

MEMBRANAS DE TRANSPORTE FACILITADO PARA SEPARAÇÃO DE
OXIGÊNIO UTILIZANDO BIOTRANSPORTADORES

Helen Conceição Ferraz


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.

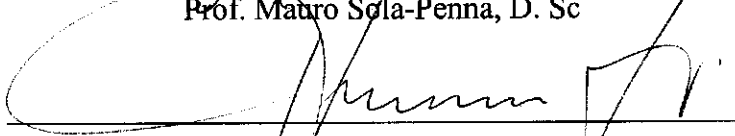
Aprovada por:


Prof. Cristiano Piacsek Borges, D. Sc.


Prof. Tito Livio Moitinho Alves, D. Sc.


Prof. Denise Maria G. Freire, D. Sc.


Prof. Mauro Sola-Penna, D. Sc.


Prof. Orlando B. Martins, D. Sc.


Prof. Ronaldo Nobrega, D. Sc.


Prof. Maury Saddy, Ph. D.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
JULHO DE 2003

FERRAZ, HELEN CONCEIÇÃO

Membranas de Transporte Facilitado para
Separação de Oxigênio Utilizando Bio-
transportadores [Rio de Janeiro] 2003

XVI, 179 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ,
D.Sc., Engenharia Química, 2003)

Tese – Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Membranas de Transporte Facilitado
2. Oxigênio
3. Mioglobina
4. DNA recombinante

I. COPPE/UFRJ II. TÍTULO (série)

Certa palavra dorme na sombra
de um livro raro.
Como desencantá-la ?
É a senha da vida
a senha do mundo.
Vou procurá-la.

Vou procurá-la a vida inteira
no mundo todo.
Se tarda o encontro, se não a encontro,
não desanimo,
procuro sempre.

Procuro sempre, e minha procura
ficará sendo
minha palavra.

(A Palavra Mágica - Carlos Drummond de Andrade)

Meus pais, Hilson e Inalva, pelo amor e pela completa doação;
Meu irmão Juninho, por ser tão especial, nosso orgulho;
Minha querida irmã Carla, por tudo,
principalmente por Icaro, nosso tesouro;
Roberto, por iluminar a minha Vida;
Dedico esse trabalho a vocês, com muito amor e eterna gratidão.

Agradecimentos

Agradeço a todos que, de alguma forma, me apoiaram na realização desse trabalho. Em especial:

- Minha família, pelo amor e incentivo incondicionais. Um obrigada especial aos meus tios, Inaldo e Nelcy, “meus pais” aqui no Rio.
- Luttia, pela amizade e apoio em todos os momentos. Gabriela, querida amiga, sempre presente mesmo distante.
- Prof. Tito, pela atenção e preciosa ajuda. Prof. Cristiano, pela confiança, interesse e dedicação a esse trabalho.
- Márcia, Cristina, Rodrigo, Cláudio, Cecília e todos os amigos do PAM, por tornarem os dias de trabalho bem mais divertidos.
- Rosane, Beht e Roberto, pela inestimável ajuda que sempre recebi, assim como todos os funcionários do PEQ.
- Prof. Reginaldo Menezes, pela gentileza e valiosas discussões sobre fermentação.
- Prof. Olson, pela acolhida na Universidade Rice, e pela atenção e experiência transmitida. Também Eileen, Yi Dou, Rachel, Erin, Eden, Lucian, Dave, Noriaki, pela disposição em ajudar e pelo carinho com que fui recebida.
- Rafael, meu guia em Houston, pela amizade, nunca vou agradecer o suficiente. E também Daniela e Rubia, por ajudarem a me sentir em casa mesmo estando tão longe.

Acima de tudo, agradeço a Deus, Infinitamente Bom, por mais esta vitória.

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

MEMBRANAS DE TRANSPORTE FACILITADO PARA SEPARAÇÃO DE OXIGÊNIO UTILIZANDO BIOTRANSPORTADORES

Helen Conceição Ferraz

Julho/2003

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

Cristiano Piacsek Borges

Programa: Engenharia Química

Neste trabalho, foi investigado o uso de mioglobina em membranas de transporte facilitado para separação de oxigênio. As estratégias investigadas para estabilizar a mioglobina contra a autooxidação foram: produção de proteínas recombinantes e substituição do centro metálico de ferro para cobalto. Uma das mioglobinas mutantes produzidas (a mutante dupla 29F68F) apresentou uma redução de 3,5 vezes na taxa de autooxidação a 37 °C, comparativamente à mioglobina selvagem, enquanto para outra mutante simples (a mioglobina 29F), a taxa de oxidação foi 30% menor. Com a substituição por cobalto, o tempo de meia-vida passou de 13 h para mais de 96 h.

Os resultados obtidos com as membranas líquidas foram bastante expressivos. Para a pressão de 3 cmHg, obteve-se uma permeabilidade ao O₂ de 1600 Barrer e uma seletividade de 21 com uma membrana líquida contendo 60 g/L de mioglobina nativa de baleia. Membranas de poliálcoolvinílico (PVA) contendo mioglobina apresentaram desempenho semelhante às membranas líquidas. Além disto, a imobilização promoveu uma estabilização contra a autooxidação da mioglobina de até 3 vezes.

O tempo de meia-vida para a cobalto-mioglobina mutante 29F imobilizada em uma membrana de PVA operada a 7 °C foi estimado com sendo superior a 3 anos. Este resultado, aliado ao bom desempenho das membranas em termos de permeabilidade e seletividade, constitui uma contribuição significativa no campo de separação de oxigênio utilizando membranas de transporte facilitado.

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

FACILITATED TRANSPORT MEMBRANES FOR OXYGEN SEPARATION USING BIOCARRIERS

Helen Conceição Ferraz

July/2003

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves

Cristiano Piacsek Borges

Department: Chemical Engineering

The aim of this work was to develop chemically stable carriers exhibiting high oxygen selectivity to be used in facilitated transport membranes for air fractioning. Strategies adopted in order to increase myoglobin stability were preparation of cobalt-substituted proteins (CoMbs) and construction of recombinant proteins. Mutation designed by 29F68F resulted in a resistance to oxidation 3,5 times higher than that observed for a wild type myoglobin at 37 °C. To the 29F mutant, oxidation rate was 30% lower at these conditions. CoMbs exhibited a remarkable stability, at least ten times higher than the correspondent FeMb.

Liquid membranes (LM) were obtained by impregnating a nylon microporous support with a myoglobin aqueous solution. Results were very promising. A LM containing a 60 g/L aqueous solution of native myoglobin showed an O₂ permeability of 1600 Barrer and an O₂/N₂ selectivity of 21, at 25 °C and 3 cmHg. On the other hand, membranes made of Polyvinylalcohol (PVA) constituted a good alternative to the problem of lack of operational stability exhibited by LM. Besides, immobilization of myoglobin in a polymeric matrix promoted an extra stabilization against autoxidation, giving half-life times about 3 times higher than those for myoglobin in solution. Half-life time of a 29F CoMb immobilized in a PVA membrane at 7 °C was estimated as being as high as 3 years.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 Processos de Separação com Membranas	03
1.2 Biotransportadores de Oxigênio	10
1.3 Objetivos do Trabalho	12
1.4 Estrutura da Tese	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

PARTE I – BIOTRANSPORTADORES DE OXIGÊNIO

CAPÍTULO 2: MIOGLOBINAS E HEMOGLOBINAS

2.1 Hemoglobina.....	21
2.1.1 O Grupo Hemo.....	23
2.1.2 Oxigenação da hemoglobina.....	25
2.2 Mioglobina.....	29
2.2.1 Oxigenação da mioglobina	29
2.3 Hemeritrina	31
2.4 Hemocianina	32
2.5 A Química da Ligação do Oxigênio	35
2.6 Substitutos do Sangue.....	39
2.7 Transporte de O ₂ em Soluções de Hemoglobina	41
2.8 Conclusões	43

CAPÍTULO 3: ESTABILIDADE DA MIOGLOBINA

3.1 Introdução	46
3.2 Estabilidade das Hemo-proteínas em Solução.....	48
3.2.1 Efeito da Concentração de O ₂ Dissolvido.....	50
3.2.2 Efeito da Estrutura da Proteína	52

3.2.3 Efeito do pH da Solução	53
3.2.4 Efeito do agente Nucleofílico	54
3.3 Mecanismos de Oxidação	55
3.3.1 Mecanismo Dissociativo.....	55
3.3.2 Mecanismo Oxidativo.....	56
3.3.3 Deslocamento Redutivo	59
3.4 Estabilização de Hemo-proteínas	62
3.4.1 Efeito de Mutações na Cavidade Distal.....	62
3.4.2 Efeito da Substituição do Metal do Hemo	65
3.4.3 Efeito do Solvente.....	67
3.4.4 Efeito da Adição de Agentes Redutores	68
3.5 Conclusões.....	69

CAPÍTULO 4: PARTE EXPERIMENTAL - I

4.1 Metodologia Experimental	72
4.1.1 Mioglobinas Mutantes	72
4.1.2 Produção de Proteínas Recombinantes	74
4.1.3 Produção de Cobalto-Proteínas.....	75
4.1.4 Afinidade pelo Oxigênio.....	75
4.1.5 Taxa de Autoxidação	76
4.2 Resultados.....	77
4.2.1 Mioglobinas Mutantes	77
4.2.2 Produção de Proteínas Recombinantes	78
4.2.3 Produção de Cobalto-Proteínas.....	78
4.2.4 Afinidade pelo Oxigênio.....	81
4.2.5 Taxa de Autoxidação	84
4.2.5.1 FeMbs	84
4.2.5.2 CoMbs	88
4.3 Conclusões.....	94
ANEXO 1 – Aminoácidos	96
ANEXO 2 – Metodologias Detalhadas.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

PARTE II – MEMBRANAS PARA SEPARAÇÃO DE OXIGÊNIO

CAPÍTULO 5: TRANSPORTE FACILITADO

5.1 Introdução	118
5.2 Aspectos Teóricos.....	120
5.3 Transporte Facilitado de Oxigênio	124
5.4 Membranas Líquidas	125
5.4.1 Mecanismos de Transporte em Membranas Líquidas	128
5.5 Membranas com Transportador Fixo.....	131
5.6 Transportadores de Oxigênio.....	132
5.7 Separação O ₂ /N ₂	138
5.7.1 Membranas com Transportador Fixo	138
5.7.2 Membranas Líquidas	140
5.8 Estabilidade das Membranas	143
5.9 Membranas Líquidas Ultrafinas.....	145
5.10 Transportadores Naturais.....	145
5.11 Conclusões.....	146

CAPÍTULO 6: PARTE EXPERIMENTAL - II

6.1 Metodologia Experimental	149
6.1.1 Caracterização de Suportes e Solventes para a Membrana Líquida.	149
6.1.2 Permeabilidade e Seletividade das Membranas.....	150
6.1.2.1 Membranas Líquidas Contendo Mioglobina e Hemoglobina.....	152
6.1.2.2 Membranas de Transportador Fixo.....	153
6.2 Resultados7	153
6.2.1 Caracterização das membranas.....	153
6.2.2 Membrana Líquida Contendo Hemoglobina	154
6.2.3 Membrana Líquida Contendo Mioglobina	155
6.2.4 Membrana com Transportador Fixo	159
6.3 Conclusões	165
ANEXO 3 – Nomenclatura e Estruturas.....	167
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171

CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	175
--	------------

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo 1

<u>Figuras</u>		Página
Figura 1.1:	Grau de pureza do produto como função da pressão através da membrana para diferentes valores de seletividade.	5
Figura 1.2:	Relação entre permeabilidade e seletividade dos polímeros da Tabela 1.3.	7
Figura 1.3:	Perspectivas futuras para o mercado de membranas no campo de separação de gases.	7
Figura 1.4:	Relação entre permeabilidade e seletividade em membranas poliméricas convencionais comparadas àquelas em membranas de transporte facilitado.	9
 <u>Tabelas</u>		
Tabela 1.1	Requerimento energético específico para produção de oxigênio a partir do ar.	2
Tabela 1.2:	Aplicação de processos com membranas na separação de gases.	3
Tabela 1.3:	Permeabilidade (P) e seletividade (α) de alguns materiais poliméricos.	6

Capítulo 2

<u>Figuras</u>		Página
Figura 2.1:	Representação de um tetrâmero de hemoglobina.	21
Figura 2.2:	Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura (MEV) de um vaso sanguíneo.	22
Figura 2.3:	(A) Transporte de oxigênio pela hemoglobina presente no interior dos eritrócitos, (B) Esquema do processo de transferência do oxigênio dos alvéolos pulmonares para a hemoglobina contida no interior dos eritrócitos.	23
Figura 2.4:	O grupo hemo (Fe-protoporfirina IX).	25
Figura 2.5:	Oxigenação da hemoglobina.	26

Figura 2.6:	Ligações entre as sub-unidades na desoxihemoglobina, que são rompidas durante a oxigenação.	26
Figura 2.7:	Curva de saturação da hemoglobina.	28
Figura 2.8:	Modelo da mioglobina.	29
Figura 2.9:	Curva de saturação da mioglobina, comparada àquela exibida pela hemoglobina.	30
Figura 2.10:	Formas desoxi (à esquerda) e oxi (à direita) da Hemeritrina.	31
Figura 2.11:	Formas desoxi (à esquerda) e oxi (à direita) da Hemocianina.	32
Figura 2.12:	Distribuição eletrônica na molécula do oxigênio, O ₂ .	36
Figura 2.13:	Distribuição dos elétrons nos orbitais <i>d</i> .	36
Figura 2.14:	Comparação entre as teorias de Pauling & Coryell e Weiss para a ligação entre o ferro hemo e a molécula de oxigênio na oxihemoglobina.	38
Figura 2.15:	Representação da estrutura do 1,8-diclorohexadecafluorooctano.	39

Tabelas

Tabela 2.1	Resumo das características das principais proteínas de transporte ou estocagem de O ₂ .	33
Tabela 2.2:	Proteínas envolvidas na reação com o oxigênio.	33
Tabela 2.3:	Proteínas contendo hemo na sua estrutura.	34
Tabela 2.4:	Panorama da atual situação dos substitutos de sangue em fase avançada de testes clínicos.	41

Capítulo 3

<u>Figuras</u>	Página	
Figura 3.1:	Etapas envolvidas na transformação da hemoglobina em metaemoglobina e posterior desnaturação.	47
Figura 3.2:	Formação do oxo-dímeros via intermediários peróxidos nos compostos sintéticos.	48
Figura 3.3:	Papel da matriz globina na estabilidade do complexo FeO ₂ .	49
Figura 3.4:	Dependência da taxa de autooxidação em relação à pressão de oxigênio para a mioglobina eqüina, do músculo cardíaco.	50
Figura 3.5:	Dependência do pH para a taxa de autooxidação da mioglobina de baleia e <i>Aplysia</i> .	53

Figura 3.6:	Mecanismo de autoxidação de mioglobinas.	58
Figura 3.7:	Efeito da concentração de oxigênio na taxa de autoxidação de mioglobina bovina.	59
Figura 3.8:	Diagrama de energia-livre para reações da mioglobina a 25°C.	60
Figura 3.9:	Cavidade distal das formas oxi (A) e desoxi (B) da mioglobina	63
Figura 3.10:	Efeito dos álcoois sobre a autoxidação da hemoglobina.	66

Capítulo 4

<u>Figuras</u>		Página
Figura 4.1:	Mapa do gene sintético da mioglobina.	73
Figura 4.2:	Fotografia do gel de agarose ao final da corrida.	77
Figura 4.3:	Curva de crescimento das mutantes 29F e 29F68F.	78
Figura 4.4:	Espectro de absorção de uma apomioglobina eqüina preparada por extração do hemo com metil-etil-cetona.	79
Figura 4.5:	Curvas de titulação para mioglobina de baleia (Sigma).	80
Figura 4.6:	Fração de oxiCoMb como função da pressão parcial de oxigênio, a 25 °C.	81
Figura 4.7:	Comparação entre a afinidade de CoMbs e FeMbs.	83
Figura 4.8:	Efeito da temperatura na afinidade de CoMbs por O ₂ .	83
Figura 4.9:	Espectro de absorção obtido para a mioglobina eqüina em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.	84
Figura 4.10:	Mudança no espectro de absorção da mioglobina de baleia sofrendo oxidação.	85
Figura 4.11:	Oxidação de FeMb.	86
Figura 4.12:	Oxidação de FeMb em função da temperatura.	87
Figura 4.13:	Espectro de absorção da cobalto-mioglobina de baleia nativa (Sigma).	89
Figura 4.14:	Transição oxi/desoxi para a cobalto-mioglobina de baleia nativa, sob desaeração com N ₂ .	89
Figura 4.15:	Variação do pico de absorção em 425 nm pela adição de oxiCoMb (A) e metCoMb (B).	90
Figura 4.16:	Correlação entre o pico de absorção em 425 nm e a concentração de oxi e metmioglobina presentes em solução.	91
Figura 4.17:	Autoxidação de CoMb de cavalo (A) e (B) e de baleia (C) e (D), ambas nativas.	92

Figura 4.18:	Variação da fração de mioglobina oxigenada com o tempo, expressa em termos da diferença máxima de absorção da solução de proteína quando submetida à reoxigenação.	93
Figura 4.19:	Oxidação de FeMb e CoMb a 50 °C.	94

Tabelas

Tabela 4.1	Valor de P_{50} para as CoMbs recombinantes a 25 °C.	82
Tabela 4.2:	Taxa de autoxidação de FeMbs a 37 °C.	86

Capítulo 5

<u>Figuras</u>		Página
Figura 5.1:	Representação esquemática do processo de separação de gases utilizando membrana.	119
Figura 5.2:	Mecanismos de transporte em membranas poliméricas.	120
Figura 5.3:	Forma típica de uma isoterma de sorção gás em polímero vítreo.	123
Figura 5.4:	Membrana líquida imobilizada em um filme microporoso.	125
Figura 5.5:	Membrana líquida contida em fibras ocas.	123
Figura 5.6:	Configuração de uma membrana líquida contida em fibras ocas em um permeador.	126
Figura 5.7:	Mecanismos de transporte em membranas líquidas.	129
Figura 5.8:	Representação do transporte de oxigênio em uma membrana líquida.	130
Figura 5.9:	Representação da dependência entre a permeabilidade da membrana e a pressão parcial de oxigênio na alimentação, de acordo com o modelo da dupla sorção.	131
Figura 5.10:	Representação esquemática do transporte facilitado de oxigênio em uma membrana com transportador fixo.	132
Figura 5.11:	Valores da energia de ligação para reações de complexação comuns em processos de separação.	133
Figura 5.12:	Estrutura química de um carreador de oxigênio do tipo base de Schiff-cobalto, conhecido como Co(3-MeoSaltmen).	134
Figura 5.13:	Comparação entre o desempenho de membranas líquidas e membranas com transportador fixo.	143

Tabelas

Tabela 5.1	Dados de permeação para o oxigênio em diferentes solventes a 25 °C.	135
Tabela 5.2:	Desempenho de membranas com transportador fixo na separação O ₂ /N ₂ .	141
Tabela 5.3:	Desempenho de membranas líquidas na separação oxigênio/nitrogênio.	142

Capítulo 6

<u>Figuras</u>		Página
Figura 6.1:	Fotografia do sistema experimental de permeação de gás, utilizado para caracterizar as membranas.	151
Figura 6.2:	Curva de permeação do nitrogênio em uma membrana líquida, com e sem o dispositivo de saturação do gás.	154
Figura 6.3:	Efeito da presença da hemoglobina na membrana líquida sobre a permeabilidade do oxigênio.	155
Figura 6.4:	Permeabilidade ao O ₂ e ao N ₂ de uma membrana líquida contendo mioglobina.	156
Figura 6.5:	Efeito da concentração de mioglobina na permeabilidade ao O ₂ da membrana líquida	157
Figura 6.6:	Permeabilidade de uma membrana líquida contendo mioglobina em função da pressão total de cada gás	158
Figura 6.7:	Permeabilidade (A) e Seletividade ao O ₂ (B) da membrana líquida contendo mioglobina, como função da pressão parcial de cada gás.	158
Figura 6.8:	Comparação entre a permeabilidade ao O ₂ da membrana líquida	159
Figura 6.9:	Efeito da adição do agente plastificante (glicerol) na permeabilidade da membrana de PVA.	160
Figura 6.10:	Fotografia da membrana de PVA contendo mioglobina recém-preparada e após uma semana em temperatura ambiente.	161
Figura 6.11:	Comparação entre a estabilidade da mioglobina em solução e imobilizada na membrana de PVA, a 25 °C.	162
Figura 6.12:	Efeito da temperatura na estabilidade da mioglobina quando imobilizada em uma membrana de PVA.	162
Figura 6.13:	Efeito da temperatura na estabilidade da mioglobina em solução.	163
Figura 6.14:	Comparação entre a estabilidade da mioglobina em solução e imobilizada na membrana de PVA, a 7 °C.	163
Figura 6.15:	Membrana de PVA contendo mioglobina totalmente oxidada após 1 semana em temperatura ambiente (A) e regenerada após tratamento com ditionito de sódio (B).	164

Tabelas

Tabela 6.1	Suportes microporosos empregados nos testes preliminares.	150
Tabela 6.2:	Resultado da caracterização das membranas.	154

I NTRODUÇÃO

Este capítulo constitui uma breve introdução aos processos de separação de gases com membranas, com ênfase no fracionamento do ar. Faz-se, então, uma comparação entre os métodos tradicionais e os processos empregando membranas para a produção de oxigênio. Em seguida, discute-se como os conhecimentos na área biomédica de substitutos do sangue podem contribuir para o desenvolvimento de membranas mais adequadas à separação do O₂. Ao final do capítulo, são apresentados os objetivos do trabalho e a estrutura da Tese.

Oxigênio é produzido classicamente pelo processo criogênico, desenvolvido em 1900 por Claude, Linde e Hampson. A separação criogênica envolve as seguintes etapas: compressão do ar; remoção de gás carbônico e água com peneiras moleculares; resfriamento seguido de liquefação do ar; destilação para separação do oxigênio, nitrogênio e argônio (Castle, 2002). Por ser uma tecnologia antiga e já bastante estudada, poucos progressos podem ser esperados em termos de eficiência e economia do processo (Baker et al., 1987).

Outro método para obtenção de oxigênio a partir do ar é o PSA (Pressure-Swing Adsorption), que utiliza peneiras moleculares para atingir a separação desejada (Knoblauch, 1978). Neste processo, o ar é comprimido, resfriado e bombeado através de um leito contendo o adsorvente. Nitrogênio é adsorvido enquanto oxigênio é coletado como produto.

Entretanto, ambos os processos são energeticamente desfavoráveis: os custos com

energia no processo criogênico respondem por mais de 60% dos custos totais de produção e no caso do PSA, esses custos são ainda maiores (Baker et al., 1987, Castle, 2002). Os tipos de produtos e requerimentos energéticos específicos para a produção de oxigênio com vários graus de pureza por estes processos comerciais podem ser vistos na Tabela 1.1.

Métodos alternativos para a produção de oxigênio têm sido investigados e o interesse pelo assunto pode ser avaliado pelas cerca de 430 patentes relacionadas ao fracionamento do ar depositadas nos Estados Unidos apenas na década de 90, 60% das quais relaciona-se a processos não-criogênicos (Castle, 2002). Embora outros métodos tenham sido propostos, os processos com membranas figuram como substitutos ideais. A principal vantagem dos processos de separação empregando membranas (PSM) é a possibilidade de se obter uma melhor separação em condições de operação mais amenas e, conseqüentemente, com menor gasto de energia.

Tabela 1.1: Requerimento energético específico para produção de oxigênio a partir do ar (Matson et al., 1986).

<i>Tipo de processo</i>	<i>Produto</i>	<i>Requerimento energético (kW-h/ton O₂)</i>
Criogênico	O ₂ 99,5%, gás, 1 atm	275-375
Criogênico	Oxigênio líquido	950-1100
Criogênico	O ₂ 90%, gás, 1 atm	250
PSA	O ₂ 90%, gás, 1 atm	400

Membranas poliméricas vêm sendo utilizadas na separação de gases há mais de 100 anos, mas seu uso começou a se intensificar nos últimos 25 anos (Baker, 2002). Data de 1980 a primeira aplicação industrial de membranas nesta área, quando foi implantado um sistema para recuperação de hidrogênio em plantas de amônia. Desde então, o mercado de membranas para separação de gases passou a movimentar em torno de 150 milhões de dólares por ano, com uma estimativa de atingir cerca de 760 milhões em 2020 (Baker, 2002).

A Tabela 1.2 apresenta as principais aplicações das membranas no campo de separação de misturas gasosas. Dentre estas, o fracionamento do ar é potencialmente a aplicação

mais importante, em virtude do seu grande mercado (Baker, 2002). Oxigênio e nitrogênio ocupam, respectivamente, a 3ª e 5ª posições dentre os *commodities* químicos mais produzidos no mundo (Koros e Mahajan, 2000), movimentando mais de 2,3 bilhões de dólares só nos Estados Unidos (Way e Noble, 1992).

Tabela 1.2: Aplicação de processos com membranas na separação de gases (Baker et al., 1991).

