rede tridimensional pela reticulação física ou química. Quando ocorre gelificação, uma solução polimérica diluída é convertida em um sistema de viscosidade infinita, isto é, um gel. Um gel pode ser considerado um sólido muito elástico, tipo borracha. A gelificação pode ocorrer em sistemas onde há separação de fases, mas também em sistemas homogêneos, consistindo de polímero e solvente. No caso de polímeros semi-cristalinos, como o PVA, a gelificação frequentemente é iniciada pela formação de micro-cristais, pequenas regiões ordenadas, que são núcleos para o processo de cristalização, mas sem a habilidade de crescer muito. Entretanto, estes micro-cristais podem conectar várias cadeias poliméricas e, então, uma rede tridimensional é formada. Por causa de sua natureza cristalina, estes géis são termossensíveis, isto é, com o aquecimento, os cristais se fundem e a solução pode escoar novamente (MULDER, 1996).

O desenvolvimento de uma rede física é muito afetado pelas condições de dissolução e armazenamento do polímero. De um modo geral, o aumento da viscosidade com o tempo é favorecido pelo aumento da concentração do polímero e diminuição da temperatura, como apresentado na Figura A.3.3.

A diminuição do grau de hidrólise do polímero estabiliza as soluções aquosas de PVA, conforme apresentado na Figura A.3.4. Observa-se que a viscosidade de soluções contendo PVA com 88% de hidrólise é constante com o tempo, em contraste com o aumento observado para o PVA com 99% de hidrólise. Este fenômeno indica que o aumento da concentração de grupos acetato residuais impede o empacotamento das moléculas, devido a distúrbios espaciais. Isso reduz a cristalinidade e facilita a dispersão, ou seja, a interação polímero/solvente (TOYOSHIMA, 1973). A concentração crítica de grupos acetato requerida para romper as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares responsáveis pela formação da rede para PVA com grau de polimerização entre 1250 e 1300 é de 3%, segundo STEPHANS e FOSTER (1998).

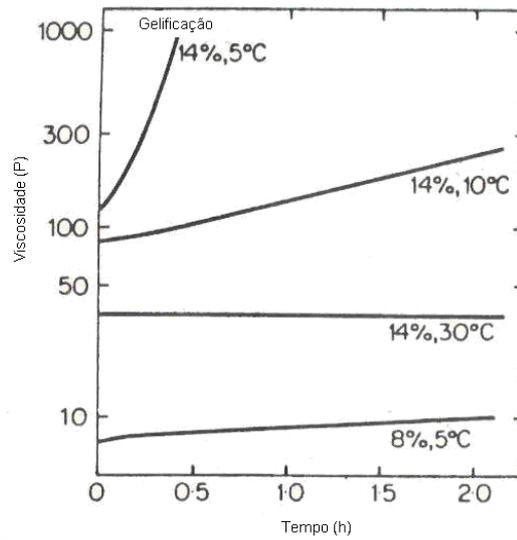


Figura A.3.3: Variação na viscosidade de soluções aquosas de PVA com o envelhecimento. PVA com grau de polimerização de 1700 e 1800, com grau de hidrólise de 98 a 99% (TOYOSHIMA, 1973).

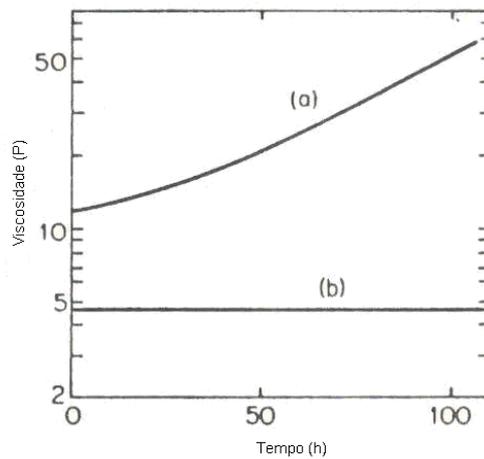


Figura A.3.4: Variação na viscosidade de soluções aquosas de PVA com o envelhecimento ($T = 5^{\circ}\text{C}$, 8% em massa do polímero). (a) PVA com grau de polimerização de 1700 a 1800 e hidrólise de 98 a 99% e (b) PVA com grau de polimerização de 1700 a 1800 e hidrólise de 87 a 89%. (TOYOSHIMA, 1973).

Referências bibliográficas

- MILER, G. W., LUTZMANN, H. H., 1985, “Plasticized polyvinyl alcohol compositions, forming process and formed articles”, *U.S. Patent*, 4536532.
- MULDER, M., 1996, *Basic Principles of Membrane Technology*, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- STEPHANS, L. E., FOSTER, N., 1998, “Magnetization-transfer NMR analysis of aqueous poly(vinyl alcohol) gels: effect of hydrolysis and storage temperature on network formation”, *Macromolecules*, v. 31, n. 5 (Mar) pp. 1644-1651.
- TOYOSHIMA, K., 1973, “General properties of polyvinyl alcohol in relation to its applications”, IN: FINCH, C. A. (Ed.), “*Polyvinyl alcohol – Properties and applications*”, chapter 2 and 14, Londres, John Wiley & Sons.

Anexo 4:

FTIR como ferramenta para a determinação da estrutura secundária de proteínas

A técnica de espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier, FTIR, baseia-se na interação da matéria com a energia luminosa com comprimento de onda variando de 750 nm a 1 mm. Esta faixa de frequência engloba uma série de fenômenos eletrônicos, como o estiramento de ligações químicas e a torção de grupos em relação ao restante da molécula (ARKIN, 2006). No caso da análise de proteínas, o acoplamento de modos vibracionais devido à proximidade dos átomos, o deslocamento de frequências devido à formação de ligações de hidrogênio e a orientação de grupos em relação à molécula pode viabilizar a determinação da estrutura secundária destas biomoléculas (SONG *et al.*, 1992).