<i>Tipos de Mistura</i>	<i>Aplicações</i>
Hidrogênio/Hidrocarbonetos	Recuperação de hidrogênio em refinarias
Hidrogênio/Monóxido de carbono	Gás de síntese
Hidrogênio/Nitrogênio	Gás efluente da síntese de amônia
Água/Ar	Desumidificação do ar
Água/Hidrocarbonetos	Desidratação de gás natural
Gás Sulfídrico/Hidrocarbonetos	Tratamento de gases sulfurados
Hélio/Hidrocarbonetos	Separação do Hélio
Dióxido de Carbono/Hidrocarbonetos	Tratamento de gás ácido
Hidrocarbonetos/Ar	Recuperação dos hidrocarbonetos Controle da poluição
Oxigênio/Nitrogênio	Enriquecimento do ar para indústria química e aplicações médicas

1.1 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS (PSM)

Embora uma infinidade de novos materiais poliméricos venha sendo pesquisada nos últimos anos, basicamente apenas cerca de nove polímeros respondem por 90% dos sistemas implantados para separação de gases utilizando membranas (Baker, 2002). Tal discrepância pode ser compreendida considerando-se os requisitos a serem preenchidos pelos materiais destinados à separação de gases. Dentre eles, o custo, a capacidade de formar membranas estáveis e com resistência mecânica nas condições de operação, a permeabilidade e a seletividade são os mais importantes (Baker, 2002).

A permeabilidade (P) e a seletividade (α) são parâmetros de especial importância. A permeabilidade é calculada pela razão entre o fluxo obtido e a força motriz aplicada. Quanto maior a permeabilidade do material, maior o fluxo do gás e menor a área de

membrana requerida, implicando um menor custo capital. A seletividade pode ser expressa como a razão entre a permeabilidade de cada gás da mistura. Quanto maior a seletividade da membrana, maior a eficiência do processo e menor a força motriz requerida para uma dada separação. Conseqüentemente, os custos operacionais envolvidos serão menores

Os primeiros sistemas para fracionamento do ar, na década de 80, eram baseados em membranas de poli(4-metil-1-penteno), que exibiam uma seletividade O_2/N_2 em torno de 4. Nitrogênio era o produto de interesse e uma pureza de 95% era obtida desta forma. Posteriormente, em 1990, membranas com seletividade em torno de 8 foram empregadas, obtendo nitrogênio com pureza superior a 99%. Atualmente, de 5000 a 10000 plantas para separação de N_2 estão instaladas pelo mundo (Baker, 2002).

Por outro lado, como o ar contém aproximadamente 80 % de nitrogênio, produzir oxigênio puro é uma tarefa bem mais difícil. Ar enriquecido em oxigênio (em torno de 50% de O_2) encontra diversas aplicações, como, por exemplo, no tratamento de efluentes, na indústria de polpa e papel, em processos fermentativos e em aplicações médicas variadas. No entanto, o maior interesse, sem dúvida, está no oxigênio com pureza superior a 99%.

Matson e Lonsdale (1987) fizeram uma análise econômica na qual estimaram o custo de produção do O_2 pelos três métodos citados (criogênico, PSA, PSM). De acordo com seus resultados, concluíram que, utilizando uma membrana com seletividade 20 e permeabilidade 300 Barrer é possível obter oxigênio com 85% de pureza de modo competitivo. Estimativas semelhantes foram feitas mais recentemente (Figoli et al., 2001), as quais inclui também, como variáveis importantes, a temperatura de operação (entre 0 e 40 °C) e a estabilidade operacional da membrana.

A Figura 1.1 mostra como varia a concentração de oxigênio no produto em função da diferença de pressão aplicada através da membrana, para diferentes valores de seletividade (Baker et al., 1987).

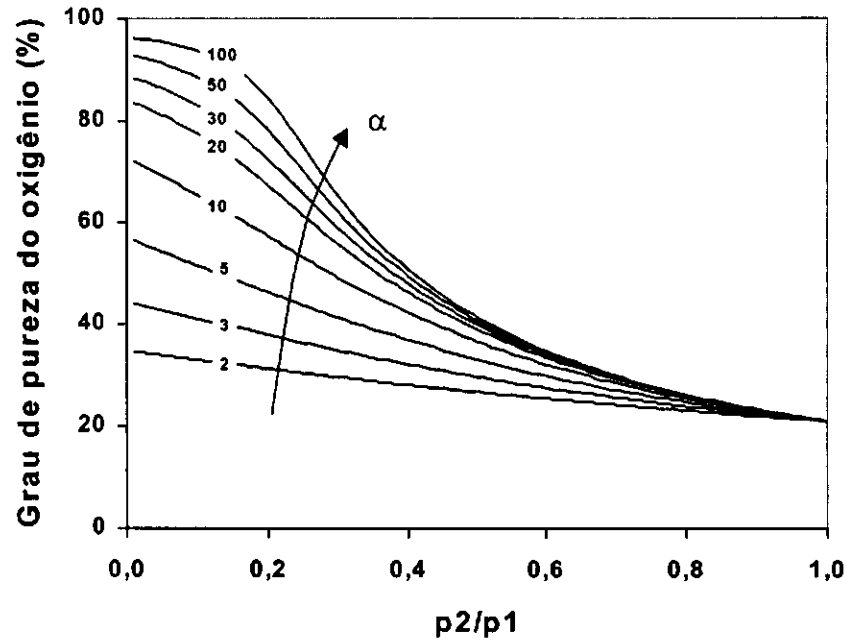


Figura 1.1: Grau de pureza do produto como função da pressão através da membrana (p_2/p_1) para diferentes valores de seletividade (α).

Analisando-se a Figura 1.1, observa-se que o máximo enriquecimento em oxigênio depende exclusivamente da seletividade da membrana e das pressões no lado do permeado e da alimentação. Verifica-se, também que o grau de pureza máximo para uma membrana com seletividade ao oxigênio em torno de 8 é de apenas 65%.

O problema reside justamente no fato de que a seletividade das membranas poliméricas convencionais está restrita a valores entre 1,5 e 8,5, embora a permeabilidade dessas membranas varie em mais de 6 ordens de magnitude, como pode ser visto na Tabela 1.3 ou, graficamente, na Figura 1.2. É possível observar pela Figura 1.2 que seletividade e permeabilidade apresentam tendências opostas nas membranas poliméricas convencionais.

Com base nos materiais existentes e nas perspectivas de crescimento do mercado, Baker (2002) traçou um panorama do futuro das membranas para separação de gás, resumido na Figura 1.3. O uso atual, bem como a expansão dos processos com membranas na produção de oxigênio puro, depara-se com o desempenho limitado das mesmas em termos de permeabilidade e seletividade.

Tabela 1.3: Permeabilidade (P) e seletividade (α) de alguns materiais poliméricos (Baker et al., 1987).

Nº	Polímero	PO ₂ (Barrer)	PN ₂ (Barrer)	α (PO ₂ /PN ₂)
1	Poli(trimetilsilil propeno) ^a	4000	2000	2,0
2	Poli(dimetil siloxano) ^b	600	280	2,2
3	Poli(1-butil acetileno) ^b	200	118	1,7
4	Poli(metil penteno) ^b	37,2	8,9	4,2
5	Poli(trimetilsilano de vinila) ^b	36,0	8,0	4,5
6	Poli(isopreno) ^b	23,7	8,7	2,7
7	Poli(óxido de fenileno) ^b	16,8	3,8	4,4
8	Poliestireno ^b	7,5	2,5	2,9
9	Polietileno ^b	6,6	2,1	2,9
10	Poli(imida) ^b	2,5	0,49	5,1
11	Polipropileno ^b	1,6	0,30	5,4
12	Policarbonato ^b	1,4	0,30	4,7
13	Tetrabromo Bis A policarbonato ^a	1,36	0,18	7,5
14	Borracha butílica ^b	1,3	0,30	4,3
15	Poli(metacrilato de etila) ^c	1,2	0,22	5,2
16	Poli(triazol) ^b	1,1	0,13	8,4
17	Acetato de celulose ^b	0,7	0,25	3,0
18	Poli(fluoreto de vinilideno) ^b	0,24	0,055	4,4
19	Poliamida, nylon-6 ^b	0,093	0,025	2,8
20	Poli(álcool vinílico) ^b	0,0019	0,00027	3,2
21	Poliamida, Kapton ^b	0,001	0,00012	8,0
22	Poli(cloreto de vinilideno) ^c	0,004	0,0008	5,4
23	Borracha de silicone ^c	620	280	2,2
24	Polibutadieno ^c	19,5	6,5	3,0
25	Triacetato de celulose ^b	1,2	0,2	5,9
26	Poli(tetrafluoretileno) ^c	4,2	1,4	3,0

Índices: a- Robeson, 1991; b- Habert et al., 1997; c- Johnson et al. 1987.

Barrer = 10^{-10} cm³(CNTP).cm/(cm².s.cmHg)

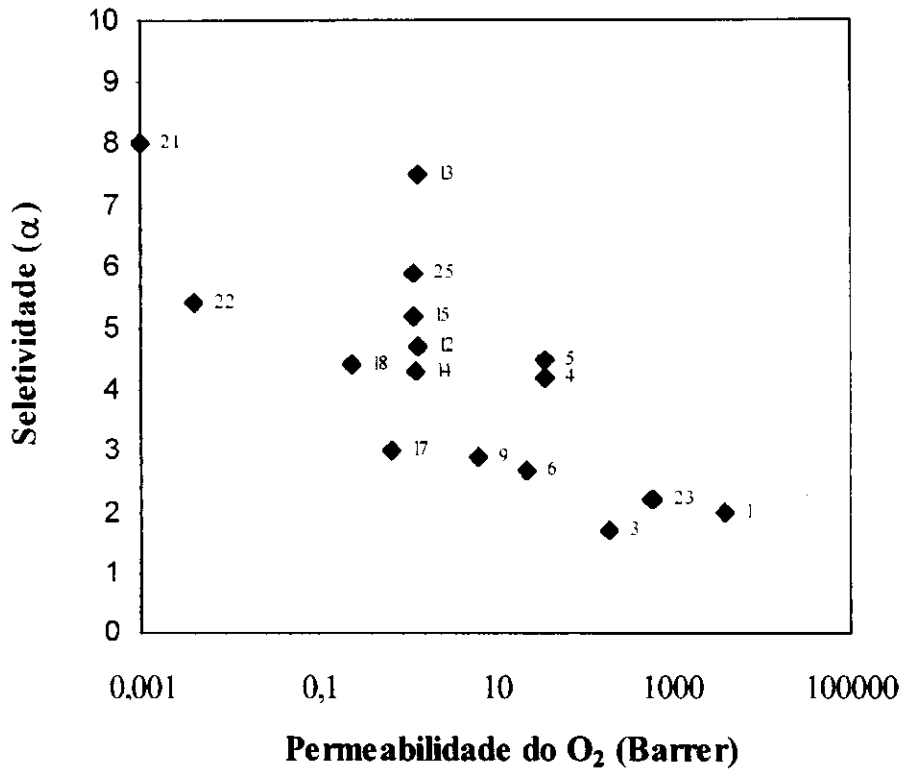


Figura 1.2: Relação entre permeabilidade e seletividade dos polímeros da Tabela 1.3. Os números nos rótulos de dados correspondem ao número de cada polímero na Tabela 1.3.

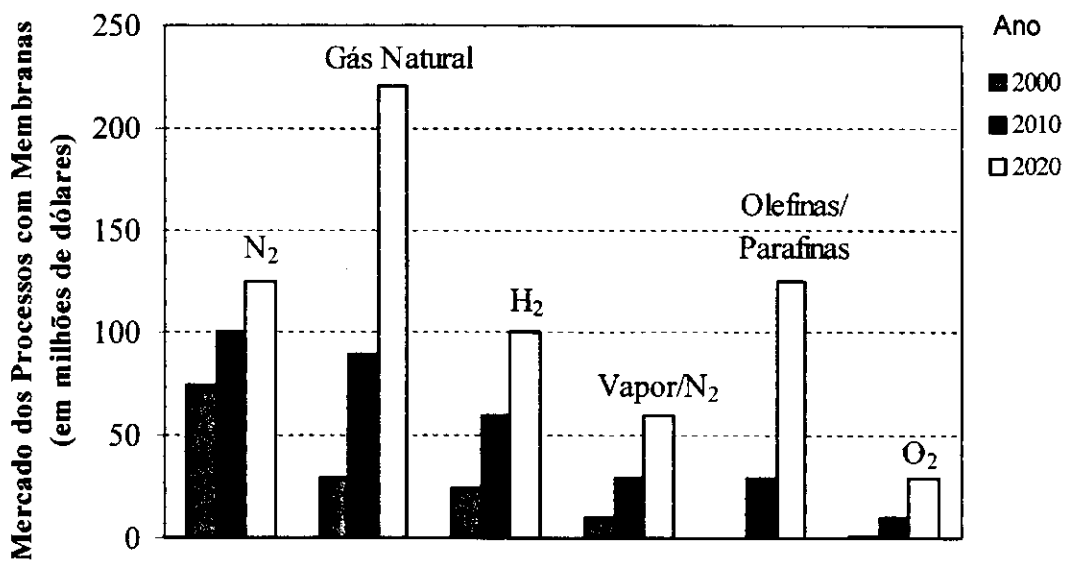


Figura 1.3: Perspectivas futuras para o mercado de membranas no campo de separação de gases (Baker, 2002).

Para que os PSM sejam economicamente competitivos com os tradicionais processos criogênico e PSA na produção de oxigênio com elevado grau de pureza, diferentes estratégias têm sido adotadas (Koros e Mahajan, 2000, Wang et al., 2000).

Uma delas é o uso de copolímeros de siloxano com outros materiais que melhorem sua seletividade e propriedades mecânicas. Membranas de polidimetilsiloxano apresentam alta permeabilidade ao oxigênio, aproximadamente 600 Barrer, mas com uma baixa seletividade, em torno de 2. (Wang et al., 2000). A introdução de grupos funcionais que provocam mudanças estruturais na matriz polimérica de forma a favorecer as propriedades de separação das membranas também tem sido investigada (Hayakawa et al., 1992, Aoki et al., 1995). Outra abordagem consiste no uso de peneiras moleculares de carbono (CMS) produzidas por pirólise de filmes poliméricos. Embora seletividades superiores a 12 possam ser obtidas, a permeabilidade resultante muitas vezes é bem menor que a do material original (Ghosal e Koros, 2000).

A incorporação de agentes complexantes que interagem especificamente com o oxigênio constitui uma alternativa promissora no campo de enriquecimento do ar. A reação de complexação na membrana gera outro mecanismo de transporte em adição à difusão ativada e, por isso, promove o aumento simultâneo da permeabilidade e seletividade da membrana. Este tipo de transporte facilitado do oxigênio tem sido bastante estudado desde o trabalho original de Scholander, em 1960, e bons resultados têm sido relatados na literatura (Figoli et al., 2001).

Como ilustração das melhorias proporcionadas pela presença do agente complexante, a Figura 1.4 mostra uma comparação entre o desempenho de membranas poliméricas convencionais e membranas de transporte facilitado.

Membranas de transporte facilitado constituem uma área de pesquisa onde qualquer avanço significativo pode resultar em enorme impacto comercial. Um aumento no valor da seletividade de 8 para 12, por exemplo, pode representar uma economia de 15% nos custos de produção do O₂ (Baker, 2002).

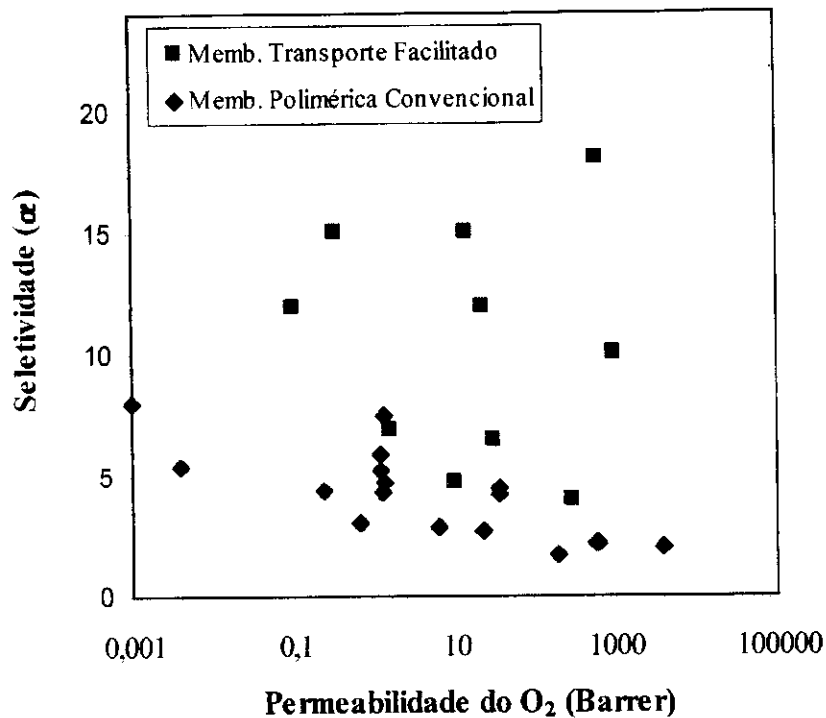


Figura 1.4: Relação entre permeabilidade e seletividade em membranas poliméricas convencionais comparadas àquelas obtidas em membranas de transporte facilitado. As membranas convencionais são as mesmas da Figura 1.3 e as membranas de transporte facilitado foram selecionadas dentre as apresentadas nas Tabelas 5.1 e 5.2, no Capítulo 5, para efeito de ilustração.

Embora alguns progressos tenham sido obtidos em termos de melhoria na seletividade e permeabilidade das membranas, a busca por um transportador de oxigênio ideal continua sendo alvo de intensa pesquisa. Isto se deve, principalmente, à falta de estabilidade do mesmo nas condições de operação; em alguns casos, temperaturas inferiores a 0 °C devem ser empregadas para que o transportador apresente um melhor desempenho em termos de transporte de O₂ e resistência à degradação (Johnson et al., 1987). Nenhuma das membranas até então investigadas mantém-se estável por um período superior a alguns dias (Baker, 2002).

A necessidade de transportadores de oxigênio para uso em membranas de transporte facilitado encontra paralelo no desenvolvimento de substitutos do sangue para fins clínicos. Neste último caso, procuram-se moléculas com elevada capacidade de transporte de O₂ para atuarem em situações de emergência como choques hemorrágicos ou mesmo devido à ausência de estoque de sangue doado. Convém, assim, avaliar os

avanços obtidos na área médica de forma que os mesmos possam ser estendidos aos objetivos deste trabalho.

1.2 BIOTRANSPORTADORES DE OXIGÊNIO

As primeiras tentativas de tratar pacientes portadores de anemia com soluções de hemoglobina datam do início do século (Waschke et al., 1997). Ainda que alguns países contem com um eficiente sistema de bancos de sangue, a partir da década de 80 alguns fatores motivaram a busca por uma alternativa à transfusão: o problema na incompatibilidade de tipo sanguíneo, o risco de transmissão de doenças e a limitação no tempo de estocagem dos eritrócitos (Ketcham et al., 1999).

A causa mais comum de mortes em transfusão de sangue se dá em conseqüências do uso de tipos sanguíneos incompatíveis (Ketcham et al., 1999). Além disto, mesmo uma rigorosa seleção não elimina o risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas. A chance de transmissão do vírus da hepatite C, o HCV, é de 1:3000 por unidade de sangue doado (1 unidade corresponde a 1/10 do volume total de sangue do corpo humano) (Ketcham et al., 1999). A OMS estima que 80% das transfusões de sangue em todo o mundo ocorrem sem qualquer tipo de seleção (Winslow, 1994). Outro agravante é que o tempo de estocagem máximo dos eritrócitos é de aproximadamente 42 dias, uma vez que a viabilidade das células é comprometida como resultado de várias mudanças bioquímicas (Ketcham et al., 1999).

Um dos tipos de substitutos para o sangue que tem sido investigado são os perfluorcarbonos (PFCs), compostos derivados da fluoretação de hidrocarbonetos, aprovados para usos pelo FDA. Os PFCs atuam aumentando a solubilidade do O₂ no plasma de 3% para aproximadamente 40-50% (Waschke e Frietsch, 1999).

A maior parte dos substitutos pesquisados compreende os chamados HBOCs (transportadores de oxigênio baseados em hemoglobina), derivados da hemoglobina humana ou de outras fontes. O uso da hemoglobina como transportador de O₂ requer seu isolamento do microambiente natural dentro das células, no qual ela é encontrada na forma tetramérica. Fora das células, ela se dissocia em dois dímeros que são rapidamente removidos da circulação por meio de filtração capilar e excreção (Waschke

e Frietsch, 1999). Além de limitar o tempo de residência intravascular para aproximadamente 2-4 horas, enquanto o ideal seria de 6 a 30 h (Waschke e Frietsch, 1999), a hemoglobina acumulada em outros tecidos pode ser degradada e os produtos resultantes são extremamente tóxicos. Hemoglobina livre também induz vasoconstrição, hipertensão e mal estar geral, o que vem sendo atribuído à sua grande afinidade pelo óxido nítrico, entre outros fatores (Feit e Sladen, 1999).

Além das limitações anteriormente citadas, fora das células acontece uma oxidação irreversível do íon ferro, responsável pela ligação do oxigênio, com formação de metaemoglobina, uma molécula incapaz de transportar o O₂.

Muitos procedimentos têm sido adotados visando contornar as limitações das HBOCs (Guillochon et al., 1981, Gaber et al., 1983, Guillochon et al., 1986, Snyder et al., 1987, White e Olsen, 1987, Yang e Olsen, 1989, Yang e Olsen, 1991, Bervers et al., 1991, Wang et al., 1992). Vários produtos de grandes Laboratórios (Baxter Healthcare Corp., Biopure Corp., Hemosol Inc., Enzo Inc. entre outros) estão em fase avançada de testes clínicos, mas a busca por um substituto ideal ainda está longe de terminar. A dificuldade reside em encontrar um produto que satisfaça todas as exigências abaixo (Feit e Sladen, 1999):

- Ser universalmente compatível;
- Possuir alta capacidade de transporte de O₂;
- Não apresentar efeitos de vaso-constricção;
- Possuir baixa viscosidade;
- Não oferecer riscos de infecção;
- Não acarretar outros efeitos colaterais;
- Exibir estabilidade à estocagem;
- Ter baixo custo.

No entanto, se a finalidade do transportador é apenas aumentar a taxa de transporte do O₂, sem preocupações com os aspectos clínicos envolvidos, muitas dessas limitações podem ser ignoradas. Desta forma, pode-se considerar que o principal desafio à utilização da hemoglobina ou seus derivados em membranas de transporte facilitado para separação de oxigênio é a falta de estabilidade química das moléculas .

A biotecnologia constitui atualmente uma potente ferramenta em favor do desenvolvimento de novos transportadores de oxigênio. Utilizando a tecnologia de DNA recombinante, a hemoglobina humana e outras hemo-proteínas como a

mioglobina podem ser expressas em bactérias, plantas e animais de forma a se obterem moléculas com propriedades mais adequadas (Brantley et al., 1993, Thorsteinsson et al., 1999, Waschke e Frietsch, 1999, Chang, 1999, Scott et al., 2000). A substituição de aminoácidos específicos oferece a possibilidade de manipular as características biológicas dessas proteínas, tornando-as mais estáveis e com afinidade controlada.

É nesse contexto que se localiza o trabalho desenvolvido, que surgiu da integração dos Laboratórios de Biotecnologia e Separação com Membranas, do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ, inaugurando uma nova linha de pesquisa.

Cabe destacar que grande parte do trabalho experimental nesta etapa foi realizada com a colaboração do prof. J. S. Olson, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Rice University, em Houston (TX, EUA). O grupo do prof. Olson possui grande experiência na área de hemoglobinas e mioglobinas, visando o desenvolvimento de substitutos para o sangue. Vários estudos sobre os mecanismos de oxidação destas hemo-proteínas têm sido conduzidos com o objetivo de obter moléculas mais estáveis e com afinidade pelo oxigênio adequada, sendo o desenvolvimento de proteínas recombinantes uma das principais ferramentas utilizadas.

1.3 OBJETIVOS DO TRABALHO

O objetivo geral deste trabalho foi a obtenção de um membranas de transporte facilitado de alta eficiência para a separação de oxigênio a partir do ar empregando a mioglobina como transportador. Para tanto, deve-se:

- Aumentar a estabilidade da mioglobina contra a oxidação, adotando-se as estratégias de construção de proteínas recombinantes e substituição do metal por cobalto.
- Preparar membranas contendo o transportador. Tanto membranas líquidas quanto membranas de transportador fixo devem ser investigada.
- Caracterizar as membranas quanto à permeabilidade e seletividade ao O₂. Deve-se estabelecer as melhores condições de operação (pressão, temperatura) e avaliar a estabilidade operacional das membranas produzidas.

1.4 ESTRUTURA DA TESE

A dissertação foi dividida em 2 Partes, além deste capítulo introdutório. Aqui, foi apresentada uma visão geral do estado da arte no que diz respeito à separação de oxigênio utilizando processos com membrana, bem como dos progressos alcançados na área de substitutos do sangue com transportadores baseados em hemoglobina.

A Parte 1 compreende os Capítulos 2, 3 e 4, e trata especificamente de biotransportadores de oxigênio. A fim de explorar a habilidade de ligação com o oxigênio e inferir sobre a estabilidade de um processo empregando mioglobina ou outra hemo-proteína, é imprescindível conhecer as características e propriedades das mesmas, os fenômenos envolvidos na etapa de oxigenação e os fatores que afetam a sua estabilidade. Estes assuntos são abordados no Capítulo 2.

O Capítulo 3 é dedicado a uma revisão crítica dos mecanismos propostos para oxidação de mioglobinas e hemoglobinas, bem como das técnicas adotadas para estabilização das mesmas. O uso da hemoglobina como transportador de oxigênio com vistas à produção de oxigênio a partir do ar também é considerado.

No capítulo 4 são apresentados os principais resultados obtidos no preparo e caracterização de mioglobinas, com ênfase na produção de proteínas mutantes. São introduzidas as técnicas de estabilização utilizando a tecnologia do DNA recombinante, discutindo-se desde a construção do plasmídeo mutante, passando pela etapa de fermentação, até a separação e purificação da proteína de interesse.

A Parte 2 é um estudo sobre membranas para separação de oxigênio e abrange os Capítulos 5 e 6. No Capítulo 5 são relembrados os conceitos básicos da permeação de gás, enfocando o transporte facilitado em membranas líquidas. Destaque é dado à produção de ar enriquecido em oxigênio, que vem a ser o objetivo maior deste trabalho. É feita também uma revisão da literatura sobre os principais resultados obtidos com relação ao enriquecimento do ar utilizando-se processos com membranas de transporte facilitado.

O Capítulo 6 consiste na parte experimental relativa ao preparo de membranas de transporte facilitado para separação de oxigênio. Inicialmente, são apresentados os resultados obtidos com membranas sem o agente transportador, com o objetivo de

proceder a uma seleção prévia de materiais adequados à produção das membranas, e à sua devida caracterização. Por fim, são discutidos os resultados obtidos para as membranas contendo mioglobina.

Finalmente, o Capítulo 7 contém as conclusões mais relevantes e as perspectivas futuras para o uso de membranas de transporte facilitado na separação de oxigênio, incluindo sugestões para trabalhos posteriores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoki, T., Shin, K., Oikawa, E. (1996), *Highly Oxygen Permselective Membrane of Cobalt-Complexed Polyazomethine Containing Tridentate Ligand and Oligosiloxane in the Repeating Pairs of the Main Chain*, *Polymer J.*, 28(2), 106-112.
- Baker, R. W., Roman, I. C., Lonsdale, H. (1987), *Liquid Membranes for the Production of Oxygen-Enriched Air - I. Introduction and Passive Liquid Membranes*, *J. Memb. Sci.*, 31, 15-29.
- Baker, R. W. (2002), *Future Directions of Membrane Gas Separation Technology*, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 41, 1393-1411.
- Brantley R. E., Smerdon, S. J., Wilkinson A. J., Singleton, E. W., Olson, J. S. (1993), *The Mechanism of Autooxidation of Myoglobin*, *J. Biol. Chem.*, 268, 6995-7010.
- Castle, W. F. (2002), *Air Separation and Liquefaction: Recent Developments and Prospects for the Beginning of the New Millennium*, *Int. J. Refrig.*, 25, 158-172.
- Chang, T. M. S. (1999), *Artificial Cells, Encapsulation, and Immobilization*, *An. N. Y. Ac. Sci.*, 875, 71-83.
- Feit, A., Sladen, R. N. (1999), *New Hemoglobin Substitutes*, *Curr. Opinion in Anesthesiology*, 12, 473-479.
- Figoli, A., Sager, W. F. C., Mulder, M. H. V. (2001), *Facilitated Oxygen Transport in Liquid Membranes: Review and New Concepts*, *J. Memb. Sci.*, 181, 97-110.
- Ghosal, A. S., Koros, W. J. (2000), *Air Separation of Flat Sheet Homogeneous Pyrolytic Carbon Membranes*, *J. Memb. Sci.*, 174, 177-188.
- Habert, A. C., Borges, C. P., Nobrega, R. (1997), *Processos de Separação com Membranas: Curso ministrado na Escola Piloto em Engenharia Química*, COPPE/UFRJ.
- Hayakawa, Y., Nishida, M., Aoki, T., Muramatsu, H. (1992), *Synthesis of Poly(phenylacetylene)s Containing Trifluormethyl Groups for Gas Permeable Membrane*, *J. Polymer Sci., Part A*, 30, 873-877.

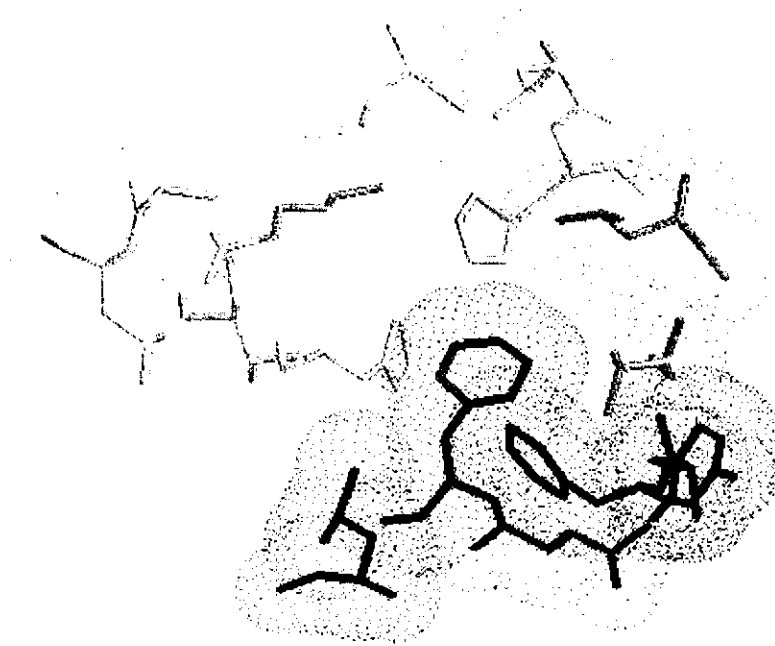
- Johnson, B. M., Baker, R. W., Matson, S. L., Smith, K. L., Roman, I. C., Tuttle, M.E., Lonsdale, H. K. (1987), *Liquid Membranes for the Production of Oxygen-Enriched Air-II. Facilitated-Transport Membranes*, J. Memb. Sci., 31, 31-67.
- Ketcham, E. M. B. A., Cairns, C. B. M. D. (1999), *Hemoglobin-Based Oxygen Carriers: Development and Clinical Potential*, Am. Emergency Medicine, 33, 326-337.
- Knoblauch, K. (1978), *Pressure-Swing Adsorption: Geared for Small-Volume Users*, Chem. Eng., 11, 87-89.
- Koros, W. J., Mahajan, R. (2000), *Pushing the Limits on Possibilities for Large Scale Gas Separation: Which Strategies?*, J. Memb. Sci., 175, 181-196.
- Matson, S. L. et al. (1986), *Membrane Oxygen Enrichment-II. Economic Assessment*, J. Memb. Sci., 29, 79-96.
- Matson, S. L., Lonsdale, H. (1987), *Liquid Membranes for the Production of Oxygen-Enriched Air - III. Process Design and Economics*, J. Memb. Sci., 31, 69-87.
- Neplenbroek, T. (1989), *Stability of Supported Liquid Membranes*, Tese de doutorado, Univ. Twente, Holanda.
- Robenson, L. M. (1991), *Correlation of Separation Factor Versus Permeability for Polymeric Membranes*, J. Memb. Sci., 165-185.
- Scott. E. E., Paster, E. V., Olson, J. S. (2000), *The Stabilities of Mammalian Apomyoglobins Vary Over a 600-Fold Range and Can Be Enhanced by Comparative Mutagenesis*, J. Biol. Chem., 275, 27129-27136.
- Scholander, P. F. (1960), *Oxygen Transport through Hemoglobin Solution*, Science, 131, 585-590.
- Thorsteinsson, M. C., Bevan, D. R., Potts, M. (1999), *A Cyanobacterial Hemoglobin with Unusual Ligand Binding Kinetics and Stability Properties*, Biochemistry, 1999, 38, 2117-2126.
- Wang, C-C et al. (2000), *Permeation of Oxygen/Nitrogen in Cobalt-Chelated Copoly(EDTA-MMA-BA) Membranes*, J. Memb. Sci., 177, 189-199.
- Waschke, K. F., Frietsch, T., Quintel, M., Lenz, C., Rebel, A. (1997), *Hemoglobins Solutions M103*, Acta Anaest. Scand. (Supplem. 2), 41, 259-263.

- Waschke, K. F., Frietsch, T. (1999), *Modified Haemoglobins and Perfluorocarbons*, Curr. Opinion in Anesthesiology, 12, 195-202.
- Winslow, R., Chapman, K. W. (1994), *Pilot-Scale Preparation of Hemoglobin Solutions*, Meth. Enzym., 231, 3-16.

PARTE

1

BIOTRANSPORTADORES DE OXIGÊNIO



CONTEÚDO – CAPÍTULO 2

2.1 Hemoglobina	21
2.1.1 O Grupo Hemo	23
2.1.2 Oxigenação da Hemoglobina	25
2.2 Mioglobina	29
2.2.1 Oxigenação da Mioglobina	29
2.3 Hemeritrina	31
2.4 Hemocianina	32
2.5 A Química da Ligação do Oxigênio	35
2.6 Substitutos do Sangue	39
2.7 Transporte de O ₂ em Soluções de Hemoglobina	41
2.8 Conclusões	43

MIOGLOBINAS E HEMOGLOBINAS

Este capítulo é dedicado ao estudo das principais hemo-proteínas envolvidas no transporte de oxigênio nos seres vivos, com destaque para mioglobina e hemoglobina. Inicialmente, apresenta-se a estrutura e a oxigenação dessas proteínas, do ponto de vista das mudanças que ocorrem na porção globina da molécula. A química da ligação do oxigênio é detalhada em seguida, analisando-se os mecanismos propostos para essa etapa. Posteriormente, são discutidas as propriedades da hemoglobina em solução, após extração dos eritrócitos, em termos das suas limitações ao uso como transportador de oxigênio. O problema da falta de estabilidade da molécula é introduzido, sendo aprofundado no capítulo seguinte.

A transição da anaerobiose para a aerobiose foi um passo decisivo na evolução das espécies, considerando-se que oito vezes mais energia é extraída da glicose no processo aeróbio. A fim de garantir o suprimento de oxigênio às células, os organismos desenvolveram um eficiente sistema circulatório bem como passaram a contar com moléculas transportadoras de O₂ (Murray, 1996).

A hemoglobina é conhecida por ser o mais eficiente transportador de oxigênio à temperatura ambiente. Além disto, tendo em vista sua grande importância bioquímica e médica, a relativa facilidade de isolamento e a variedade de técnicas que podem ser empregadas no seu estudo, a hemoglobina tem sido a mais estudada entre todas as proteínas.

A seguir, mais detalhes sobre esta e outras importantes hemo-proteínas.

2.1 HEMOGLOBINA

A hemoglobina é uma proteína tetramérica, aproximadamente esférica, com 55 Å de diâmetro. Cada cadeia polipeptídica, ou sub-unidade, contém um grupo prostético hemo, responsável pela ligação do oxigênio, como mostrado na Figura 2.1. As quatro cadeias são unidas por interações não-covalentes. A hemoglobina de um adulto normal, a HbA, é formada por duas cadeias do tipo α e duas do tipo β , com massa molar igual a 64 KDa (Murray, 1996).

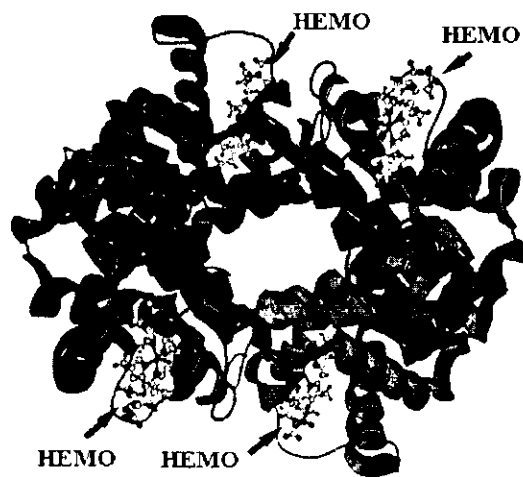


Figura 2.1: Representação de um tetrâmero de hemoglobina. Cada uma das quatro cadeias possui um grupo hemo, responsáveis pela ligação do oxigênio (Casiday et al. 1998).

As cadeias α e β são similares em comprimento, possuindo cada uma 141 e 146 resíduos aminoácidos, respectivamente. No entanto, diferem bastante na estrutura primária. Como pode ser visto na Figura 2.1, a estrutura secundária da proteína é constituída predominantemente por hélices, contendo de 7 a 20 aminoácidos cada.

Neste trabalho foi adotada a nomenclatura da proteína descrita por Dickerson e Géis (Thorsteinsson al., 1998). A posição dos aminoácidos nas cadeias é representada por uma letra, relacionada à hélice na qual ele se encontra, seguida por um número, que representa sua posição na hélice. Assim, por exemplo, o resíduo ValE11 refere-se ao aminoácido valina, localizado na hélice E, na posição 11.

A disposição dos aminoácidos é tal que o interior de cada cadeia é formado quase que exclusivamente por aminoácidos hidrofóbicos, com exceção de duas histidinas,

altamente polares (Stryer, 1981). Esse micro-ambiente hidrofóbico é essencial à manutenção da reversibilidade da ligação do oxigênio, como será visto posteriormente.

No organismo dos vertebrados, a hemoglobina está contida no interior dos eritrócitos, ou glóbulos vermelhos, correspondendo à cerca de 95% do conteúdo total de proteína intracelular dos glóbulos vermelhos. A forma bicôncava destas células, mostrada na Figura 2.2, proporciona uma maior área para a transferência de oxigênio entre o plasma e o seu interior.



*Eritrócitos
ou glóbulos vermelhos.*

*Leucócitos,
ou glóbulos brancos.*

Figura 2.2: Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura (MEV) de um vaso sanguíneo no interior do qual é possível identificar eritrócitos e leucócitos (Stryer, 1981).

O nível de hemoglobina normalmente varia de 14 a 18 g/dL em homens e de 12 a 16 g/dL em mulheres. O tempo de vida de uma célula vermelha normal é de 120 dias o que representa uma média de 2 milhões de células sendo renovadas por segundo. A produção de novos eritrócitos é regulada pela proteína eritropoietina, uma glicoproteína com 34 KDa. A eritropoietina é sintetizada principalmente pelos rins e liberada na corrente sanguínea, percorrendo até a medula óssea, onde interage com os progenitores das células vermelhas via receptores específicos, fazendo-os proliferar (Murray et al., 1996).

A hemoglobina desempenha duas atividades principais no organismo: transportar O_2 dos pulmões para os tecidos e transportar CO_2 e prótons no sentido inverso. A primeira função é ilustrada na Figura 2.3. A presença deste transportador no sangue possibilita um aumento na solubilidade do oxigênio de aproximadamente 3 mL/L para 200 mL/L (Stryer, 1981).

O oxigênio dentro dos alvéolos pulmonares é transferido para a hemoglobina no interior das células vermelhas através das 3 camadas que constituem a parede dos alvéolos, difundindo-se pelo plasma e permeando pela membrana dos eritrócitos. Este processo dura aproximadamente de 0,4 a 0,5 segundo. Por outro lado, devido à sua maior afinidade pela hemoglobina, o CO₂ completa o percurso inverso em apenas 0,1 segundo, mesmo com o baixo gradiente de pressão parcial deste gás (Nosé, 1998).

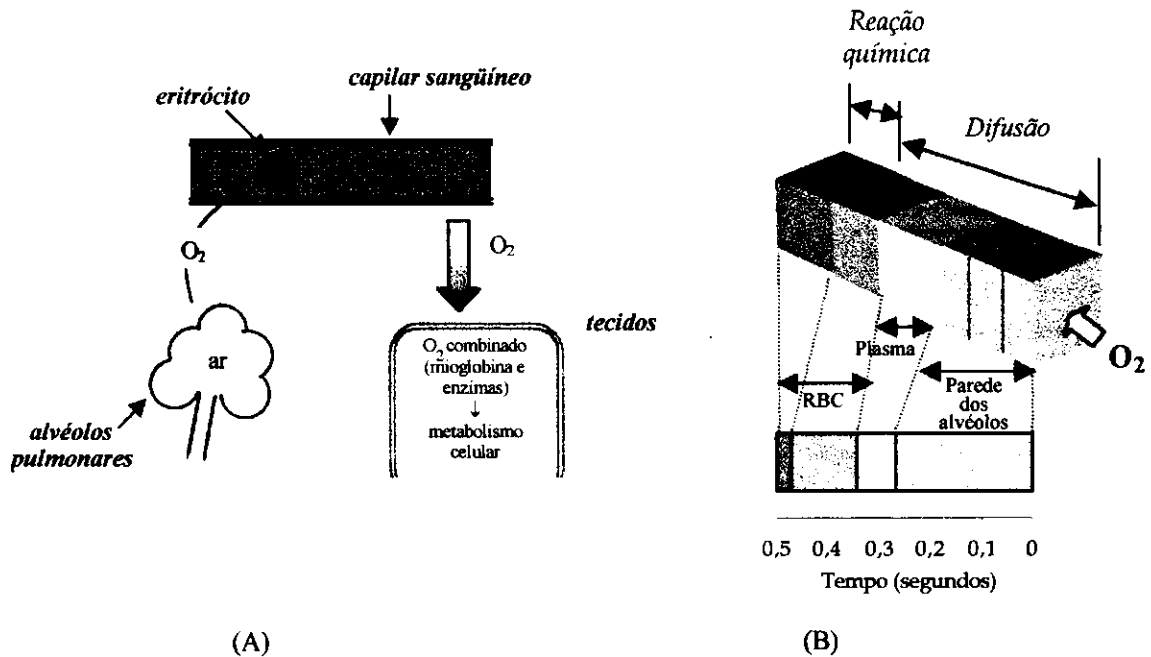


Figura 2.3: (A) Transporte de oxigênio pela hemoglobina presente no interior dos eritrócitos, (B) Esquema do processo de transferência do oxigênio dos alvéolos pulmonares para a hemoglobina contida no interior dos eritrócitos. Adaptado de Nosé, 1998.

2.1.1 O Grupo Hemo

O grupo hemo pertence à classe dos complexos tetrapirrole, ligantes macrocíclicos pelo menos parcialmente insaturados que, em sua forma desprotonada, podem ligar fortemente íons metálicos divalentes (Kaim e Schwederski, 1994). Algumas características comuns a esses tipos de compostos são:

- Arranjo planar ou aproximadamente planar bastante estável, em torno de um metal central.

- Usualmente bastante seletivos com relação ao tamanho do íon coordenado. Íons com tamanho de 0,6 a 0,7 Å se ajustam perfeitamente na cavidade central do plano, enquanto que íons maiores ficam afastados.
- O íon metálico apresenta 6 posições de coordenação, em um arranjo aproximadamente octaédrico, com 2 sítios axiais disponíveis para ligação. Em geral, um deles destina-se à ligação do substrato e outro, à regulação da atividade da proteína.
- Apresentam intensa banda de absorção na região visível do espectro eletromagnético, sendo, por isso, classificados como pigmentos.

O hemo é um grupo prostético, uma unidade não peptídica essencial à atividade da hemoglobina. Consiste de uma parte orgânica, a protoporfirina, e do átomo do ferro, na forma de Fe(II). A protoporfirina é formada por um anel tetrapirrole com sub-unidades ligadas por pontes de metileno nas quais estão presentes radicais metil, vinil e propionato. Esta estrutura pode estar arranjada de diferentes maneiras, mas apenas um dos isômeros, a protoporfirina IX, está presente nos sistemas biológicos (Murray et al., 1996).

Como mostrado na Figura 2.4, o ferro encontra-se ligado a quatro átomos de nitrogênio no plano do anel, sendo possível formar duas ligações adicionais em lados opostos em relação ao plano do hemo. A quinta posição de coordenação é ocupada pelo nitrogênio do grupo imidazol de um dos dois aminoácidos histidina presentes no interior da hemoglobina, identificado como F8 e denominado histidina proximal. Forças de van de Waals e pontes de hidrogênio também são responsáveis pela ligação do grupo hemo na hemoglobina (Murray et al., 1996).

O oxigênio liga-se na sexta posição de coordenação do íon metálico. O grupo hemo também é acessível a outras pequenas moléculas como CO e a ânions como Cl⁻, OH⁻ e CN⁻ (Niederhoffer et al., 1984).

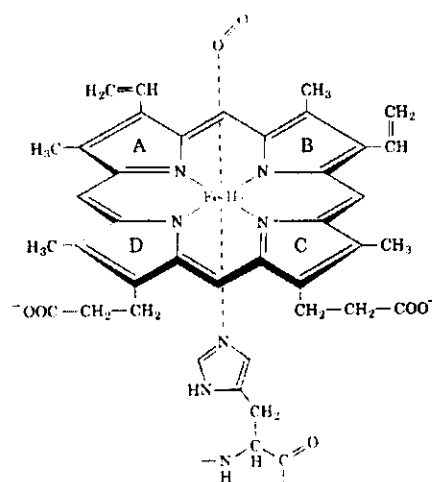


Figura 2.4: O grupo hemo (Fe-protoporfirina IX) ligado ao Nitrogênio do aminoácido Histidina.

Embora não esteja diretamente ligada ao oxigênio, a presença de uma histidina localizada acima do plano de ligação do hemo (denominada histidina distal - HisE7), tanto na hemoglobina quanto na mioglobina, é de suma importância no processo de oxigenação. A HisE7 desempenha a importante função de impedir a formação de peróxidos, complexos do tipo hemo-O₂-hemo. O aminoácido Valina (ValE11) também protege a região de ligação do oxigênio (Niederhoffer et al., 1984). A oxidação do sítio de ligação do O₂ será discutida no Capítulo 3. A histidina proximal (HisF8) exerce papel fundamental na etapa de oxigenação da hemoglobina, a qual será discutida a seguir.

2.1.2 Oxigenação da Hemoglobina

A presença de um grupo hemo em cada cadeia polipeptídica permite a ligação simultânea de quatro moléculas de oxigênio. As interações entre as sub-unidades na molécula são responsáveis pela cinética de ligação cooperativa exibida pela hemoglobina, propriedade que a permite ligar uma quantidade máxima de oxigênio nos pulmões e liberá-la nos tecidos (Murray et al., 1996).

A cooperatividade na hemoglobina depende da transição reversível entre duas estruturas quaternárias, uma de baixa afinidade pelo O₂, a desoxi, ou T, e outra de alta afinidade, a oxi, ou R (Kilmartin, 1978). Durante a oxigenação, o átomo do ferro, que está situado 0,6 Å fora do plano do anel, move-se em direção a este; o movimento é transmitido para

a histidina F8, que está diretamente ligada ao metal, e aos demais resíduos a ela ligados, como mostrado na Figura 2.5.

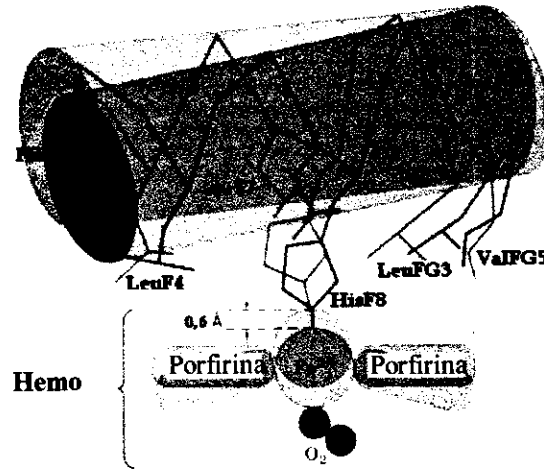


Figura 2.5: Oxigenação da hemoglobina. Em azul a forma desoxi - antes da ligação do O_2 , e em vermelho, a forma oxi - após a ligação do O_2 . O ferro move-se 0,6 Å em direção ao plano do hemo, como representado nesse esquema.

Como resultado desses movimentos, as 8 ligações entre os terminais carboxil das quatro sub-unidades, representadas na Figura 2.6, são rompidas. A captura subsequente das próximas moléculas de oxigênio é, então, facilitada, já que envolve quebra de menos ligações, sendo energeticamente mais favorável. Além disto, um par α/β de sub-unidades move-se em relação ao outro, compactando o tetrâmero e aumentando sua afinidade pelo O_2 (Perutz, 1970).