Os primeiros relatos da utilização de FTIR com este propósito datam de 1986 e, desde então, a facilidade e a rapidez na aquisição de dados aliadas à melhoria da resolução dos equipamentos impulsionaram o desenvolvimento da técnica (SUREWICZ *et al.*, 1993). Além disso, a vantagem do emprego de FTIR em relação à difração de raios X e ao RMN favoreceu ainda mais as pesquisas. A análise de raios X de proteínas, por exemplo, requer a formação de cristais perfeitos, o que nem sempre é possível, além de não representarem o ambiente fisiológico das proteínas (SUREWICZ *et al.*, 1993). No caso da análise de RMN, a massa molar das proteínas que pode ser detectada com precisão se limita a 20 kDa (SUREWICZ *et al.*, 1993). Portanto, a utilização da técnica de FTIR para a determinação estrutural de proteínas é especialmente interessante no caso das proteínas de membrana, que se encontram na dupla camada lipídica (SUREWICZ *et al.*, 1993, TATULIAN, 2003). Além disso, a turbidez do meio não influencia os resultados (SUREWICZ *et al.*, 1993).

Nas proteínas, a absorção é característica da cadeia polipeptídica. O modo dominante é chamado de amida I e compreende o estiramento da ligação C=O (acoplado com a torção da ligação N—H e o estiramento da ligação C—N) entre 1600 e 1700 cm^{-1} . Esta frequência tem sido utilizada para determinação da estrutura secundária de proteínas: α -hélices exibem uma banda com absorção máxima em torno de 1655 cm^{-1} , enquanto folhas- β apresentam banda de absorção em 1630 cm^{-1} e outra, de menor intensidade, em 1690 cm^{-1} (ARKIN, 2006). Já o modo amida II, em torno de 1545 cm^{-1} , é sensível à troca de hidrogênio (TATULIAN, 2003). Entretanto, o estudo destas moléculas biológicas frequentemente está associado a algumas limitações, como a interferência causada pela água, que possui absorção em frequência de 1600 a 1630 cm^{-1} (ARKIN, 2006), além do fato de a largura das bandas ser maior que as diferenças entre as vibrações individuais (ARKIN, 2006, SUREWICZ *et al.*, 1993), o que permite a inferência apenas das propriedades médias.

Apesar da crescente aplicação da técnica de FTIR, os aspectos quantitativos da análise ainda são controversos. A manipulação matemática do espectro deve ser realizada para determinar a estrutura devido à sobreposição de bandas. Os métodos, em geral, baseiam-se no estreitamento das bandas ou no reconhecimento de padrões (SUREWICZ *et al.*, 1993). Diversos trabalhos vêm sendo publicados visando melhorar os métodos matemáticos usados na determinação da estrutura (GOORMAGHTIGH *et al.*, 2006) ou mesmo modificar as proteínas pelas substituição dos átomos por isótopos (ARKIN, 2006), de modo que haja deslocamento do espectro para uma região de mais fácil visualização.

A investigação dos padrões de absorção da mioglobina pela técnica de FTIR tem sido efetuada para determinar a estrutura desta proteína em filmes (NASSAR *et al.*, 1995, WANG *et al.*, 2004). Neste meio, a transferência de elétrons da proteína é muito favorecida. Isso pode ser explicado tanto pela orientação desfavorável da proteína em solução, que pode aumentar consideravelmente a distância entre o sítio ativo hemo e a superfície sólida do eletrodo, como pela adsorção de impurezas. Entretanto, não foram obtidas referências detalhadas em relação à interpretação dos resultados obtidos.

Referências bibliográficas

- ARKIN, I. T., 2006, "Isotope-edited IR spectroscopy for the study of membrane proteins", *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 10, n. 5 (Oct), pp. 394-401.
- GOORMAGHTIGH, E., RUYSCHAERT, J. M., RAUSSENS, V., 2006, "Evaluation of the information content in infrared spectra for protein secondary structure determination", *Biophysical Journal*, v. 90, n. 8 (Apr), pp. 2946-2957.
- NASSAR, A. E. F., WILLIS, W. S., RUSLING, J. F., 1995, "Electron transfer from electrodes to myoglobin: facilitated in surfactant films and blocked by adsorbed biomacromolecules", *Analytical Chemistry*, v. 67, n. 14 (Jul), pp. 2386-2392.
- TATULIAN, S. A., 2003, "Attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids", *Biochemistry*, v. 42, n. 41 (Oct), pp. 11898-11907.
- SONG, Y. P., PETTY, M. C., YARWOOD, J., *et al.*, 1992, "Fourier transform infrared studies of molecular ordering and interactions in langmuir-blodgett films containing nitrostilbene and stearic acid", *Langmuir*, v. 8, n. 1 (Jan), pp. 257-261.
- SUREWICZ, W. K., MANTSCH, H. H., CHAPMAN, D., 1993, "Determination of protein secondary structure by fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment", *Biochemistry*, v. 32, n. 2 (Jan), pp. 389-394.
- WANG, Q., LU, G., YANG, B., 2004, "Myoglobin/sol-gel film modified electrode: direct electrochemistry and electrochemical catalysis", *Langmuir*, v. 20, n. 4 (Feb), pp. 1342-1347.