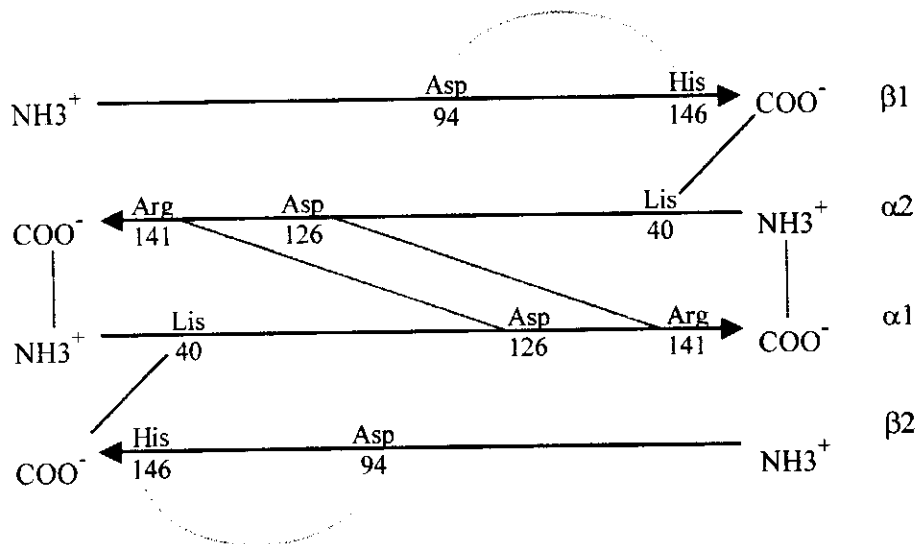


Figura 2.6: Ligações entre as sub-unidades na desoxihemoglobina, que são rompidas durante a oxigenação.

Em consequência deste mecanismo, a curva de saturação da hemoglobina assume uma forma sigmoideal, como pode ser visto na Figura 2.7. Isto porque a ligação do primeiro oxigênio favorece a ligação do segundo, e assim por diante (Niederhofferr, et al., 1984). Tal comportamento é bem descrito pela equação 2.1:

$$y = \frac{\kappa(pO_2)^n}{1 + \kappa(pO_2)^n} \quad n \approx 2,8 \quad (2.1)$$

Onde y é a fração de moléculas de hemoglobina ligadas ao O_2 , pO_2 é a pressão parcial de oxigênio no equilíbrio e κ , a constante de equilíbrio da reação de oxigenação. A pressão parcial de oxigênio na qual metade dos sítios de ligação da hemoglobina está saturada é denominada P_{50} . É fácil mostrar que P_{50} está relacionada à constante de equilíbrio κ da seguinte forma:

$$\kappa = (1/P_{50})^n \quad (2.2)$$

A medida do grau de cooperatividade de uma proteína é dada pelo coeficiente de Hill, n . A equação de Hill relaciona a fração de saturação y à pressão parcial:

$$\log\left(\frac{y}{1-y}\right) = n\log(pO_2) - n\log(P_{50}) \quad (2.3)$$

Na ausência da cooperatividade, a representação gráfica de $\log[y/(1-y)]$ em relação a $\log(pO_2)$ fornece uma linha reta com coeficiente angular $n=1$. Caso contrário, n não é constante, e é obtido a partir da inclinação máxima da curva (Niederhofferr, et al., 1984).

A ligação do oxigênio é também afetada por um número de modificações heterotrópicas, como as causadas pelo pH, CO_2 e fosfatos orgânicos. Estes modificadores alostéricos são responsáveis pela menor afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em condições fisiológicas, como ilustrado na Figura 2.7.

Dentro dos glóbulos vermelhos, 2,3-difosfoglicerato (DPG) está presente aproximadamente na mesma concentração molar que a hemoglobina. O DPG se liga à desoxihemoglobina, formando ligações adicionais com as cadeias β que estabilizam a forma não oxigenada, diminuindo a afinidade pelo oxigênio. Cada tetrâmero liga uma

molécula de DPG na sua cavidade central. Durante a oxigenação, a cavidade torna-se muito pequena e a molécula de fosfato é excluída. A presença do DPG garante uma maior oxigenação dos tecidos visto que ocasiona um aumento na P_{50} de aproximadamente 1 para 20 mmHg (Raw et al., 1981). Em alguns animais, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio é regulada por íons Cl^- em vez de DPG (Marta et al., 1998).

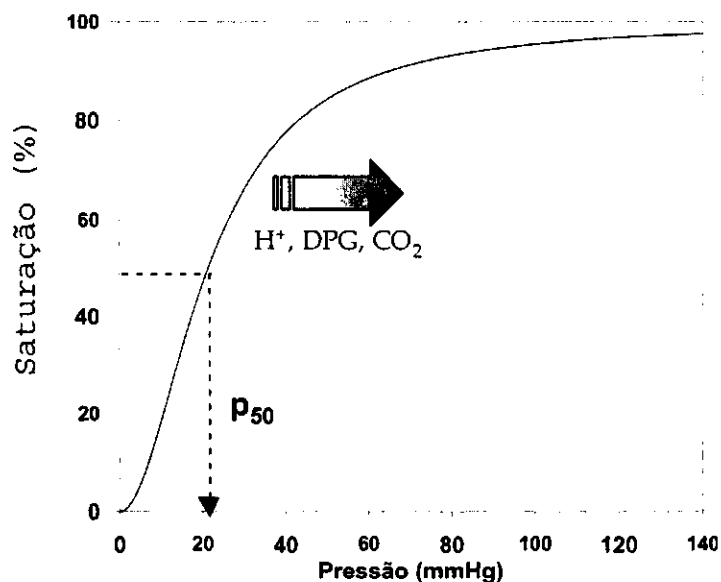


Figura 2.7: Curva de saturação da hemoglobina. Na presença de DPG, CO_2 ou íons H^+ , a afinidade da hemoglobina pelo O_2 é diminuída, garantindo uma maior oxigenação dos tecidos.

O transporte de CO_2 pela hemoglobina é feito de duas formas. Uma delas é a reação com o terminal amino das cadeias α e β , com formação de um carbamato. Cerca de 15% do gás carbônico é transportado desta forma. CO_2 também é transportado na forma de bicarbonato. Nos tecidos, o gás carbônico é convertido em carbonato e prótons, pela ação de uma enzima, a anidrase carbônica. O íon carbonato entra na corrente sanguínea enquanto os prótons são capturados pela desoxihemoglobina e transportados para os pulmões. Lá, ocorre o processo inverso: CO_2 é reconstituído pela ação da mesma enzima, sendo, então, exalado enquanto o O_2 liga-se à hemoglobina (Murray, 1996).

Tecidos sob intensa atividade metabólica liberam mais CO_2 , de forma que o pH é bastante reduzido. O efeito de Bohr, que consiste na diminuição da afinidade na presença de íons H^+ , assegura a provisão de O_2 a esses tecidos (Murray, 1996).

2.2 MIOGLOBINA

A mioglobina é uma proteína monomérica com massa molar em torno de 17 KDa, dependendo da espécie, que contém 153 aminoácidos e um grupo prostético por molécula. Apresenta uma estrutura bastante compacta, com dimensões de, aproximadamente, 45x35x25 Å. Cerca de 75% dos resíduos estão presentes na forma de 8 α -hélices, contendo de 7 a 20 aminoácidos cada, dispostos de forma que o interior da molécula contém apenas aminoácidos não polares, com exceção de duas histidinas. A superfície externa contém aminoácidos polares e não polares (Stryer, 1981).

A estrutura da mioglobina pode ser vista na Figura 2.8. Apesar da diferença no número e nos aminoácidos presentes, as estruturas secundária e terciária da mioglobina e da cadeia β da hemoglobina são quase idênticas (Stryer, 1981).



Figura 2.8: Modelo da mioglobina, mostrando os átomos de carbono da cadeia polipeptídica (pontos em preto) e a posição do grupo hemo, conectado à cadeia pelos aminoácidos histidina distal (HisE7) e proximal (HisF8).

2.2.1 Oxigenação da mioglobina

Na desoximioglobina, o átomo do ferro, fica afastado cerca de 0,3 Å do plano do anel porfirina. Durante o processo de oxigenação, ocorre um deslocamento de 0,2 Å em direção ao metal, de forma que a histidina proximal e os aminoácidos covalentemente ligados a ela, movem-se também, como acontece com a hemoglobina. No entanto, o efeito cooperativo, característico da hemoglobina, está ausente.

A oxigenação da mioglobina pode ser descrita pelo seguinte equilíbrio:



A constante de equilíbrio da reação, K , é dada por:

$$K = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}][\text{O}_2]} \quad (2.5)$$

Sendo y a fração de moléculas de mioglobina ligadas ao O_2 e $p\text{O}_2$ a pressão parcial de equilíbrio, tem-se que:

$$K = \frac{y}{(1-y)p\text{O}_2} \quad (2.6)$$

Logo,

$$y = \frac{Kp\text{O}_2}{1 + Kp\text{O}_2} \quad (2.7)$$

Este é a equação de uma curva hiperbólica, como apresentado na Figura 2.9 (Murray, 1996).

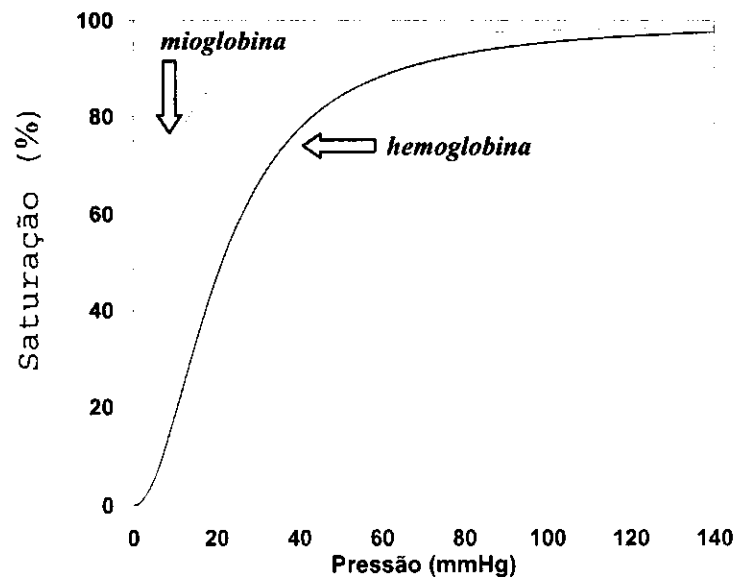


Figura 2.9: Curva de saturação da mioglobina, comparada àquela exibida pela hemoglobina.

Mesmo para pressões tão baixas quanto 10 mmHg, uma grande fração do gás ainda permanece ligada ao hemo, o que torna a mioglobina uma proteína eficiente na estocagem de oxigênio no organismo (Wang et al., 1997). O valor de P_{50} para a mioglobina do músculo cardíaco humano é de aproximadamente 1 mmHg. O músculo cardíaco é o que possui maior concentração de mioglobina (Niederhoffer et al., 1984).

2.3 HEMERITRINA

Alguns invertebrados como moluscos, crustáceos e artrópodes utilizam a hemeritrina para fazer o transporte e estocagem do oxigênio. Esta proteína octamérica contém dois centros metálicos por sítio ativo com massa molar de 108 KDa.

Ao contrário do que o nome indica, o grupo hemo não está presente hemeritrina. Muitas características fundamentais ainda não foram verificadas estruturalmente, mas vários métodos físicos têm contribuído para elucidar indiretamente a estrutura dos centros de coordenação do O₂. Medidas magnéticas mostram que a forma oxi apresenta uma molécula de oxigênio por dímero de ferro. Medidas da absorção de luz indicam que o metal deve estar coordenado pelos aminoácidos da proteína. Bandas características de peróxidos foram identificadas através de técnicas de espectroscopia vibracional (Niederhoffer et al., 1984, Kaim e Schwederski, 1994).

A Figura 2.10 mostra as prováveis estruturas da hemeritrina nas formas oxigenada e desoxigenada. Os íons Fe(II), na forma desoxi, estão ligados a aminoácidos histidina, sendo que apenas um dos íons está hexacoordenado. Quando o oxigênio se liga ao ferro não saturado, os dois íons Fe(II) são oxidados a Fe(III), com redução simultânea do substrato ao estado peróxido. A ligação é reversível (Niederhoffer et al., 1984, Kaim e Schwederski, 1994).

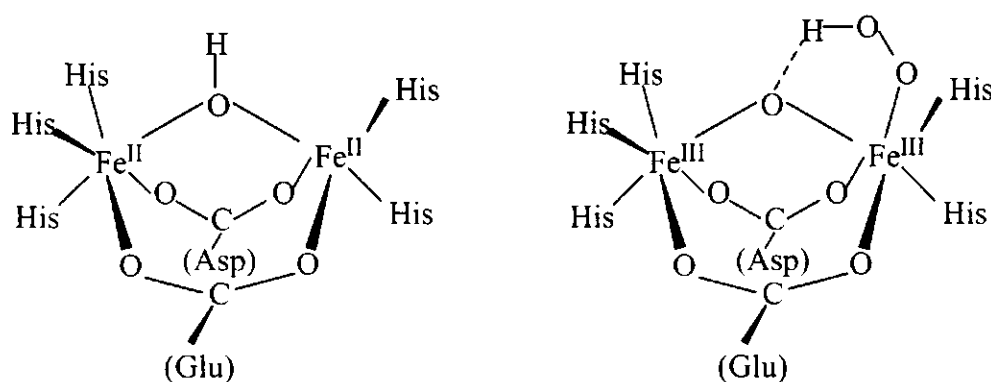


Figura 2.10: Formas desoxi (à esquerda) e oxi (à direita) da Hemeritrina.

2.4 HEMOCIANINA

A hemocianina é uma proteína contendo cobre que ocorre em moluscos e artrópodes. A massa molar desta proteína varia de 400 KDa a 8900 KDa. Seu sítio ativo tem sido extensivamente estudado, sugerindo que a desoxihemocianina contém dois íons Cu(I) por sub-unidade. A hemocianina exibe variados graus de cooperatividade, dependendo das condições experimentais. Tal variação é esperada, tratando-se de uma proteína com cerca de 160 a 200 sítios de ligação. Em muitos casos, o efeito de Bohr é invertido, de forma que a proteína apresenta uma maior afinidade pelo oxigênio a baixo pH, o que é interpretado como uma adaptação dos organismos para permitir a ligação do oxigênio mesmo na presença de elevadas concentrações de CO₂ (Niederhoffer et al., 1984).

Ao contrário do ferro no hemo, o cobre ocorre como um complexo tetrapirrole, estando diretamente ligado à proteína através das histidinas. O cobre na forma desoxi encontra-se no estado de oxidação (I), enquanto que a forma oxi, azul, contém Cu(II). Dois tipos de estrutura têm sido atribuídos à hemocianina, como mostra a Figura 2.11.

A ligação do cobre com o oxigênio é reversível, o que causa uma certa surpresa devido à coordenação múltipla, com o oxigênio na forma de um peróxido (Niederhoffer et al., 1984, Kaim e Schwederski, 1994).

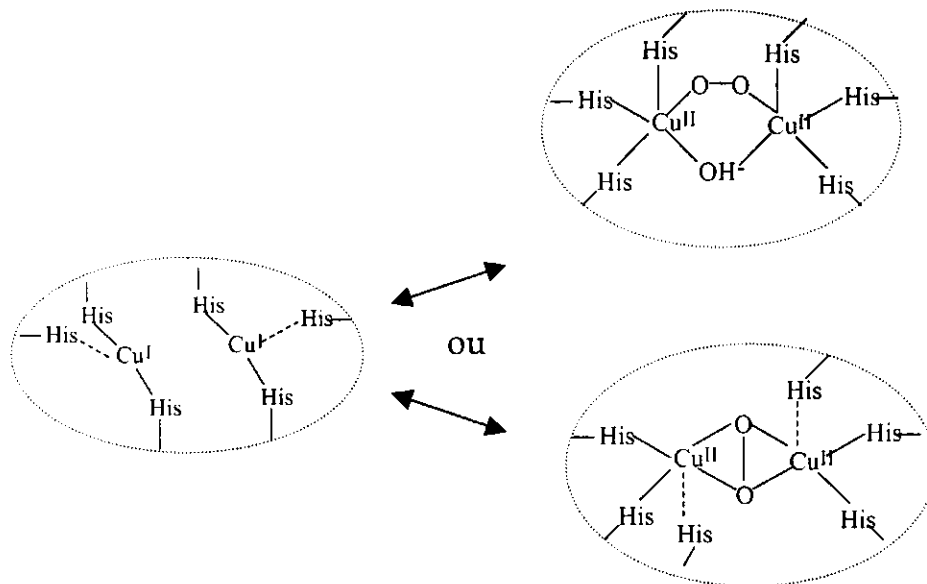


Figura 2.11: Formas desoxi (à esquerda) e oxi (à direita) da hemocianina.

A Tabela 2.1 apresenta um resumo das características das proteínas anteriormente descritas (Niederhoffer et al., 1984, Kaim e Schwederski, 1994).

Tabela 2.1: Resumo das características das principais proteínas de transporte ou estocagem de O₂.

Proteína	Massa molar (KDa)	Forma	Metal
Hemoglobina	64,5	Tetramérica	4 Fe
Mioglobina	17,8	Monomérica	1 Fe
Hemeritrina	108	Octamérica	16 Fe
Hemocianina	400-600	*	Cu

* Contém de 180 a 200 sítios de ligação por molécula.

A Tabela 2.2 apresenta outras proteínas envolvidas na reação com o oxigênio nos seres vivos. Embora também estejam envolvidas no transporte de oxigênio, as mesmas apresentam algumas desvantagens que as tornam inadequadas ao uso como transportador de O₂ em soluções *ex-vivo*. Apesar de a hemocianina ligar reversivelmente o oxigênio, ela o faz por um tempo limitado, perdendo cerca de 20 % de sua capacidade de ligação do oxigênio a cada ciclo oxi/desoxi (Kaim e Schwederski, 1994).

Tabela 2.2: Proteínas envolvidas na reação com o oxigênio.

Proteína	Metal	Fonte	Localização
Hemoglobina (Hb)	Fe (h)	Mamíferos	Corpúsculos
		Aves	Corpúsculos
		Peixes	Corpúsculos
Mioglobina (Mb)	Fe (h)	Mamíferos	Músculo
		Outros vertebrados	Músculo
		Alguns invertebrados	Músculo
Eritrocruorina (Eri)	Fe (h)	Répteis	Plasma
		Insetos	Plasma
		Bactérias	
Clorocruorina (Clo)	Fe (h)	Vermes marinhos	Plasma
Hemeritrina (Her)	Fe (nh)	Vermes marinhos	Corpúsculos
Hemocianina (Hci)	Cu	Moluscos	Plasma
		Artrópodes	Plasma
Hemovanadina (Hv)	V	Ascidians	Corpúsculos

h-hemo

nh- não hemo

A hemeritrina, como a hemocianina, é muito volumosa, o que dificultaria sua difusão na solução, limitando a taxa de transporte do O₂. Além disso, o fato de o oxigênio formar um complexo do tipo peróxido deve limitar a reversibilidade da reação.

As eritrocruorinas são tipos especiais de hemoglobinas presentes em invertebrados, recentemente descobertas (Vinogradov e Sharma, 1994, Dewild et al., 1998, Thorsteinsson et al., 1999). Em insetos, elas existem como monômeros ou dímeros, apresentando várias isoformas. Em alguns crustáceos, são encontrados agregados poliméricos de 800 KDa, e em alguns tipos de répteis, estruturas com 10.000 KDa têm sido identificadas. Em geral, as eritrocruorinas exibem uma afinidade pelo oxigênio maior que na hemoglobina humana e variados graus de efeito de Bohr (Ruf et al., 1994). Relativamente grandes quantidades têm sido isoladas a partir de larvas de insetos. Ruf et al. (1994) obtiveram aproximadamente 15 gramas da proteína a partir de 1 Kg de larvas. No entanto, sua tendência à oxidação quando em solução é maior que a exibida pela mioglobina e hemoglobina (Thorsteinsson et al., 1999).

Outras proteínas contendo o grupo hemo estão presentes em alguns seres vivos. No entanto, suas funções são bastante diferentes, como mostrado na Tabela 2.3 (Kaim e Schwederski, 1994).

Tabela 2.3: Proteínas contendo hemo na sua estrutura.

<i>Proteína</i>	<i>Função</i>
Catalase	Metabolismo de H ₂ O ₂
Peroxidase	Metabolismo de H ₂ O ₂
Citocromo C	Transferência de elétron
Citocromo C oxidase	Oxidação terminal (O ₂ → H ₂ O)
Flavoproteína oxigenase	Incorporação de oxigênio molecular

A maioria dos transportadores de oxigênio, naturais ou sintéticos, perde gradativamente sua atividade durante a operação. Esta perda de atividade é geralmente atribuída à oxidação irreversível do complexo original, com formação de um complexo inativo no qual o metal se encontra num estado de oxidação mais elevado (Niederhoffer et al., 1984, Kaim e Schwederski, 1994). Para entender as características de reversibilidade da reação de oxigenação bem como avaliar os fatores que podem provocar a falta de

estabilidade dos transportadores, é importante avaliar a ligação do oxigênio do ponto de vista microscópico, o que será discutido a seguir.

2.5 A QUÍMICA DE LIGAÇÃO DO OXIGÊNIO

O fato de que soluções aquosas de amônia contendo sais de cobalto(II) tornavam-se escuras quando expostas ao ar foi observado há mais de um século. Foi Alfred Werner, em 1900, quem primeiro caracterizou os complexos com oxigênio, mas só em 1938 Tsumaki mostrou que a mudança de coloração observada era causada pela oxigenação reversível dos mesmos (Niederhoffer et al., 1984).

Na década de 40, Calvin et al. e Diehl et al. estudaram intensivamente as propriedades transportadoras dos complexos de Co(II) com ligantes do tipo Salen, com o objetivo de estocar oxigênio para aplicações militares. Os resultados, no entanto, foram desapontadores pois os complexos se deterioravam rapidamente. Estudos indicaram que tal deterioração era conseqüência da oxidação irreversível pelo oxigênio, com formação de CO₂ e H₂O. Nesta mesma época, Hearon et al. relataram a ligação do oxigênio por Co-bis(histidina) em solução. Com este trabalho, os autores demonstraram que a oxigenação reversível é um processo natural, e não um fenômeno isolado (Niederhoffer et al., 1984).

Apesar destas descobertas, até os anos sessenta pouca atenção foi dispensada ao assunto, quando, então, tentativas de modelar a hemoglobina presente nos sistemas biológicos renovaram o interesse por esta área.

O oxigênio é uma molécula estável, normalmente no estado triplete cuja distribuição eletrônica é dada na Figura 2.12. Desde que elétrons adicionais entram em orbitais anti-ligantes, π^* , a redução do oxigênio resulta em ligações O-O mais fracas. A Figura 2.12 apresenta também a distribuição eletrônica do O₂ em outros estados comumente encontrados (Kaim e Scwedeński, 1994).

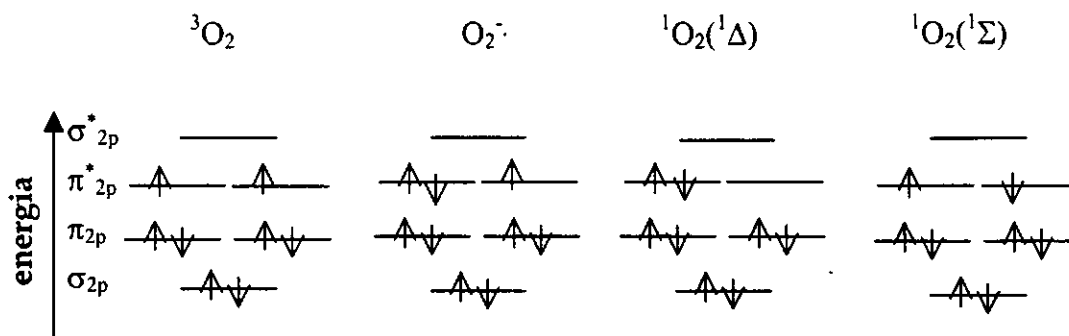


Figura 2.12: Distribuição eletrônica na molécula do oxigênio, O_2 .

A presença dos elétrons desemparelhados nos orbitais degenerados π_{2p}^* é responsável pelo caráter paramagnético do oxigênio molecular e inibe sua reação com grande parte das substâncias diamagnéticas. Sua ligação com a maioria dos complexos metálicos é irreversível, sendo reduzido ao estado de oxidação (-II), com formação de óxidos ou hidróxidos. No entanto, compostos organometálicos de ferro, cobalto, ródio, irídio e outros elementos do grupo IX da tabela periódica formam ligação reversível com o O_2 (Kaim e Swederski, 1994).

Os metais de transição que ocupam o centro destes ligantes apresentam os orbitais d total ou parcialmente preenchidos. A diferença entre a configuração h.s. (alto spin) e l.s. (baixo spin) está relacionada aos níveis de energia ocupados pelos elétrons nestes orbitais. Quando ocorre o preenchimento do orbital, a partir do 4º elétron, este poderá ocupar o nível de energia mais baixo (chamado de baixo spin) ou o mais alto (denominada de alto spin) de acordo com o esquema da Figura 2.13.

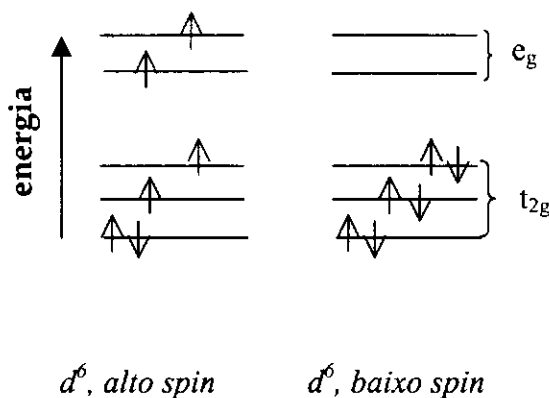
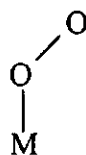


Figura 2.13: Distribuição dos elétrons nos orbitais d .

A distribuição eletrônica do átomo de ferro pode ser representada como $[\text{Ar}]3d^64s^2$. Seu diagrama de energia fica como mostrado na Figura 2.14. O Fe(II) na desoxihemoglobina está na configuração h.s., possuindo um tamanho inadequado para ser acomodado na cavidade central do anel porfirina. Durante a oxigenação, o íon ferro passa para um estado de baixo spin deixando livres os orbitais de maior energia (e_g). Com isso, há diminuição do raio do ferro, de 0,78 Å para 0,61 Å, de forma que ele pode se ajustar no plano do anel. Como já foi discutido anteriormente, o deslocamento do ferro em direção ao plano hemo é transmitido para as outras sub-unidades e é essencial ao efeito cooperativo da hemoglobina (Kaim e Schwederski, 1994).

A presença de um número par de elétrons desemparelhados na paramagnética desoxihemoglobina favorece sua ligação com o oxigênio. A oxigenação resulta em um complexo do tipo (Reed e Cheung, 1977):



O ângulo da ligação Fe-O-O é estimado em 115° (Kaim e Scwederski, 1994). O estado de oxidação do ferro na oxihemoglobina, entretanto, ainda é alvo de estudo e duas alternativas têm sido propostas.

Pauling e Coryell, em 1936, observaram pela primeira vez o caráter diamagnético da oxihemoglobina e o atribuíram à formação de um complexo de Fe(II) l.s. com $^1\text{O}_2$ coordenado, do tipo $\text{Fe(II)O}_2(0)$. Segundo este formalismo, durante a oxigenação haveria transferência da densidade eletrônica do O_2 ligado para o centro metálico eletropositivo, enquanto que os orbitais d parcialmente preenchidos do metal contribuem com uma retro-doação para os orbitais π^* parcialmente preenchidos do O_2 (Kaim e Scwederski, 1994).

Weiss (1964) propôs um mecanismo em que o Fe(II) transfere um elétron para o O_2 coordenado, produzindo um complexo do tipo $\text{Fe(II)O}_2(-I)$. O diamagnetismo observado para a oxihemoglobina seria, então, decorrente do forte acoplamento antiferromagnético entre o elétron desemparelhado do Fe(II) e aquele do oxigênio.

A favor da teoria de Weiss têm-se dados de frequência vibracional da ligação O-O, que se assemelham mais ao O_2^- , dados de espectroscopia de Mössbauer e alguns aspectos da reatividade química da HbO_2 . No entanto, a questão do tipo de ligação entre o ferro hemo e o O_2 permanece sem uma conclusão definitiva. A Figura 2.14 apresenta uma comparação entre as duas teorias discutidas.

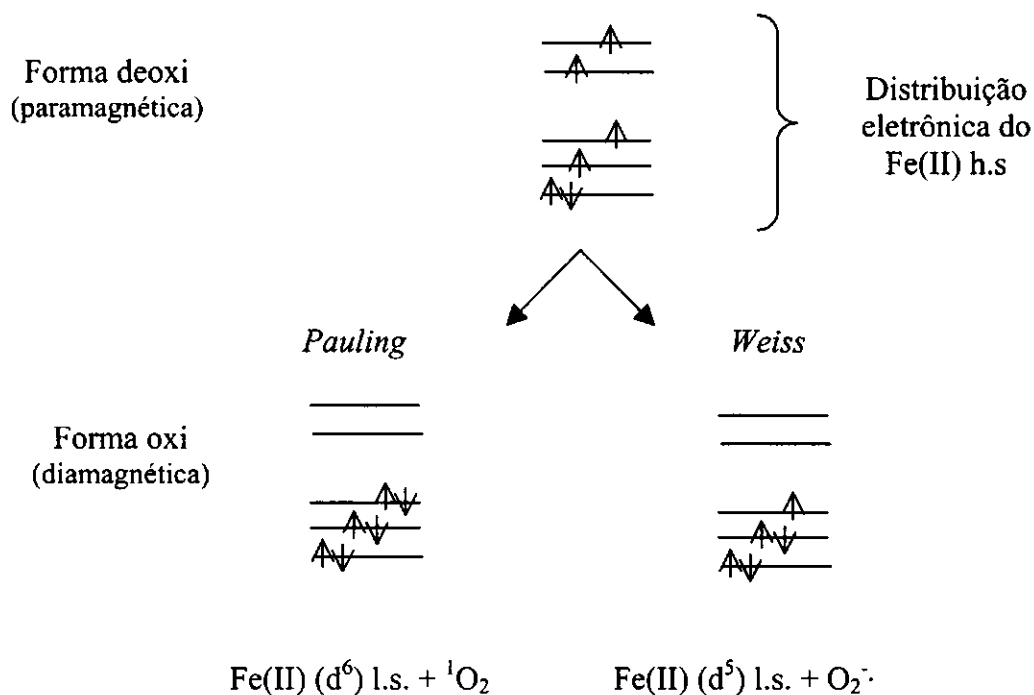


Figura 2.14: Comparação entre as teorias de Pauling & Coryell e Weiss para a ligação entre o ferro hemo e a molécula de oxigênio na oxihemoglobina.

Reed e Cheung (1977) sugeriram que estados de oxidação fracionários, em vez de inteiros, representariam melhor o tipo de ligação nestes complexos FeO_2 . Estimativas de 0,1 a 0,8 têm sido feitas para uma série de complexos $Co-O_2$. Miller e Chance (1995), utilizando a técnica do raio X, estimaram uma transferência de elétrons para o O_2 de 75% no caso da mioglobina.

Na verdade, uma transferência completa de elétrons do metal para o oxigênio causaria uma oxidação do transportador, com perda da sua capacidade de transporte. Complexos que formam ligações reversíveis são aqueles em que o oxigênio ligado pode ser removido por uma mudança na temperatura, pressão parcial do gás, pH ou outras condições. A oxigenação reversível requer que o composto seja capaz de suportar diversos ciclos de oxigenação/desoxigenação sem perda apreciável da sua atividade

2.6 SUBSTITUTOS DO SANGUE

A extração da hemoglobina a partir dos eritrócitos possibilitaria um uso mais eficiente e seguro do sangue doado. Soluções de hemoglobina são mais eficientes na captura e liberação de oxigênio que os eritrócitos, pois oferecem uma menor resistência ao transporte (Page et al., 1998); outra vantagem é que seu uso elimina a preocupação com a compatibilidade de tipos sanguíneos, além de não apresentar limite quanto ao tempo de estocagem e permitir a esterilização para remover microorganismos patogênicos (Sekiguchi, 1993, Farmer et al., 1993, Matsura et al., 1993, Winslow e Chapman, 1994).

Grande esforço tem sido empregado na obtenção de substitutos para o sangue, moléculas que possam desempenhar a mesma função de hemoglobina, mas sem as suas limitações. A maioria dos estudos envolve o uso de transportadores de oxigênio baseados na hemoglobina modificada (HBOCs), mas outros tipos substitutos também têm sido testados.

Os primeiros substitutos surgiram durante a II Guerra Mundial, quando soluções aquosas de polivinilpirrolidona (PVP) foram empregadas apenas para manter o volume sanguíneo. Durante a Guerra do Vietnã, soluções aquosas de hemoglobina ou similares foram empregadas sem sucesso, uma vez que produziam muitos efeitos colaterais.

Na década de 60, uma classe de compostos denominados perfluorcarbonos (PFCs) começou a ser testados. A estrutura de uma molécula de PFC é mostrada na Figura 2.15.

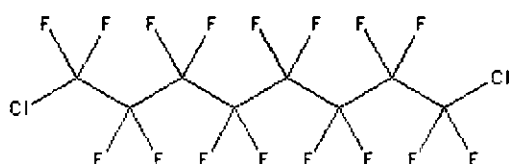


Figura 2.15: Representação da estrutura do 1,8-diclorohexadecafluorooctano.

Os PFCs aumentam consideravelmente a solubilidade do oxigênio na água, de 2,3 % (v/v) para 40 a 50 %; no entanto, por serem hidrofóbicos, requerem o uso conjunto de um agente surfactante (Riess, 1993). Além disto, a contagem de plaquetas no sangue diminui pois as mesmas são seqüestradas juntamente com o PFC para o fígado. Outra limitação é que a solubilidade do O₂ em soluções de PFC a um pressão de 100 mmHg

(que é a pressão de O₂ nos pulmões) é baixa. Pressões parciais maiores que 400 mmHg devem ser empregadas para garantir saturação das soluções (Faithfull, 1993).

A primeira geração HBOCs utiliza hemoglobina reticulada com agentes bifuncionais como glutaraldeído (Guillochon et al., 1981, Guillochon et al., 1986) ou diaspirinas (Yang e Olsen, 1989 e 1991, White e Olsen, 1987, Snyder et al., 1987), que estão em fase avançada de teste (Chang, 1999).

A segunda geração de substitutos compreende as poliHb-CAT-SOD, hemoglobinas reticuladas com as enzimas catalase (CAT) e superóxido-dismutase (SOD), a fim de minimizar os problemas de toxidez causados pelos subprodutos da autoxidação da hemoglobina, como superóxidos e outros radicais (Chang, 1999).

A terceira geração é formada por hemoglobina encapsulada em lipossomas ou nanocápsulas biodegradáveis, juntamente com as enzimas catalase e superóxido-dismutase (Sakai et al., 1996, Chang et al., 1999).

Além da hemoglobina humana, hemoglobina de origem animal, especialmente a bovina, tem sido intensivamente estudada, por ser mais barata e abundante. Na hemoglobina bovina a ligação do oxigênio é regulada por íons Cl⁻, em vez de DPG, como ocorre na hemoglobina humana. Além disso, sua afinidade é inferior à hemoglobina humana, o que facilita a completa liberação do oxigênio nos tecidos (Lee et al., 1993, Standl, 1996). A Tabela 2.4 apresenta os progressos alcançados no campo de substitutos do sangue.

Embora melhorias significativas no tempo de retenção intravascular e no controle da afinidade pelo oxigênio tenham sido obtidas, a taxa de autoxidação destes substitutos, em geral, aumenta (Guillochon et al., 1981, Guillochon et al., 1986, Snyder, 1987, Yang e Olsen, 1989, Benesch, 1994, Nedjar-Arroume et al., 1995, Ketcham e Cairns, 1999). Tal fato não constituiu séria limitação se o objetivo é estabilizar um paciente durante choque hemorrágico ou manter um nível suficiente de oxigenação dos tecidos até que o paciente se submeta à transfusão de sangue.

Tabela 2.4: Situação dos substitutos de sangue em fase avançada de testes clínicos (Tobias, 2000).

Produto	Empresa	Fonte da Hemoglobina e Modificação
HemAssist	Baxter	Humana com diáspirina Reticulada
PolyHeme	Northfield	Humana com glutaraldeído Polimerizada
HemoLink	Hemosol	Humana com o-rafinoose Polimerizada
Hemopure	Biopure	Bovina com glutaraldeído Polimerizada
PHP	Ajinomoto/ Apex	Humana Piridoxalada Conjugada com polioxietileno
PEG-Hb	Enzon	Bovina com polietileno Conjugada com glicol
Optro	Somatogen	Recombinante expressa em E. Coli Humana reticulada

Paralelamente às aplicações clínicas, os transportadores de oxigênio podem também ser empregados, por exemplo, na construção de sensores (Minato et al., 1993) e na aeração de culturas submersas (Leung, et al., 1997). Uma outra abordagem é a utilização de soluções de hemoglobina no transporte de oxigênio através de membranas (Scholander, 1960, Wittenberg, 1966). Nestes casos, o observado aumento na taxa de autoxidação da hemoglobina e derivados é de especial importância e deve ser contornado a fim de viabilizar o uso desses transportadores.

2.7 TRANSPORTE DE O₂ EM SOLUÇÕES DE HEMOGLOBINA

Scholander (1960) realizou o primeiro estudo sobre transporte facilitado de oxigênio. Foi observado um aumento de 8 vezes no fluxo de oxigênio relativamente ao nitrogênio quando uma membrana microporosa era impregnada com solução aquosa de hemoglobina. O transporte seletivo do O₂ também foi observado em soluções contendo mioglobina, embora, neste caso, uma rápida degradação do transportador tenha limitado a vida útil da membrana (Scholander, 1960).

Wittenberg (1966) deu continuidade à linha de pesquisa, estudando o mecanismo de difusão do oxigênio através dessas membranas. Foi proposto que o fluxo total de

oxigênio através da solução de hemoglobina seria dado por dois componentes distintos, que são aditivos: o fluxo difusivo simples, que independe da presença da hemoglobina, e o fluxo facilitado, responsável pelo aumento da taxa de difusão. Verificou-se também, que hemoglobina e mioglobina aumentavam o fluxo de oxigênio em uma mesma extensão por mol de hemo, já que esta é a unidade à qual o oxigênio se liga. Testes com Hemeritina mostraram uma mesma razão de ligação de oxigênio por massa molar que a hemoglobina e mioglobina. O valor de P_{50} em torno de 2,2 mmHg mostra uma afinidade pelo O_2 relativamente elevada de forma que houve um aumento significativo no fluxo do oxigênio, mas inferior ao proporcionado pela hemoglobina. Além disso, enquanto que nas outras hemo-proteínas a ligação do monóxido de carbono anula o transporte facilitado do oxigênio, a hemeritina parece não reagir com o CO (Wittenberg, 1966).

Foi também observado que o aumento na massa molar da proteína resultava em uma diminuição do transporte facilitado, sendo que proteínas com massa molar maior que 2000 KDa não promoviam transporte facilitado do O_2 (Wittenberg, 1966).

Chen et al. (1996) também estudaram o mecanismo de transporte facilitado através de soluções aquosas de hemoglobina, tendo este sido bem descrito pelo modelo da dupla sorção. Boa permeabilidade ao oxigênio foi observada, com uma seletividade também elevada.

No entanto, a maior barreira a uma ampla utilização da hemoglobina é a sua autooxidação, com formação da ferrihemoglobina, ou metaemoglobina. A hemoglobina em soluções *ex-vivo* é instável, principalmente em água, um solvente prótico. Várias tentativas de estabilizar a hemoglobina, como adsorção, ligação covalente e oclusão, geralmente conseguem protegê-la contra a desnaturação, mas autooxidação ainda persiste (Nedjar-Arroume et al., 1995).

Tsuchida (1993), trabalhando com hemoglobina encapsulada em lipossomos, observou que mais de 10 % da hemoglobina tinha sido convertida em metaemoglobina após 60 dias de estocagem a 4°C. Domokos et al. (1993) estocaram lipossomas a 4 °C em atmosfera de N_2 por um período superior a um ano, ao final do qual o conteúdo de metaemoglobina foi de 36 %. Nelson et al. (1993) estudaram a estabilidade da hemoglobina modificada por reticulação com diaspirinas e observaram que soluções

estocadas a -20°C eram estáveis por um período superior a um ano, mas quando mantidas sob refrigeração a 4°C , este período era reduzido a algumas semanas. Em temperatura ambiente, as soluções mantiveram-se estáveis por algumas horas.

Desta forma, o próximo capítulo é dedicado ao estudo dos fatores que levam à perda de estabilidade da hemoglobina e mioglobina e dos mecanismos envolvidos na reação de autoxidação dessas proteínas.

2.8 CONCLUSÕES

Os principais transportadores de oxigênio naturalmente encontrados são hemoglobina, mioglobina, hemocianina e hemeritrina. A hemoglobina é, sem dúvida, o mais importante de todos, pela proporção em que ela ocorre e pelas características peculiares por ela apresentadas, sendo por isso a mais estudada entre todas as proteínas. A mioglobina também apresenta propriedades transportadoras, mas devido à alta afinidade pelo oxigênio, sua principal função no organismo é a de estocagem do gás nos tecidos. A hemocianina e hemeritrina são menos conhecidas e mesmo as suas características e propriedades ainda não têm sido totalmente elucidadas.

As vantagens que podem advir da obtenção de um substituto para as células vermelhas do sangue, como possibilidade de esterilização do material, estocagem por períodos prolongados e ausência de preocupação com efeitos imunológicos, justificam o grande esforço concentrado na busca dos chamados substitutos do sangue, ou sangue artificial.

Muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de contornar as limitações inerentes ao uso direto da hemoglobina isolada a partir do sangue, humano ou de outras fontes. Tais limitações são, basicamente, a maior afinidade pelo oxigênio apresentada pela hemoglobina acelular e seu curto tempo de permanência na circulação, consequência da degradação dos tetrâmeros a dímeros. Neste aspecto, o uso da hemoglobina modificada, seja microencapsulada ou reticulada, constitui grande avanço para a obtenção de um transportador adequado para uso clínico. Emulsões à base de fluorcarbonos também têm sido testadas com sucesso.

Além da evidente importância clínica da hemoglobina, é possível vislumbrar outras aplicações baseadas na sua habilidade de ligar reversivelmente o oxigênio molecular,

como a construção de sensores de O₂ e a aeração de culturas submersas. O uso de soluções de hemoglobina impregnadas em membranas microporosas, com vistas à separação de oxigênio a partir do ar, constitui uma outra linha de pesquisa que vem sendo investigada em alguns trabalhos.

O uso de membranas líquidas na obtenção de O₂ com elevado grau de pureza já é alvo de estudo há algumas décadas, sendo que a maioria dos trabalhos relatados utiliza compostos à base de cobalto para complexar o oxigênio. A facilidade de isolamento, purificação e caracterização da hemoglobina e suas ótimas propriedades transportadoras são um incentivo ao uso desta em substituição aos transportadores sintéticos, ou como um modelo para estudar o fenômeno de oxidação desses transportadores.

Embora resultados animadores tenham sido obtidos com a hemoglobina, esta também apresenta o problema da oxidação irreversível quando se encontra fora dos eritrócitos. Tal limitação não chega a inviabilizar seu uso para fins clínicos, visto que a mesma pode ser estocada a temperaturas suficientemente baixas de forma a inibir a oxidação. No entanto, para o objetivo considerado neste trabalho, a formação da metaemoglobina deve ser controlada a fim de garantir a viabilidade do processo.

CONTEÚDO – CAPÍTULO 3

3.1 Introdução	46
3.2 Estabilidade das Hemo-proteínas em Solução	48
3.2.1 Efeito da Concentração de O ₂ Dissolvido.....	50
3.2.2 Efeito da Estrutura da Proteína	51
3.2.3 Efeito do pH da Solução	53
3.2.4 Efeito do Agente Nucleofílico	54
3.3 Mecanismos de Oxidação.....	55
3.3.1 Mecanismo Dissociativo	55
3.3.2 Mecanismo Oxidativo	56
3.3.3 Deslocamento Redutivo	59
3.4 Estabilização de Hemo-proteínas	62
3.4.1 Efeito de Mutações na Cavidade Distal	62
3.4.2 Efeito do Solvente.....	65
3.4.3 Efeito da Substituição do Metal do Hemo	67
3.4.4 Efeito da Adição de Agentes Redutores	68
3.5 Conclusões.....	69

ESTABILIDADE DA MIOGLOBINA

Neste capítulo, discute-se a reação de oxidação de hemoglobinas e mioglobinas, a qual resulta na produção da forma férrica dessas proteínas, com conseqüente comprometimento da capacidade de transporte de oxigênio. Inicialmente, são apresentados os mecanismos de redução da metaemoglobina no interior dos eritrócitos metabolicamente ativos. Em seguida, são discutidos a estabilidade e os fatores que influenciam a taxa oxidação em soluções ex-vivo. Os mecanismos propostos na literatura são apresentados e avaliados quanto à sua consistência em relação às observações experimentais relatadas. Por fim, são analisadas algumas estratégias adotadas visando melhorar as características de estabilidade das soluções.

3.1 INTRODUÇÃO

A metaemoglobina está presente no sangue humano em baixas concentrações (inferiores a 3%) como resultado da ação de um sistema para redução de Fe(III) a Fe(II). A enzima NADH-citocromo b₅ oxidorreductase (metaemoglobina redutase – MHbR), presente nos músculos e células vermelhas, previne o acúmulo da forma férrica. Além disto, existe um eficiente sistema de dismutação do O₂^{-•} pela enzima superóxido-dismutase e de quebra do H₂O₂ pelas enzimas catalase e glutathiona peroxidase (MacDonald, 1994). Estas enzimas previnem os efeitos deletérios do superóxido e do peróxido na estabilidade da hemoglobina, como será visto posteriormente. A Figura 3.1 ilustra as reações que ocorrem no interior dos eritrócitos.

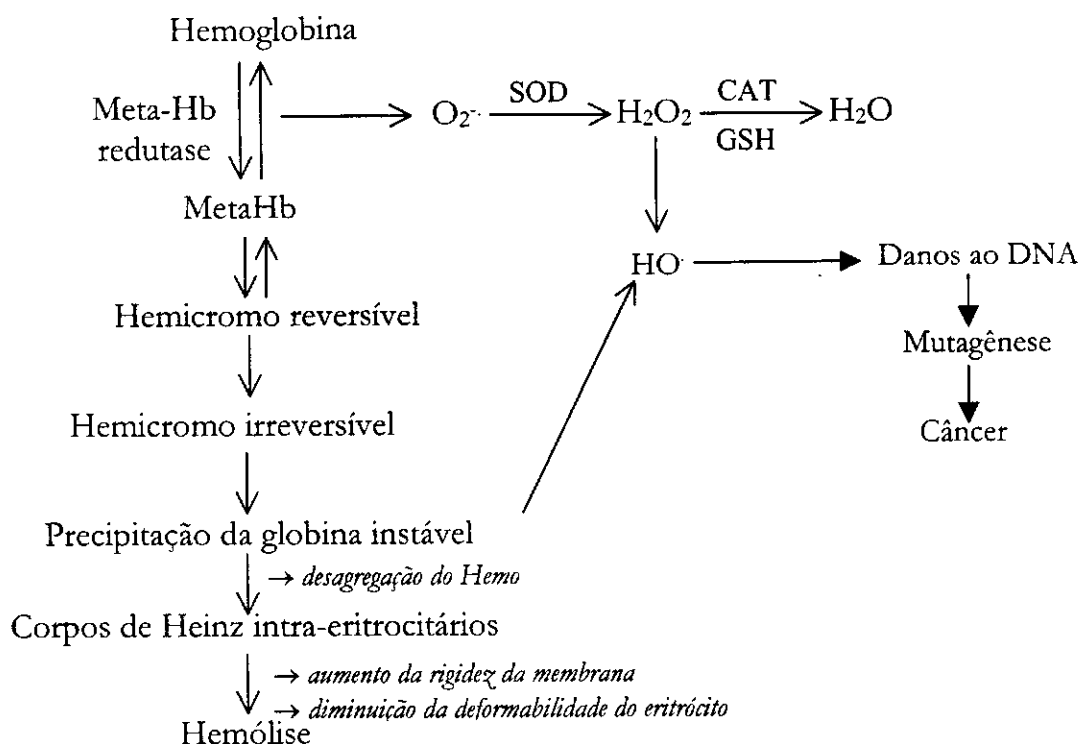


Figura 3.1: Etapas envolvidas na transformação da hemoglobina em metaemoglobina e posterior desnaturação (MacDonald, 1994).

Muitas drogas, como fenacetina, sulfas e derivados, compostos químicos como nitritos e nitratos presentes nos materiais de limpeza, óxido de enxofre expelido por indústrias de fertilizantes e refinarias de petróleo, entre outros produtos, provocam um aumento taxa de oxidação da hemoglobina no sangue. Na presença dessas substâncias, ocorre um desequilíbrio no sistema oxi-redutor de forma que a enzima MHbR não é capaz de reduzir toda metaemoglobina formada. A metaemoglobina acumulada converte-se, então, em hemicromos, nome genérico dado à forma férrica de baixo spin na qual a sexta posição de coordenação do metal é ocupada por um ligante endógeno, fornecido pela própria hemoglobina (Rifkind et al., 1994).

A formação de hemicromos reversíveis, como mostrado no esquema da Figura 3.1, é um passo intermediário na formação de um outro tipo de hemicromo, que não pode ser reconvertido à hemoglobina e precipita dando origem aos corpos de Heinz, podendo culminar com o rompimento dos eritrócitos (Rachmilewitz et al., 1971).

3.2 ESTABILIDADE DAS HEMO-PROTEÍNAS EM SOLUÇÃO

Contrariamente ao que acontece no interior dos eritrócitos, a ausência de um sistema redutor provoca o acúmulo de metaemoglobina em solução. A forma férrica da proteína não transporta oxigênio, sendo, portanto, biologicamente inativa, o que tem despertado grande interesse na natureza das reações de oxidação de hemoglobinas e mioglobinas. Os detalhes da reação de oxidação têm sido investigados por muitos autores, mas uma compreensão exata das reações envolvidas ainda não foi atingida.

Sabe-se que complexos porfirina-ferro (II) reagem rápida e irreversivelmente com o oxigênio formando oxo-dímeros, via intermediários peroxo, como mostrado na Figura 3.2 (Kaim e Shwederski, 1994). No caso de proteína nativas, entretanto, um mecanismo de oxidação que envolva a formação de μ -peroxo-dímeros não é apropriado, visto que a matriz envolvendo o ferro do grupo hemo previne a aproximação de dois centros metálicos. A importância da matriz globina na estabilização da proteína é ilustrada na Figura 3.3 .

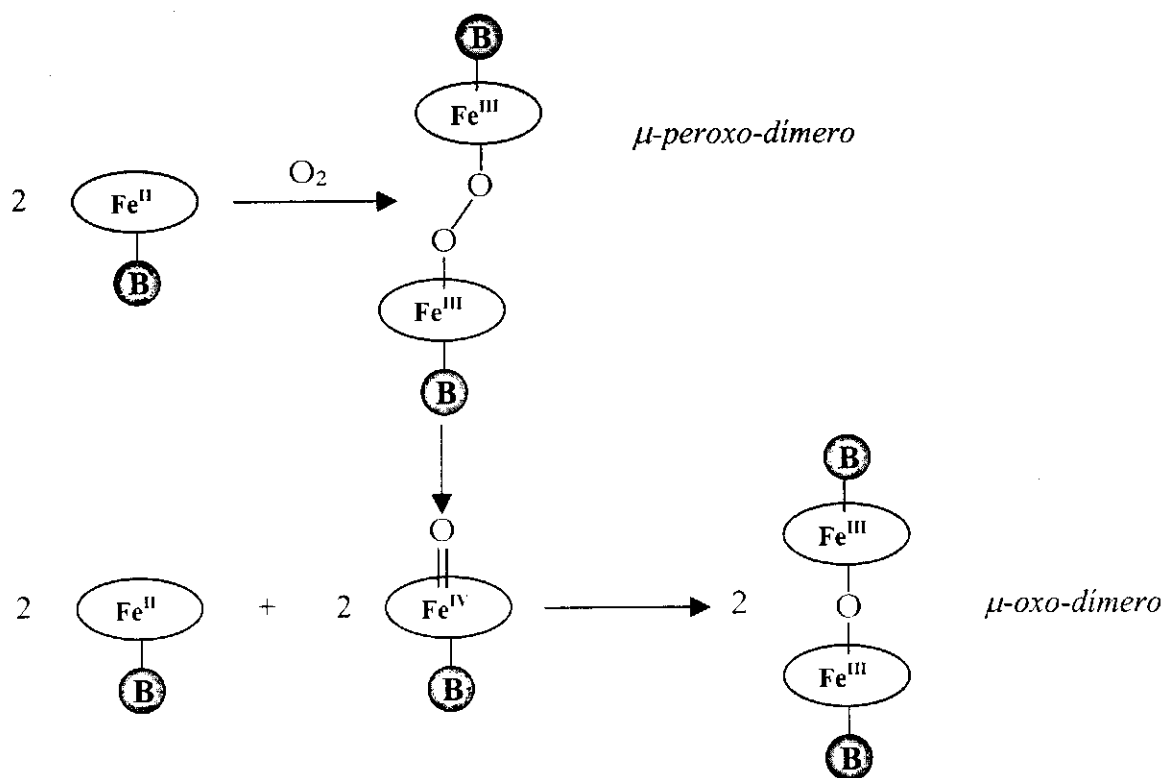


Figura 3.2: Formação do oxo-dímeros via intermediários peróxidos nos compostos sintéticos. B= base axial.

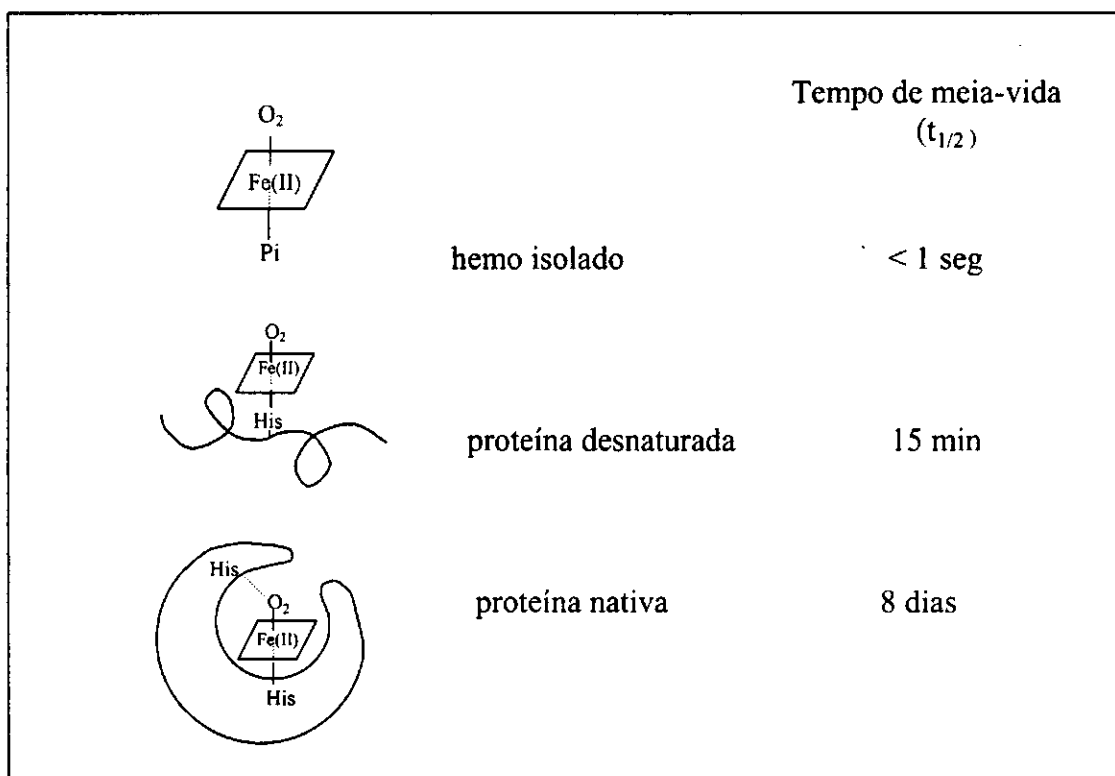


Figura 3.3: Importância da matriz globina na estabilidade do complexo FeO_2 (Shikama, 1998). De cima para baixo: Hemo isolado, ligado à uma base piridina (Pi); Mioglobina desnaturada na presença de uréia 8 M (a cadeia está desdobrada); Mioglobina nativa. $T = 25^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,5$.

Desde o trabalho pioneiro de Brooks (1931) com hemoglobinas, e de George e Stratman (1952) com mioglobinas, a reação de oxidação destas proteínas vem sendo intensivamente estudada. Ao longo dos anos, muitos mecanismos para esta reação têm sido sugeridos na literatura. Apesar de não haver um consenso, qualquer que seja o mecanismo proposto, o mesmo deve responder por algumas características observadas em praticamente todos os trabalhos realizados.

Embora Keilin (1961) não tivesse observado a formação de radicais peróxido e superóxido, o que influenciou muitos trabalhos da época, a participação destas espécies na oxidação da hemoglobina foi comprovada posteriormente por outros autores (Wever, et al., 1973, Winterbourn et al., 1976, Sutton et al., 1976). Foi constatado também que a taxa de oxidação depende de fatores como concentração da proteína, pH e concentração de oxigênio no meio, bem como da presença de agentes nucleofílicos (George e Stratmann, 1952; Satoh e Shikama, 1981, Wallace et al., 1982, Brantley et al., 1993). Além disto, a taxa de oxidação varia de proteína para proteína e é afetada por modificações na estrutura da mesma, como alterações dos aminoácidos constituinte das

cadeias e substituições na porfirina do grupo hemo (Wallace et al., 1982, Brantley et al., 1993). A influência de cada um desses fatores será discutida a seguir.

3.2.1 Efeito da Concentração de O₂ Dissolvido

A oxidação espontânea de hemoglobinas e mioglobinas, chamada de autoxidação, apresenta forte correlação com a quantidade de oxigênio presente no meio, como mostra a Figura 3.4.

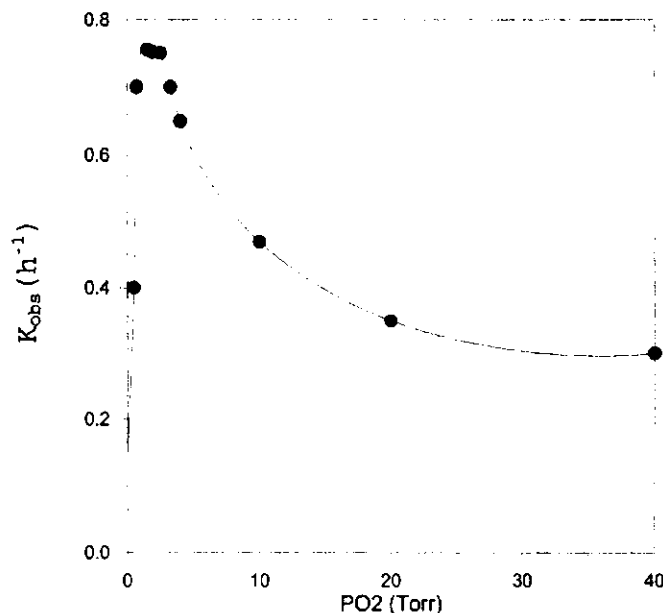
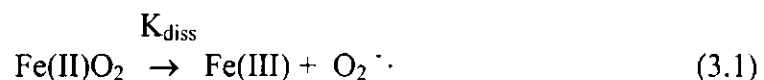


Figura 3.4: Dependência da taxa de autoxidação em relação à pressão de oxigênio para a mioglobina eqüina, do músculo cardíaco. Dados experimentais de George e Stratmann (1952).

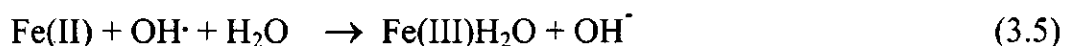
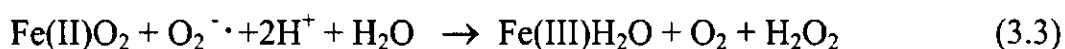
No gráfico da Figura 3.4 é possível encontrar duas regiões distintas. Inicialmente, a taxa de autoxidação aumenta com a pressão parcial de O₂, mas posteriores aumentos em pO₂ levam a uma diminuição no valor da taxa, que se aproxima assintoticamente de K_{diss}, a constante de dissociação do íon superóxido, dada pela equação 3.1:



Na equação 3.1, Fe(II) representa o hemo na sua forma reduzida e Fe(III), hemo na forma oxidada, como ocorre na metaemoglobina e metamioglobina. O superóxido

produzido durante a reação de autooxidação também contribui para aumentar a taxa de oxidação, visto tratar-se, ele próprio, de um agente oxidante. Watkins et al. (1985) observaram que a presença de catalase (CAT) inibiu em 50% a taxa de autooxidação da hemoglobina, indicando ser este o percentual da reação global atribuído ao peróxido e seus subprodutos. Quando superóxido-dismutase (SOD) também está presente, a taxa é inibida em 75%. Wintebourn et al. (1976) também haviam observado semelhante comportamento.

Baseado nestas observações, Watkins et al. (1985) propuseram um mecanismo para a ação do superóxido e do peróxido sobre a hemoglobina. Cabe ressaltar que o mecanismo pelo qual se processa a reação 3.2, que representa a etapa de autooxidação propriamente dita, será discutida posteriormente.



A estequiometria global (reação 3.6) mostra que uma molécula de O_2 sofre redução de 4 elétrons, provenientes de 4 íons Fe ($\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{OH}^-$), sendo que as outras 3 moléculas de O_2 são liberadas. Ou seja, de cada mol de O_2 ligado, tem-se que 0,25 mol é usado para oxidação enquanto 0,75 mol é liberado, como já tinha sido observado por Brown e Mebine (1979) na oxidação da mioglobina.

Acredita-se que a produção de radicais OH^{\cdot} a partir da desoxihemoglobina (reação 3.4) ocorra por meio de uma reação de Fenton, envolvendo o íon metálico (Sadzadeh et al., 1984).

3.2.2 Efeito da Estrutura da Proteína

A hemoglobina em solução tende a dissociar-se em dímeros, de modo a estabelecer um equilíbrio entre as formas tetramérica e dimérica, dado pelo constante de equilíbrio K_D :

$$K_D = \frac{[\text{dímeros}]^2}{[\text{tetrameros}]} \quad (3.7)$$

A dissociação é tanto maior quanto menor a concentração de hemoglobina. Como a taxa de autoxidação é bastante dependente da estrutura quaternária da proteína, é esperado que a dissociação da hemoglobina em dímeros influencie sua estabilidade. Zhang et al. (1991) observaram que a taxa de autoxidação dobrava quando a concentração de hemoglobina era reduzida de 200 μM para 20 μM . Nesta faixa de concentração, a variação na afinidade pelo oxigênio é de menos de 10 %, logo a diminuição da estabilidade não poderia ser atribuída a este fator.

Por outro lado, sabe-se que a dissociação em dímeros resulta em quebra das interações entre as unidades $\alpha 1$ e $\beta 2$, alterando o ambiente do grupo hemo, o que pode facilitar a difusão de nucleófilos exógenos e endógenos através da matriz globina em direção ao centro metálico. A estas mudanças conformacionais na estrutura da proteína foi atribuído o aumento observado na taxa de oxidação (Zhang et al., 1991).

Mesmo no caso de um dímero, as cadeias α e β da hemoglobina exibem diferentes taxas de oxidação (Rachmilewitz et al., 1971). Balagopalakrishna et al. (1998a e 1998b) observaram que, antes de deixar a cavidade onde se encontra o hemo, o íon $\text{O}_2^{\cdot -}$ gerado pela reação de oxidação reage com o resíduo cisteína 93, presente apenas nas subunidades β . A oxidação via radicais $\text{O}_2^{\cdot -}$, como representada pela equação 3.3, é, então, suprimida, o que parece ser responsável pela maior estabilidade das cadeias β comparativamente às cadeias α .

Tsuruga e Shikama (1997) observaram que a curva de autoxidação da hemoglobina apresentava duas regiões distintas, podendo-se calcular uma constante de taxa diferente para cada porção da curva. Kawanishi e Caughey (1985) também haviam observado este comportamento, denominado bifásico, na reação de oxihemoglobina com Fe(II)EDTA . Tal comportamento pode ser atribuído às diferenças intrínsecas na reatividade das cadeias α e β .

3.2.3 Efeito do pH da Solução

O pH tem um efeito bastante pronunciado na taxa de autoxidação. Enquanto variações na concentração de O_2 dissolvido provocam alterações no valor da taxa de, no máximo, 2 a 3 vezes, a mudança do pH da solução pode aumentar a taxa em mais de 100 vezes em relação ao valor mínimo, como observado na Figura 3.5.

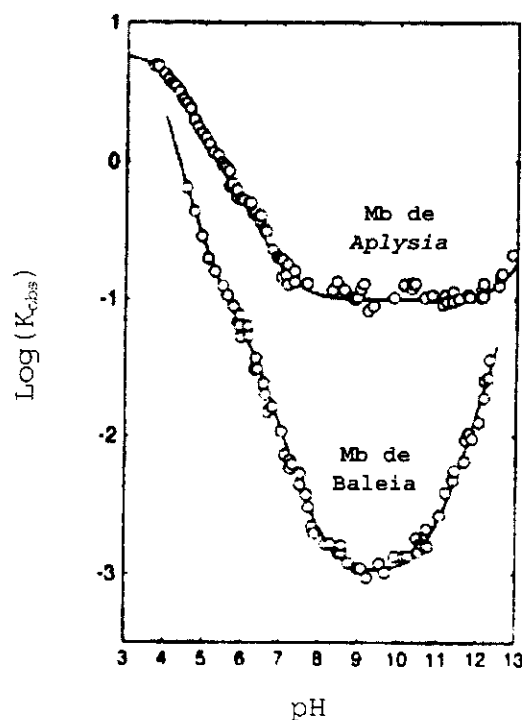


Figura 3.5: Dependência do pH para a taxa de autoxidação da mioglobina de baleia e *Aplysia* (Shikama, 1998).

A taxa de autoxidação pode variar de proteína para proteína por um fator de mais de 100 vezes em alguns casos, mesmo padronizando-se o pH e utilizando tampão saturado em ar (Shikama, 1998). Os estudos realizados (Satoh e Shikama, 1981, Wallace et al., 1982, Brantley et al. 1993) mostram claramente que a autoxidação aumenta com a concentração de íons H^+ . Nos trabalhos de Shikama e co-autores, onde foi estudado o efeito do pH numa faixa de 4 a 13, eles observaram que a taxa de autoxidação aumenta também com a concentração de íons OH^- , de forma a ocorrer um mínimo na taxa em torno de pH ligeiramente alcalino, como pode ser visto na Figura 3.5. Olson e co-autores (Brantley et al., 1993) não observaram esta tendência de aumento com a

concentração de OH^- , mas seus experimentos foram conduzidos numa faixa mais reduzida de pH, entre 4 e 9.

Além disto, Tsuruga e Shikama (1997) observaram que, em meios mais ácidos, a taxa de autoxidação seguia uma cinética bifásica, exibindo, como mencionado anteriormente, duas regiões distintas na curva de autoxidação. Em pH superior a 8,5, a cinética de autoxidação era monofásica. Tais constatações evidenciam a complexidade do efeito do pH sobre a estabilidade das proteínas e a dificuldade em se propor um mecanismo genérico que se aplique a todos os casos.

3.2.4 Efeito do Agente Nucleofílico

A presença de agentes nucleofílicos aniônicos contribui para aumentar a taxa de autoxidação de hemoglobinas e mioglobinas, sendo que a extensão da contribuição depende do tipo de ânion presente. A espécie sobre a qual os nucleófilos atuam, se a forma oxigenada ou desoxigenada dessas proteínas, ainda tem sido investigada (Sato e Shikama, 1974, Wallace et al., 1982, Brantley et al., 1993).

A ação do ânion depende de sua capacidade doadora de elétrons para o centro metálico, facilitando uma transferência total de carga do Fe(II) para o O_2 . O efeito do ânion é tanto mais intenso quanto maiores a sua nucleofilicidade e concentração no meio. Edwards (1954) sugeriu que o ataque nucleofílico de um ânion a um centro atômico pode ser relacionado à sua basicidade (H) e capacidade de polarização (P) (Wallace et al., 1982). Utilizando este formalismo, Wallace et al. (1982) ajustaram bem os dados experimentais para mioglobina e hemoglobina.

A ordem de reatividade encontrada para oxidação de hemoglobinas foi:

nitrito > azida > tiocianato > cianato > cianeto > fenol > fluoreto > cloreto > brometo

Sob condições fisiológicas, os principais ânions atuantes são OH^- , Cl^- e HCO_3^- (Wallace et al., 1974). A água também desempenha importante papel nas reações de autoxidação da hemoglobina (Brantley et al., 1993, Shikama, 1998). No caso da mioglobina,

contudo, o Cl^- tem pouca influência na sua oxidação (Satoh e Shikama, 1981, Brantley et al., 1993).

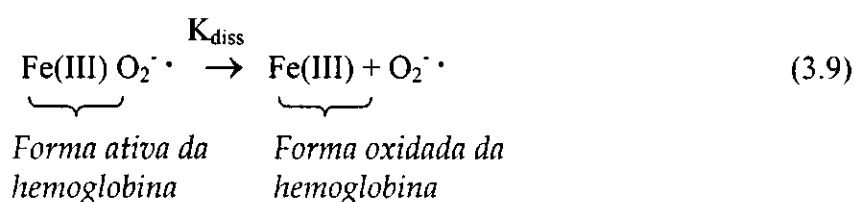
A seguir, os mecanismos de oxidação propostos com base nas observações experimentais serão discutidos.

3.3 MECANISMOS DE OXIDAÇÃO

Os mecanismos propostos na literatura foram agrupados em três classes gerais: dissociativo, oxidativo e de deslocamento redutivo. Os mesmos serão brevemente apresentados e avaliados com relação à sua consistência com as observações experimentais.

3.3.1 Mecanismo Dissociativo

De acordo com a teoria formulada por Weiss (1964), a oxihemoglobina (ou a oximioglobina) poderia ser descrita com um complexo superóxido-ferrihemo, onde o ferro encontra-se no estado férrico e a molécula de oxigênio, como íon $\text{O}_2^{\cdot -}$. Desta forma, durante a autoxidação da hemoglobina, o superóxido se dissociaria do complexo FeO_2 , segundo a reação:



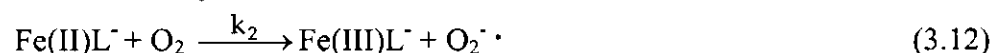
A transferência direta de elétrons do ferro para o O_2 ligado por este mecanismo parece bem razoável, mas a energia de ativação envolvida na dissociação de $\text{O}_2^{\cdot -}$ a partir do complexo FeO_2 , protegido por um ambiente altamente hidrofóbico, é bastante elevada e, por isto, a tendência à autoxidação não pode ser satisfatoriamente explicada pelo mecanismo dissociativo simples (Shikama, 1984).

3.3.2 Mecanismo Oxidativo

Wallace et al. (1974, 1982), estudando a influência de alguns ânions na estabilidade de hemoglobinas, propuseram um mecanismo de autoxidação que consistia no deslocamento do íon $O_2^- \cdot$ por nucleófilos aniônicos.

Nos testes realizados, a taxa de autoxidação aumentava com a proporção de desoxihemoglobina, sugerindo que a espécie sujeita à autoxidação era a forma desoxi da proteína e não oxi, como se imaginava até então.

Foi proposto um mecanismo que era consistente com esta observação. Por este mecanismo, a autoxidação da hemoglobina promovida por prótons e ânions nucleofílicos (L) seguiria um mecanismo pelo qual a desoxihemoglobina é oxidada pelo O_2 não coordenado, para dar $O_2^- \cdot$.

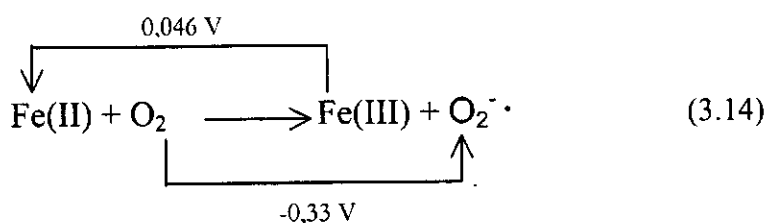


A constante de oxidação seria dada por:

$$k_{ox} = \frac{k_1[L]k_2[O_2]K_d}{(k_{-1} + k_2[O_2])(K_d + [O_2])} \quad (3.13)$$

Por este mecanismo, a ligação de um ânion à espécie desoxi mediará a transferência de um elétron do Fe(II) para o O_2 livre. O efeito observado do pH sobre a taxa de autoxidação poderia, então, ser explicado pela protonação da forma desoxigenada da proteína antes da reação com o ligante. A transferência de elétrons por um mecanismo foi também sugerida por Kawanishi e Caughey (1985), que investigaram a oxidação da hemoglobina por aquapentacianoferrato e ferrocianeto.

No entanto, a adição de um elétron ao O_2 não coordenado é um processo desfavorável, com um baixo potencial redox de $E^\circ(O_2/O_2^- \cdot) = -0,33V$. Se considerarmos um valor de 0,046 V para o potencial redox Fe(II)/Fe(III) na mioglobina, então, ao processo como um todo estaria associado uma mudança de potencial de $-0,37 V$ (Shikama, 1984):



Desta forma a transferência de elétrons para o oxigênio livre não poderia ocorrer espontaneamente por este mecanismo. Wallace et al. (1982) sugeriram que o ligante nucleofílico poderia atuar diminuindo o potencial redox, tornando o processo energeticamente favorável. No entanto, não há evidências que ânions, de fato, liguem-se à forma reduzida da mioglobina ou hemoglobina. Existe possibilidade de que a entrada do nucleófilo na cavidade do hemo reduza a energia de ionização do elétron de valência do ferro, de forma que este possa ser transferido para o O₂ a partir de um sítio distante do hemo (Wallace et al., 1982).

Outro ponto não esclarecido por este mecanismo é que, de acordo com a equação 3.13, quando a concentração de O₂ é muito pequena, a taxa de oxidação tende a zero e isto é inconsistente com as observações experimentais.

Olson e co-autores (Brantley et al., 1993), estudando a autooxidação da mioglobina, concluíram a reação de autooxidação resultava da combinação dos dois mecanismos anteriormente descritos: um mecanismo unimolecular de dissociação do superóxido, similar ao proposto por Weiss (1964) e um mecanismo bimolecular, proposto por Wallace et al. (1982), como representado na Figura 3.6.

A taxa de autooxidação seria dada, então, pela soma de dois termos, que levam em conta os dois mecanismos atuantes na oxidação da proteína:

$$k_{\text{ox}} = \underbrace{\frac{k_1[\text{N}]k_2[\text{O}_2]K_d}{(k_{-1} + k_2[\text{O}_2])(K_d + [\text{O}_2])}}_{\text{oxidação}} + \underbrace{\frac{k_{\text{diss}}[\text{O}_2]}{K_d + [\text{O}_2]}}_{\text{dissociação}} \quad (3.15)$$

Onde k_1 , k_{-1} , k_2 e K_d são as constantes individuais do processo oxidativo, como visto nas equações 3.10 a 3.12, e K_{diss} , a constante de dissociação do superóxido, representada pela equação 3.9.

Segundo a equação 3.15, a altas concentrações de oxigênio, quando pouca desoxihemoglobina está presente, o mecanismo predominante deve ser o dissociativo, enquanto que a baixas $[O_2]$, o mecanismo oxidativo deve predominar.

Como pode ser visto na Figura 3.7, os dados experimentais são bem descritos pela combinação dos dois mecanismos de autoxidação.

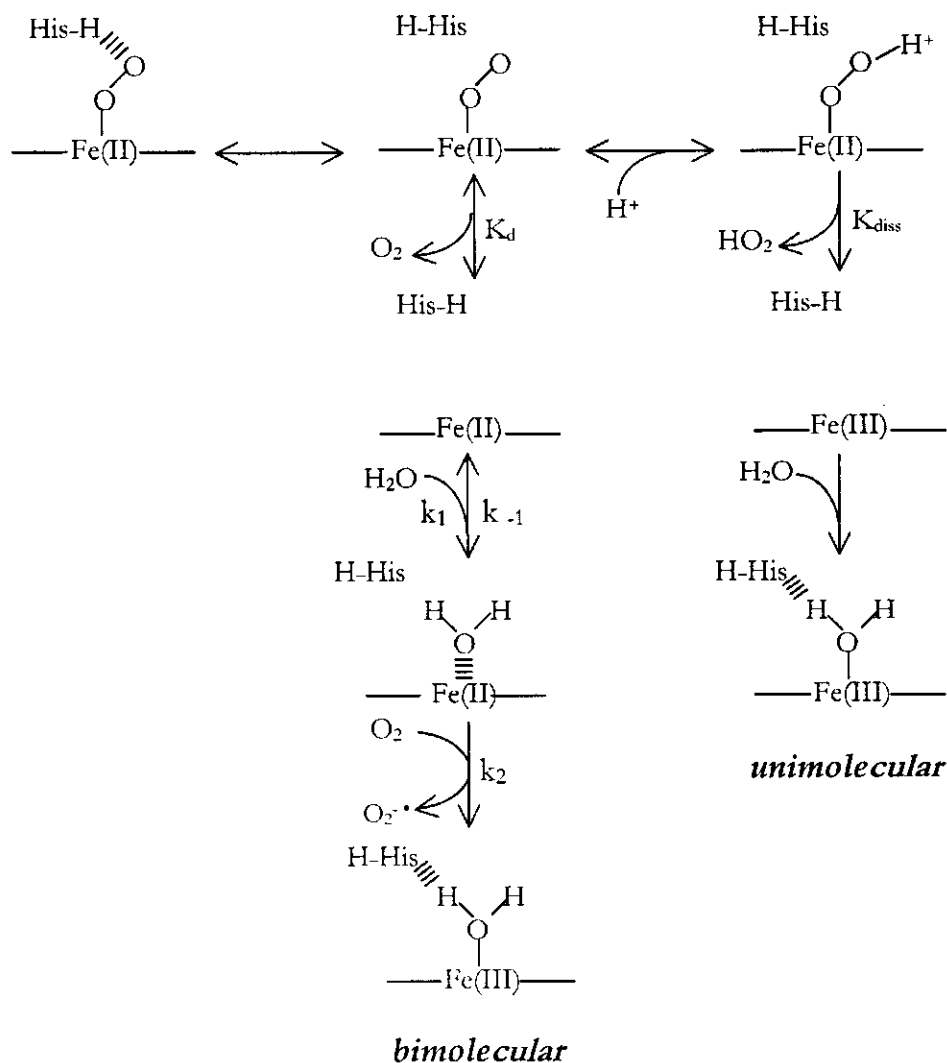


Figura 3.6: Mecanismo de autoxidação de mioglobinas. Adaptado de Brantley et al. (1993).

Outro indício que serviria para confirmar esta teoria é que quando a oxidação da mioglobina foi conduzida na presença de azida, apenas em baixas concentrações de O_2 , a taxa de autoxidação foi influenciada pela presença deste nucleófilo (Branley et al., 1993). Isto confirmaria que, em concentrações saturantes de O_2 , o mecanismo dominante seria o dissociativo, não sendo, portanto, afetado pela presença de ânions.

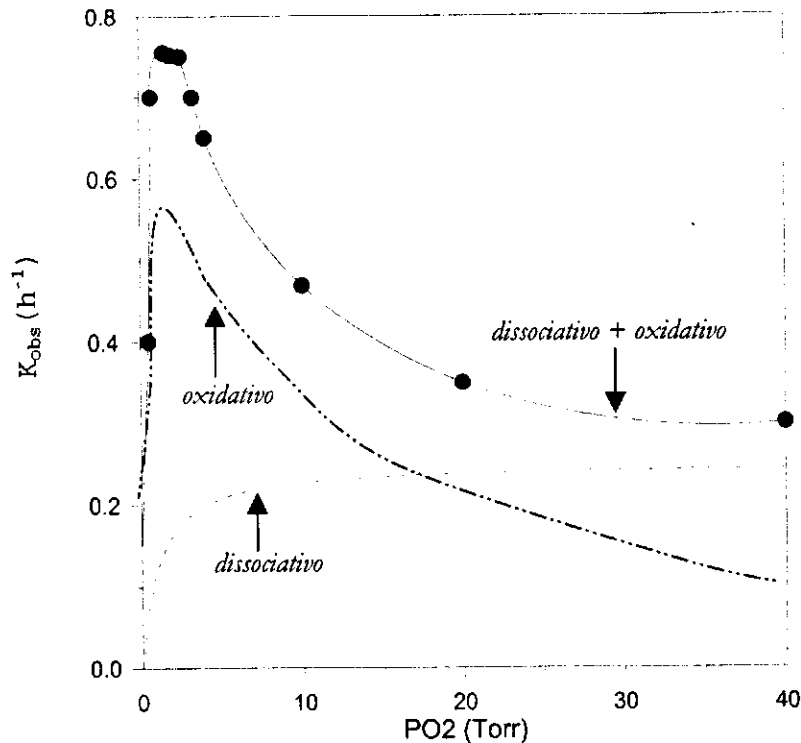
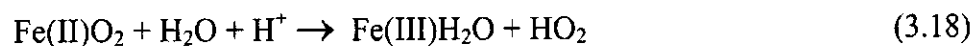
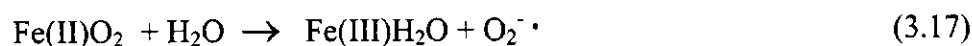
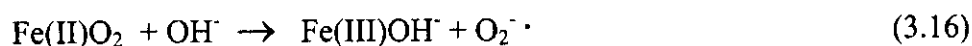


Figura 3.7: Efeito da concentração de oxigênio na taxa de autooxidação de mioglobina bovina. Dados experimentais de George e Stratmann (1952).

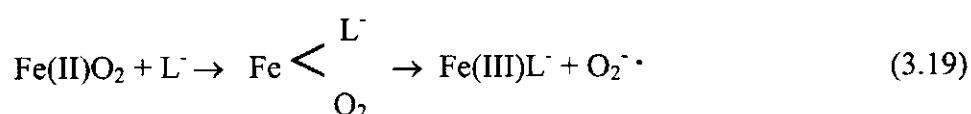
O efeito do pH foi estudado utilizando-se mutantes em que a histidina distal era substituída por outros aminoácidos. Foi observado um aumento na taxa de oxidação quando o pH diminuía de 9 para 7, em presença ou não da histidina, indicando que a protonação deste resíduo não deve responder pela dependência do pH. Portanto, a dependência observada foi atribuída à protonação do complexo Fe(II)O_2 para formar $\text{Fe(II)O}_2\text{H}^+$, que se dissocia rapidamente em Fe(III) e HO_2 (radical superóxido neutro).

3.3.3 Deslocamento Redutivo

Shikama e co-autores (Sato e Shikama, 1981, Shikama, 1984, Shikama, 1998) propuseram um outro mecanismo para a autooxidação de mioglobinas e hemoglobinas. Este mecanismo envolve um ataque nucleofílico ao centro metálico levando a um deslocamento redutivo do dioxigênio ligado na forma de $\text{O}_2^{\cdot -}$, com conversão do ferro ao estado férrico. Sob condições fisiológicas H_2O e OH^- podem atuar como nucleófilos facilitantes, segundo as reações:



Análises com raios-X comprovam a existência das espécies aqua e hidroximetamioglobina, onde H₂O e OH⁻, respectivamente, encontram-se ligados à proteína oxidada (Shikama, 1998). Nestes casos, a oxiHb formaria com o ligante um complexo intermediário como representado abaixo:



A Figura 3.8 representa o diagrama de mudança de energia para reações da mioglobina com o O₂, com a forma oxigenada servindo como referência (Shikama, 1998).

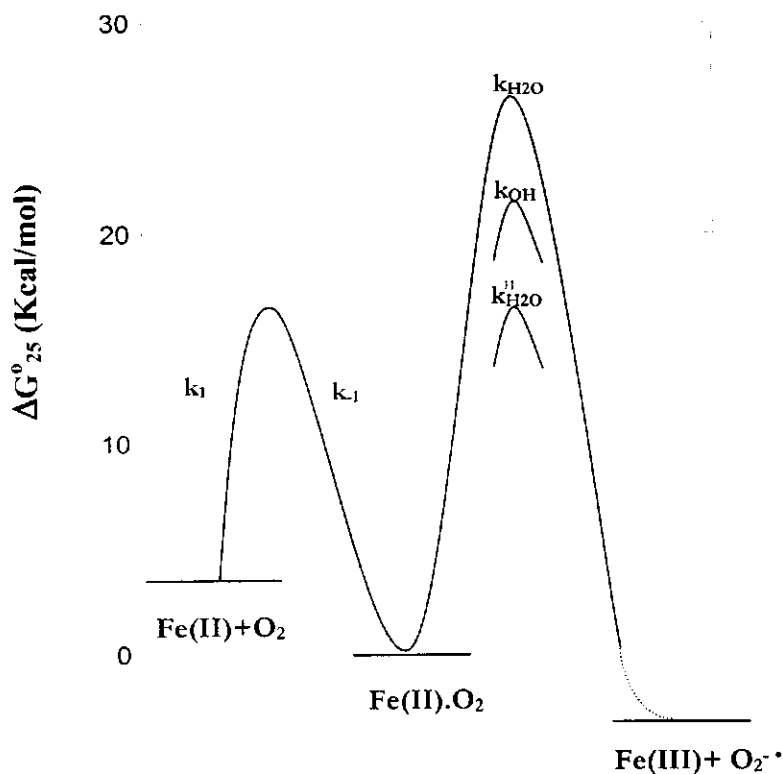


Figura 3.8: Diagrama de energia livre para reações da mioglobina a 25°C (Shikama, 1998). k_1 e k_{-1} são as constantes das reações oxigenação e desoxigenação da mioglobina, respectivamente.

De acordo com este mecanismo, a barreira energética para deslocamento do O_2 como $O_2^{\cdot-}$ na presença de prótons tornar-se-ia comparável àquela da oxigenação reversível, provendo uma explicação razoável para a produção de íons superóxido durante a autoxidação de mioglobinas e hemoglobinas.

O efeito do O_2 na taxa de reação é atribuído por Shikama ao peróxido de hidrogênio produzido durante a autoxidação. Sabe-se que a forma desoxi é a espécie sobre a qual o H_2O_2 age preferencialmente (Watkins, 1985). Assim, quando a pressão parcial de O_2 é baixa, a quantidade de desoxihemoglobina aumenta rapidamente, de forma que a autoxidação via reações 3.3 a 3.5 pode tornar-se bastante significativa.

No entanto, cabe ressaltar que a maioria dos testes de autoxidação é conduzida na presença de catalase e superóxido-dismutase, enzimas que atuam sobre o H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$, respectivamente. Desta forma, seria esperado que, na presença dessas duas enzimas, as reações 3.3 a 3.5 fossem suprimidas. No entanto, segundo Shikama (1998), a magnitude do efeito retardatório da CAT e da SOD varia consideravelmente na literatura e pode não ser suficiente para inibir completamente a ação do de H_2O_2 .

Por outro lado, no trabalho de Brantley et al. (1993) foi usada uma concentração dessas enzimas 12 vezes maior que a encontrada nas células sanguíneas, e ainda assim a dependência da taxa com relação à concentração de O_2 foi mantida. Conclui-se que um mecanismo envolvendo a espécie desoxi explica melhor a dependência da autoxidação das proteínas em relação à concentração de O_2 .

O mecanismo de deslocamento redutivo, por outro lado, explica mais satisfatoriamente o efeito do pH. Como pode ser visto na Figura 3.8, embora a presença de prótons não seja indispensável para a reação de autoxidação, em meio ácido, a barreira energética para dissociação do íon $O_2^{\cdot-}$ é significativamente reduzida. Como resultado, a constante de autoxidação assistida por prótons é aumentada por um fator de 10^6 /mol em relação àquela observada na ausência dos mesmos (Sato e Shikama, 1981). O efeito catalítico do próton seria facilitado pela presença da histidina distal, na medida em que esta proporcionaria o movimento do próton para o O_2 coordenado, via anel imidazola (Shikama, 1984).

Íons OH^- também aumentam a autoxidação uma vez que são nucleófilos mais fortes que a água, sendo responsáveis pelo aumento da taxa observado em pH mais básico. A

extensão da contribuição de cada uma das reações 3.16 a 3.18 é que determinaria o tipo de dependência exibido pela taxa de autooxidação dessas proteínas em relação ao pH do meio. Partindo-se deste mecanismo, Shikama e co-autores têm conseguido descrever com sucesso o comportamento de mioglobinas de várias fontes (*Aplysia kurodai*, músculo de baleia, músculo cardíaco bovino, entre outras).

3.4 ESTABILIZAÇÃO DE HEMO-PROTEÍNAS

A seguir, será discutida a influência de alguns fatores na estabilização de hemoglobinas e mioglobinas.

3.4.1 Efeito de Mutações na Cavidade Distal

Como visto anteriormente, a porção globina das hemo-proteínas desempenha importante papel na estabilização das mesmas relativamente aos compostos sintéticos, onde o íon metálico não se encontra devidamente protegido. Em muitos casos de metaemoglobinemia, os aminoácidos normalmente encontrados na hemoglobina são substituídos por outros que aumentam sua tendência a autooxidação. Desta forma, a manipulação da seqüência de aminoácidos na proteína constitui uma poderosa ferramenta no controle das suas característica de estabilidade (Kawanish e Caughey, 1985, Brantley et al., 1993, Throstensson et al., 1999).

Será discutido abaixo o efeito de modificações em alguns aminoácidos que, por se localizarem na cavidade distal perto do plano hemo, desempenham papel chave na estabilidade de mioglobinas e hemoglobinas. A Figura 3.9 mostra a localização desses aminoácidos. As suas estruturas, bem como as dos demais aminoácidos mencionados, podem ser conferidas no Anexo 1.

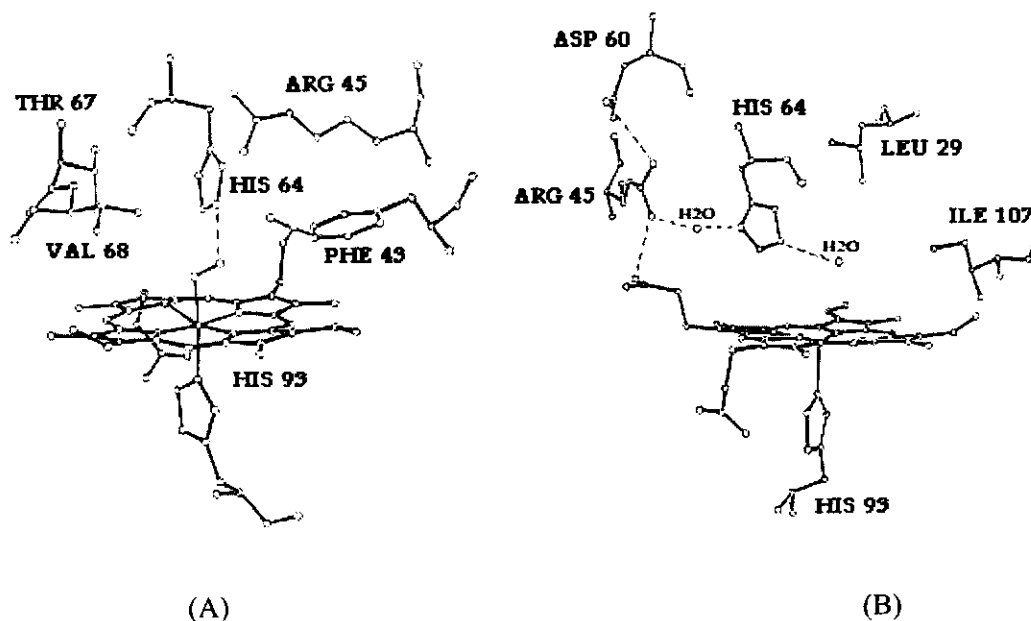


Figura 3. 9: Cavidade distal das formas oxi (A) e desoxi (B) da mioglobina (Brantley et al., 1993).

Histidina distal (His64)

A histidina 64 controla o acesso do solvente à cavidade distal, diminuindo a distância que separa seu carbono α do ferro hemo. Além disso, na forma desoxi, um molécula de água está ligada ao N^{ϵ} da histidina e deve ser deslocada pelo ligante para que este se aproxime do centro metálico. No caso do oxigênio, a variação de energia associada à quebra desta ligação de hidrogênio com a água é compensada pela formação de uma ligação ainda mais forte com o complexo Fe-O-O.

A substituição da His64 por resíduos menos polares como Gly, Ala, Val, Thr, Phe e Glu, leva a uma maior taxa de autoxidação da proteína. Isto pode ser explicado pela perda da ligação de hidrogênio entre o resíduo 64 e o oxigênio ligado, o que facilita a dissociação do mesmo na forma de íon superóxido, como discutido anteriormente nos mecanismos de autoxidação (Brantley et al., 1993).

A substituição por resíduos polares tem efeitos diversos. Hemoglobina Zurich, que possui Arg em lugar de His, apresenta maior taxa de autoxidação, provavelmente por possuir uma cavidade distal maior (Kawanish e Caughey, 1985). No entanto, a substituição de His por Gln aumentou a estabilidade de uma mioglobina mutante (Zhang et al., 1991).

Miele et al. (1999) relataram a obtenção de uma mioglobina mutante, com três substituições na cavidade distal: Leu-Tyr, His-Gln, Thr-Arg (Mb-YQR). A presença de dois resíduos polares, Gln e Tyr, propiciando a formação de duas ligações de hidrogênio com o O₂, bem como o maior impedimento espacial ocasionado pelas cadeias laterais mais volumosas desses resíduos, resultaram em uma taxa de autoxidação três vezes menor e uma afinidade também reduzida.

Valina 68 (E11)

O caráter hidrofóbico da valina é fundamental para assegurar a alta afinidade pelo grupo prostético hemo e para minimizar a tendência à autoxidação. Ela interage tanto com a molécula de água interna, ligada à histidina distal na forma desoxi, quanto com a própria histidina e com o O₂ ligado (Quilin et al., 1995).

A substituição da Val por Leu, Ile e Phe resulta em maiores taxas de autoxidação. No caso da Phe, apenas um pequeno aumento é observado, o que pode ser atribuído a uma compensação entre o enfraquecimento da ligação de hidrogênio da His68 com o O₂ ligado, que tem efeito negativo na estabilidade, e o aumento na hidrofobicidade pelo grupo fenil, que inibe a autoxidação (Brantley et al., 1993).

A substituição por Ile provoca um aumento na constante de dissociação do íon superóxido, respondendo pela maior taxa de autoxidação desse mutante. O mesmo deve ser válido para Leu (Brantley et al., 1993).

Modificações em outras posições

Substituições em outras posições que afetem o tamanho da cavidade hemo também influem na taxa de autoxidação. Ao substituir-se Leu29 por resíduos menores como Val ou Ala, aumentando o tamanho da cavidade distal, a taxa aumenta em até 4 vezes relativamente àquela observada na mioglobina sem modificações (Brantley et al., 1993).

Substituições na periferia do grupo hemo também afetam a estabilidade da mioglobina. Ser45 em lugar de Lys45 provoca um aumento na taxa de oxidação em aproximadamente 7 vezes. A estrutura do cristal de K45S mostra que a cavidade do hemo fica significativamente mais aberta (Brantley et al., 1993).

Substituição da Thr67 por resíduos negativamente carregados, como Glu, provocam um aumento na taxa de oxidação, provavelmente por criar um ambiente favorável à protonação do Fe(II)O₂. Resíduos positivamente carregados como a Arg, por outro lado, inibem a protonação do O₂, estabilizando a mioglobina (Brantley et al., 1993).

Modificações na porfirina

Wallace et al. (1982) estudaram o efeito de substituições na estrutura da porfirina sobre a taxa de oxidação de hemoglobinas. Além de protoporfirina (2,4-divinildeuteroporfirina), foram também investigados os seguintes 2,4-substitutos: mesoporfirina (2,4-dietildeuteroporfirina) deuteroporfirina (2,4-dihidrideuteroporfirina) e diacetilporfirina (2,4-diacetildeuteroporfirina). Observaram que a ordem de reatividade aumentava com a habilidade do substituto de retirar elétrons da porfirina, deixando o centro metálico mais positivo e propício a um ataque por ânions, na seguinte ordem:

diacetil > divinil > dihidro > dietil

3.4.2 Efeito do Solvente

Nedjar-Arroume et al. (1993 e 1995) constataram que a adição de certos álcoois como etanol, butanol, etileno-glicol e glicerol, em concentrações insuficientes para causar desnaturação (Herskovts et al., 1970), promovia um aumento da estabilidade de soluções aquosas de hemoglobina. O efeito estabilizante aumentava com a concentração do álcool até certo ponto, após o qual a taxa de autooxidação voltava a crescer. O melhor desempenho foi obtido em solução de glicerol 40%, seguido de etileno-glicol 40%, 1-butanol 2% e etanol 20%.

A Figura 3.10 contém o tempo de meia-vida para a hemoglobina nas misturas estudadas e a razão entre a taxa de autooxidação nestas misturas e na água pura. A estabilidade promovida pelas soluções alcoólicas pode ser explicada, parcialmente, pela influência sobre a camada de hidratação da proteína. No caso do etanol, por exemplo, a estabilidade máxima foi obtida em uma solução 20%. Sabe-se que, em soluções aquosas de etanol a 22%, as ligações de hidrogênio da água tornam-se mais estáveis e a

hidratação do etanol torna-se completa. Álcoois totalmente hidratados podem ocupar a camada de solvatação da proteína, retendo as moléculas de água e tornando-as menos disponíveis para penetrar na cavidade hemo. Em concentrações superiores a 22%, o etanol destrói a rede tridimensional e as ligações de hidrogênio, diminuindo, assim, seu efeito estabilizante (Nedjar-Arroume et al., 1993).

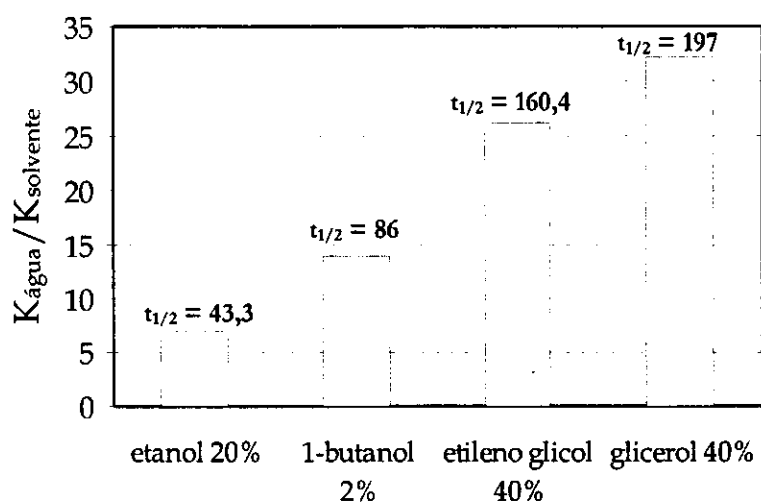


Figura 3.10: Efeito dos álcoois sobre a autoxidação da hemoglobina. Adaptado de Nedjar-Arroume et al. (1995). Dados experimentais obtidos em tampão fosfato, pH 7,5, $T = 20^{\circ}\text{C}$. $t_{1/2}$ em dias. $t_{1/2}$ em água pura = 6,1 dias.

Outro importante fator a ser considerado é o aumento da viscosidade do meio. Como a autoxidação da hemoglobina depende da entrada de agentes nucleofílicos na cavidade hemo, soluções mais viscosas, como as contendo glicerol e etileno-glicol, podem dificultar a migração desses agentes bem como as flutuações das cadeias polipeptídicas da hemoglobina, resultando em maior estabilidade. Finsen et al. (1988), utilizando técnicas de ressonância Raman, observaram que a dinâmica da cavidade hemo é bastante dependente da viscosidade do meio, de forma que a migração de um ligante através da matriz protéica e da interface proteína-solvente deve envolver movimentos das cadeias laterais que são fortemente acoplados ao solvente. Feitelson e McLendon (1991) também observaram que migração de diferentes moléculas através da hemoglobina depende de mudanças conformacionais na estrutura das subunidades.

Análises espectroscópicas mostram que, na presença desses álcoois, há um aumento na distância entre o nitrogênio da histidina proximal e o oxigênio ligado, o que diminui a transferência de carga do ferro para o O_2 , podendo resultar em redução na tendência à

dissociação do superóxido, com menor formação de metaemoglobina (Nedjar-Arroume et al., 1993).

3.4.3 Efeito da Substituição do Metal do Hemo

Hemoglobinas e mioglobinas contendo cobalto, manganês, cobre e níquel têm sido preparadas e avaliadas quanto à reversibilidade da oxigenação (Yonetani et al., 1974, Miller e Chance, 1995). Dentre estas, as cobalto-substituídas parecem ser as únicas realmente funcionais. (Hsu et al., 1972, Yanamoto et al., 1974, Miller e Chance, 1995). Embora estas apresentem semelhante cooperatividade, efeito de Bohr e influência de fosfatos orgânicos, a afinidade pelo O_2 é de 10 a 25 vezes menor que em ferro-hemoglobinas e mioglobinas (FeMb e FeHb).

Enquanto a constante de associação do O_2 , é da mesma ordem de magnitude para CoMb e FeMb, a constante de dissociação é 100 vezes maior na CoMb que na correspondente FeMb, justificando a menor afinidade observada quando ferro é substituído por cobalto (Yanamoto et al., 1974). Miller e Chance (1995) constataram, por espectroscopia, que, embora Co e Fe tenham aproximadamente a mesma capacidade doadora de elétrons para o O_2 , a distribuição eletrônica em torno do grupamento Metal-O-O não é a mesma nos dois casos. Esta diferença pode causar um enfraquecimento da ligação Co-O relativamente à Fe-O, possivelmente em consequência de uma ponte de hidrogênio mais fraca entre a histidina distal e o O_2 ligado na mioglobina.

Como discutido anteriormente, a ligação de hidrogênio entre histidina distal e O_2 desempenha importante papel na estabilização de hemoglobinas e mioglobinas contra sua autooxidação. Desta forma, espera-se que as espécies com cobalto, onde esta ligação é mais fraca, sejam menos resistentes à autooxidação. No entanto, CoHb e CoMb apresentam uma taxa de oxidação inferior às correspondentes proteínas contendo ferro (Yonetani et al., 1974). A estabilidade dessas proteínas cobalto-substituídas carece, portanto, de maiores investigações.

3.4.4 Efeito da Adição de Agentes Redutores

Metaemoglobina pode ser reduzida por uma variedade de sistemas enzimáticos (Hayashi et al., 1973, Takeoka et al., 1997), químicos (Brantley et al., 1993), fotoquímicos (Brantley et al., 1993, Everse, 1994) ou eletroquímicos (McGown et al., 1994).

Vestling (1942) tratou soluções de metaemoglobina com ácido ascórbico (AA) na proporção de 1 mol AA/mol hemo. Observou-se que o AA reduziu 80 a 90% da metaemoglobina presente a 0° C. Entre 25 °C e 30 °C, houve uma redução de até 80%, sendo que na presença na presença de azul de metileno, a redução foi maior que 90%. No entanto, a presença de AA provoca uma diminuição na capacidade de transporte de oxigênio. McGown et al. (1990) verificaram que ácido ascórbico em concentrações fisiológicas (0,1 mM) e eritrócitos intactos agem sinergeticamente na redução da metaemoblogina extracelular.

Metaemoglobina pode ser reduzida quimicamente também pela adição de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Brantley et al. conduziram a redução da metamioglobina pela adição de pequenas quantidades de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ seguida da retirada do excesso de reagente e dos subprodutos desta reação por filtração em coluna de troca iônica. Após esse procedimento, a taxa de autoxidação foi a mesma observada para a mioglobina nativa (Brantley et al., 1993). Outros redutores químicos utilizados são: ácido 5-hidroxiantranílico, sais de ferro e complexos com EDTA (Everse, 1994).

Em geral, os subprodutos da reação de redução podem causar efeitos indesejáveis sobre a proteína. A redução com EDTA e ditionito resultam na formação de formaldeído e SO_2^{3-} , respectivamente, que podem levar a desnaturação da proteína. A redução com ácido ascórbico ou cisteína, por outro lado, atinge o equilíbrio quando elevadas concentrações de metaemoglobina ainda estão presentes. Além disto, na presença de oxigênio, o mesmo pode ser preferencialmente reduzido com formação de H_2O_2 , que, por sua vez, contribui para aumentar a taxa de autoxidação.

3.5 CONCLUSÕES

A estabilidade de hemoglobinas e mioglobinas em soluções *ex-vivo* é fator limitante ao uso das mesmas como transportadores de oxigênio. A forte tendência à autoxidação é uma característica indesejável tanto na área clínica quanto em outras potenciais aplicações desses biotransportadores.

Quanto à forma pela qual se processa a reação de autoxidação, conclui-se que o mecanismo oxidativo, envolvendo a espécie desoxi, explica melhor a dependência da taxa de oxidação em relação à concentração de O₂. O mecanismo de deslocamento redutivo, por outro lado, explica mais satisfatoriamente o efeito do pH. Deste modo, novas investigações devem ser feitas a fim de esclarecer os detalhes da cinética de autoxidação destas proteínas. Uma completa compreensão dos mecanismos envolvidos é importante na arquitetura de moléculas mais estáveis.

Através da análise dos mecanismos de autoxidação, foi possível identificar o papel fundamental da histidina distal e outros resíduos localizados nas proximidades do grupo hemo sobre a estabilidade de mioglobinas e hemoglobinas. A tecnologia do DNA recombinante tem sido amplamente empregada para obtenção de cepas mutantes, resultando em melhorias significativas na afinidade pelo oxigênio e na tendência à oxidação dessas proteínas.

É interessante notar que, genericamente falando, uma taxa de autoxidação reduzida implica uma menor tendência de dissociação do O₂ ligado, que, por sua vez, resulta em um aumento da afinidade. Neste trabalho, buscou-se construir mioglobinas mutantes visando aumentar sua estabilidade contra a oxidação. Como consequência, a afinidade pelo O₂ também deve ser alterada. Uma afinidade reduzida pode prejudicar a eficiência de transporte do oxigênio, de forma que deve haver um compromisso entre a estabilidade desejada e a afinidade resultante. Essas relações serão melhor analisadas no próximo capítulo, que discute os resultados experimentais obtidos.

CONTEÚDO – CAPÍTULO 4

4.1 Metodologia Experimental.....	72
4.1.1 Mioglobinas Mutantes.....	72
4.1.2 Produção de Proteínas Recombinantes.....	74
4.1.3 Produção de Cobalto-Proteínas.....	75
4.1.4 Afinidade pelo Oxigênio.....	75
4.1.5 Taxa de Autoxidação.....	76
4.2 Resultados.....	77
4.2.1 Mioglobinas Mutantes.....	77
4.2.2 Produção de Proteínas Recombinantes.....	78
4.2.3 Produção de Cobalto-Proteínas.....	78
4.2.4 Afinidade pelo Oxigênio.....	81
4.2.5 Taxa de Autoxidação.....	84
4.2.5.1 FeMbs.....	84
4.2.5.2 CoMbs.....	88
4.3 Conclusões.....	94
ANEXO 1 – Aminoácidos.....	96
ANEXO 2 – Metodologias Detalhadas.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

P ARTE EXPERIMENTAL - I

Neste capítulo, são apresentados os resultados relativos ao preparo e caracterização da mioglobina. Primeiramente, descreve-se a metodologia experimental empregada no preparo das proteínas recombinantes, a qual envolve as etapas de obtenção dos plasmídeos mutantes, transformação e expressão em Escherichia coli, cultivo das células recombinantes e extração/purificação da mioglobina. Descrevem-se, também, as técnicas empregadas na produção das proteínas cobalto-substituídas. Em seguida, são detalhados os métodos de caracterização da mioglobina resultante, com relação à sua taxa de oxidação e à afinidade por oxigênio. Por fim, os resultados mais relevantes obtidos nesta etapa são apresentados e discutidos.

Conforme introduzido no Capítulo 1, grande parte do trabalho experimental apresentado neste capítulo foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Rice University, sob a orientação do prof. J. S. Olson. Nesta etapa, objetivou-se a obtenção de moléculas mais estáveis, com reduzida tendência à oxidação. Sabe-se que, ao interferir na taxa de oxidação, modifica-se também a afinidade da mioglobina pelo oxigênio, de forma que esta propriedade foi também avaliada. As estratégias investigadas foram a construção de mioglobinas mutantes e a substituição do ferro, presentes nessas proteínas, por cobalto.

A escolha das mutações foi baseada na experiência prévia do grupo, que construiu um banco de dados com as propriedades de mais de 500 mutantes, entre mioglobinas e hemoglobinas. A maioria das mutantes selecionadas já havia sido construída no laboratório e, em alguns casos, caracterizadas quanto à oxidação e/ou afinidade pelo O₂.

Contudo, os testes de oxidação e afinidade foram refeitos visando não só o aprendizado das técnicas como também verificar a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, as condições dos experimentos foram, em alguns casos, diferentes daquelas anteriormente empregadas. Após o preparado das mioglobinas mutantes, o ferro foi substituído por cobalto, e as proteínas assim obtidas foram caracterizadas, como será descrito a seguir.

4.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1.1 Mioglobinas Mutantes

Todas as mioglobinas mutantes foram preparadas a partir do gene sintético da mioglobina de baleia, por ser naturalmente uma proteína mais estável à desnaturação (Scott et al., 2000). A Figura 4.1 mostra a seqüência de oligonucleotídeos e de aminoácidos deste gene. São mostradas, também, as regiões de ação das endonucleases de restrição.

A proteína expressa por este gene sintético difere da proteína nativa pela presença do aminoácido asparagina na posição 122 em lugar do ácido aspartico, o que facilita sua cristalização. Além disso, devido a diferenças no processamento do código genético entre procariontes e eucariontes, o iniciador metionina está presente na mioglobina sintética, enquanto que não é mantido na mioglobina nativa. Apesar disso, a proteína sintética e a nativa são funcionalmente idênticas (Smith, 1999).

Inicialmente, foi testado um sistema de expressão que empregava o vetor pET em células BL21 de *E.coli* (Stratagene) (Smith, 1999). Embora este sistema permita a produção da holoproteína após indução com isopropil- β -D-galactosídeo (IPTG), nos experimentos realizados obteve-se um baixo rendimento em proteína solúvel, sendo esta encontrada principalmente em corpos de inclusão, de difícil extração.

Dessa forma, passou-se a utilizar como vetor o plasmídeo pEMBL19. Mutações entre as posições 58 e 69 da proteína eram obtidas por cassete-mutagêneses segundo Egbert et al. (1990). Neste procedimento, o oligonucleotídeo contendo a mutação desejada era inserido no vetor após digestão do mesmo com as enzimas endonucleases de restrição Bgl II e Hpa I, conforme procedimento descrito no Anexo 2, item A.1.

Mutações em outras posições foram obtidas por mutagêneses direta do oligonucleotídeo pelo método de Kunkel (1985), realizadas em trabalhos anteriores do Laboratório

(Carver et al., 1992, Hargrove e Olson, 1996). Em ambos os casos, os plasmídeos mutantes eram transformados em células DH5α de *E. coli*. O DNA plasmidial contendo a mutação desejada era, então, extraído e purificado, conforme apresentando no Anexo 2, item A.2.

A avaliação da eficiência da mutação era feita através de eletroforese e do sequenciamento do DNA produzido, este último realizado pela empresa The Great American Gene Company (Ransom Hill Bioscience, Inc.).

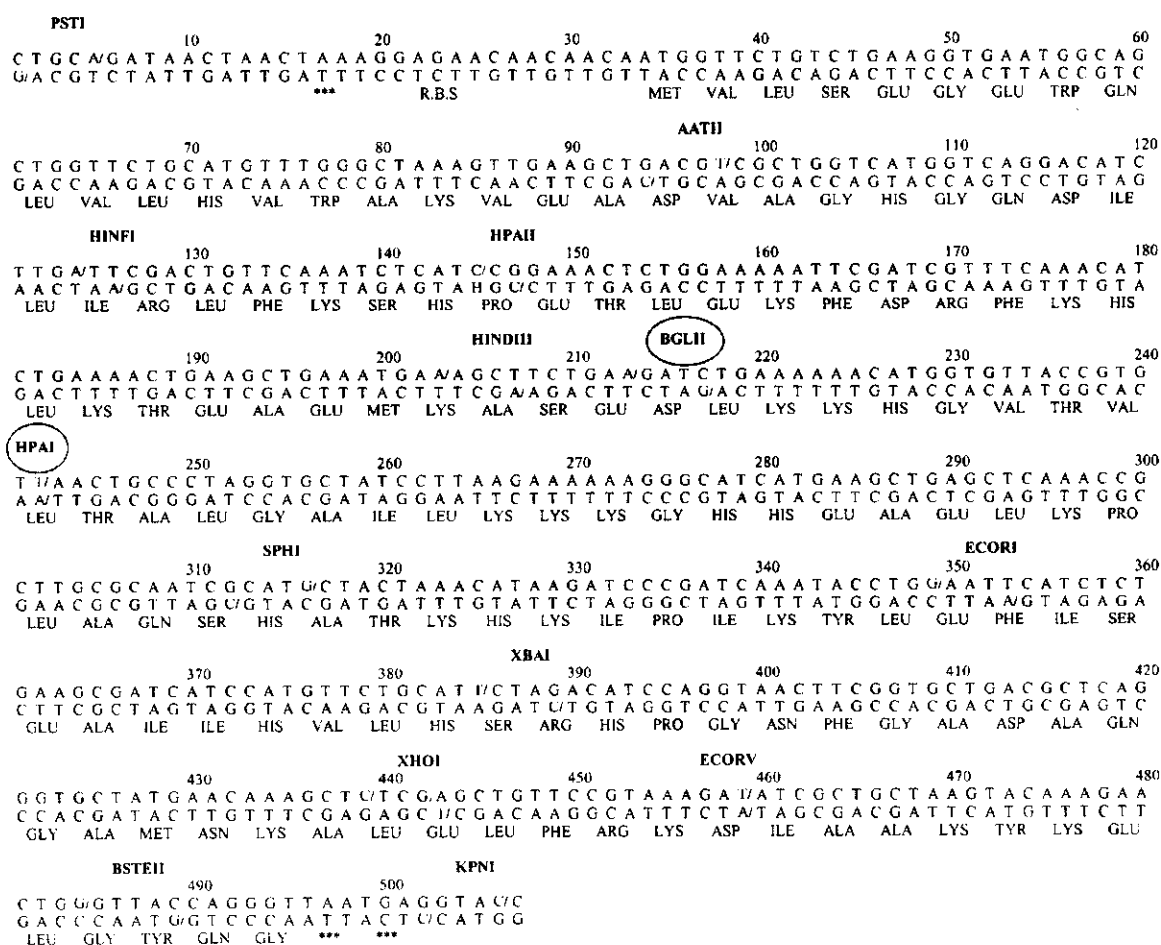


Figura 4.1: Mapa do gene sintético da mioglobina. Em destaque, os sítios de ação das enzimas de restrição Bgl II e Hpa I (Springer e Sligar, 1987).

Cabe ressaltar que a produção dessas mutantes é atividade de rotina no laboratório de Bioquímica e Biologia Celular onde foi realizada parte deste doutorado. As mutações realizadas durante este trabalho foram: 64L88A, 68F88A, 64A68A88A, 64Y68F88A, 64Q107F, 64Q107W. As demais mutações utilizadas foram obtidas de estoques produzidos em trabalhos anteriores do grupo.

4.1.2 Produção das Proteínas Recombinantes

Os plasmídeos mutantes produzidos na etapa anteriormente descrita eram expressos constitutivamente em células de *E. coli* cepa TB1 (Springer e Sligar, 1987). Esse tipo de expressão funciona bem para mioglobina de baleia por que esta possui uma apoproteína bastante estável. A bactéria sintetiza o hemo e o incorpora à globina, originando a holoproteína solúvel encontrada no citoplasma celular (Smith, 1999).

A transformação segue os mesmos passos descritos no Anexo 2 para as células DH5 α e consiste na introdução do DNA plasmidial na célula hospedeira. Após a transformação, um pré-inóculo era preparado transferindo-se uma colônia da placa transformada para 10 mL do meio de cultivo LB (Luria Broth) líquido, preparado com 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl, acrescentando-se 100 mg/L de ampicilina. A presença do antibiótico garante que apenas as células de *E. coli* contendo o plasmídeo mutante, que também é dotado do gene para resistência à ampicilina, possa crescer no meio.

Após 8 h de incubação a 37 °C, a propagação era feita inoculando-se o tubo de 10 mL em 250 mL de meio. Após incubação por 4 horas, este inóculo era, então, transferido para um fermentador (B.Braun Biotech. Inc.) contendo 100 L do meio mais antibiótico.

A temperatura do fermentador era mantida constante em 37 °C, a taxa de aeração era de 1 vvm e o pH não era controlado, mas permanecia sempre em torno de 7. As células eram colhidas em aproximadamente 12h, no fim da fase estacionária de crescimento, utilizando uma centrífuga tubular contínua (Sharples AS-16, Pennwal), e estocadas a -70 °C até posterior uso.

O esquema de purificação era conduzido segundo descrito por Springer e Sligar (Carver et al., 1992), sendo todos os passos realizados a 4 °C. O mesmo consistia no rompimento das células e separação da proteína solúvel utilizando precipitação fracionada com sulfato de amônio, com cortes de 50% e 95%, seguido por tratamento em coluna de troca catiônica (coluna de carboximetilcelulose - CM-52, Whatman) e aniônica (coluna de dietilaminoetil - DEAE, Whatman). A proteína purificada assim obtida era, então, concentrada por ultrafiltração (concentradores Centriprep[®]YM-10 e Centricon[®], Millipore) Uma descrição mais detalhada deste procedimento pode ser encontrada no Anexo 2, item A.3.

A avaliação da pureza era feita pela razão entre a absorção na região de Soret (409 nm para a metMb e 418 nm para a oxiMb) e aquela em 280 nm. Proteínas exibindo uma razão entre 3 e 4 eram consideradas com grau de pureza de aproximadamente 99% (Brantley et al., 1993).

4.1.3 Produção de Cobalto-Proteínas

Existem dois métodos principais para isolar globinas a partir da holoproteína, ambos baseados na diminuição da afinidade do heme pela globina em pH ácido. O primeiro utiliza ácido-acetona a baixas temperaturas para precipitar a globina. O segundo método emprega o solvente meti-etil-cetona (MEC) para extrair o hemo, e foi utilizado para produzir as apomioglobinas (Ascoli et al., 1981). A qualidade da globina obtida foi avaliada pela análise do seu espectro de absorção e pela titulação com hemin (Cloreto de Fe(III)-protoporfirina IX, Sigma).

Uma vez extraído o hemo, CoMbs eram preparadas pelo método de Ikeda-Saito et al. (1991). Cloreto de Co(III)-protoporfirina IX (Porphyrin Products) era dissolvido em piridina e adicionado à solução da apomioglobina. A mistura era, então, passada através de uma coluna Sephadex G-25, em condições anaeróbicas. O procedimento detalhado encontra-se no Anexo 2, item A.4.

4.1.4 Afinidade pelo Oxigênio

Como apresentado no Capítulo 2, a oxigenação da mioglobina pode ser descrita pelo seguinte equilíbrio:



Também conforme já demonstrado, a constante de equilíbrio K pode ser relacionada à uma grandeza denominada P_{50} ($P_{50} = 1/K$), que é a pressão de O_2 na qual metade das moléculas encontra-se na forma oxigenada. A afinidade de cada proteína por O_2 foi avaliada a partir deste parâmetro.

Os experimentos foram conduzidos em equipamento descrito por Imai (1981). Trata-se de um espectrofotômetro adaptado, no qual é colocada uma cubeta contendo um

eletrodo de oxigênio. A solução era mantida sob agitação e com temperatura controlada por um banho de refrigeração. As curvas de oxigenação e desoxigenação eram obtidas equilibrando-se a solução com ar e nitrogênio, respectivamente. No caso de mutantes com baixa afinidade, utilizava-se O₂ puro em vez de ar. Registrava-se, então, a variação na fração de oximioglobina (pelas mudanças no seu espectro de absorção) com a pressão parcial do gás em equilíbrio com a solução.

4.1.5 Taxa de Autoxidação

A estabilidade química das mioglobinas pode ser avaliada pela sua resistência à autoxidação. O íon ferro passa do estado Fe(II), na oxi e desoximioglobina para o estado Fe(III) na metMb. Essa transição é facilmente acompanhada através de mudanças no espectro de absorção da proteína.

A evolução da concentração de metMb era acompanhada pelo aumento da absorção em 409 nm, correspondente ao pico de absorção da forma meta na região de Soret. A curva obtida era ajustada segundo um modelo exponencial, admitindo-se que a oxidação obedece ao modelo:

$$\frac{d[\text{oxiMb}]}{dt} = -k_{\text{ox}}[\text{oxiMb}] \quad (4.1)$$

onde k_{ox} é a constante de autoxidação aparente e $[\text{oxiMb}]$ é a concentração de mioglobina presente. Os ensaios de autoxidação eram realizados em um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-2401PC, com controle de temperatura.

Nas proteínas cobalto-substituídas, o íon cobalto passa também de Co(II) para Co(III), mas quantificar esta mudança e definir uma taxa de oxidação torna-se mais difícil porque os espectros de absorção da proteína nas formas oxidada e reduzida são praticamente coincidentes.

Desenvolveu-se, então, uma metodologia para determinação da concentração de metCoMb em solução utilizando cianeto de potássio (KCN), detalhado no Anexo 2, item A.5. A técnica se baseia no fato de que a metamioglobina reage com o cianeto formando o complexo cianometmioglobina (MiCN) enquanto que a oximioglobina não é afetada por este.

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Mioglobinas Mutantes

Nos oligos inseridos, a seqüência final de nucleotídeos no sítio da enzima de restrição Hpa I era modificada de TTA para CTA. O aminoácido expresso nessa posição continua sendo Leucina, mas, mudando-se a seqüência do oligo, a enzima de restrição não mais a reconhece e não pode cortar a fita do DNA. Este procedimento é útil pois permite uma avaliação da eficiência da mutação.

Assim, se a digestão enzimática do vetor para receber o oligo contendo a modificação for incompleta, pode haver uma recombinação dos pedaços cortados pela enzima de restrição e o resultado é um DNA idêntico ao original, sem a mutação desejada.

Ao ser analisado por eletroforese, o DNA produzido pode ser comparado a um padrão não cortado. A Figura 4.2 mostra o aspecto típico de um gel ao final da análise. Nesta figura, a linha 1 corresponde ao padrão de DNA, não digerido, enquanto as linhas 2 a 7 correspondem à amostra do DNA manipulado, tratado com a enzima Hpa I. Como pode ser observado, as linhas 5, 6 e 7 apresentaram um padrão semelhante ao do DNA sem corte, indicando que, nestas amostras, a substituição dos oligos foi feita com sucesso. As linhas 2, 3 e 4 tratavam-se, possivelmente, do DNA original, sem mutação. A confirmação era feita enviando-se as amostras para sequenciamento. Neste exemplo apresentando, as amostras 5 a 7 eram, de fato, a mutante desejada, a mioglobina 68F88A.

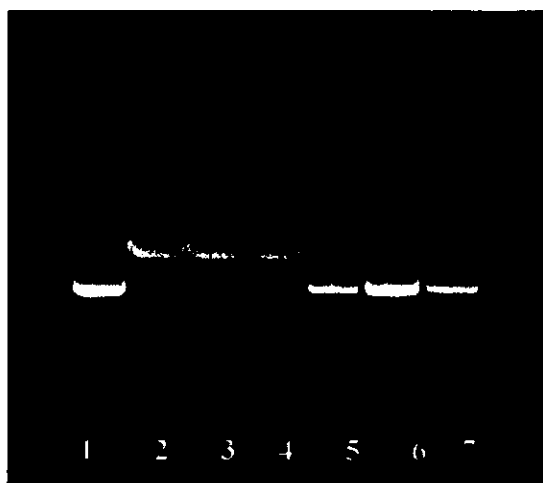


Figura 4.2: Fotografia do gel de agarose ao final da eletroforese. As linhas 2 a 7 correspondem à amostra do DNA produzido, tratado com a enzima Hpa I; a linha 1 é o padrão de DNA não digerido com a enzima.

4.2.2 Produção das Proteínas Recombinantes

A Figura 4.3 mostra curvas de crescimento tipicamente obtidas, neste caso, para duas das mutantes produzidas, 29F e 29F68F. Neste experimento, as células foram cultivadas em erlenmeyer de 1L contendo 250 mL de meio LB, com temperatura constante de 37 °C, sob agitação de 200 rpm. Como pode ser observado, o final da fase exponencial de crescimento se dá em torno 8 h. A velocidade específica de crescimento, determinada na fase exponencial, foi de aproximadamente $0,8 \text{ h}^{-1}$ em ambos os casos.

No fermentador de 100 L, as células eram colhidas com aproximadamente 12 h de cultivo. O rendimento médio obtido no fermentador de 100 L era de 4 g de células/L de meio, contendo a holoproteína solúvel. Após as etapas de extração e purificação, obtinha-se 1 mL de uma solução 6 mM de mioglobina em tampão fosfato, que corresponde a aproximadamente 100 mg da proteína.

A mioglobina produzida era estocada em nitrogênio líquido até posterior uso.

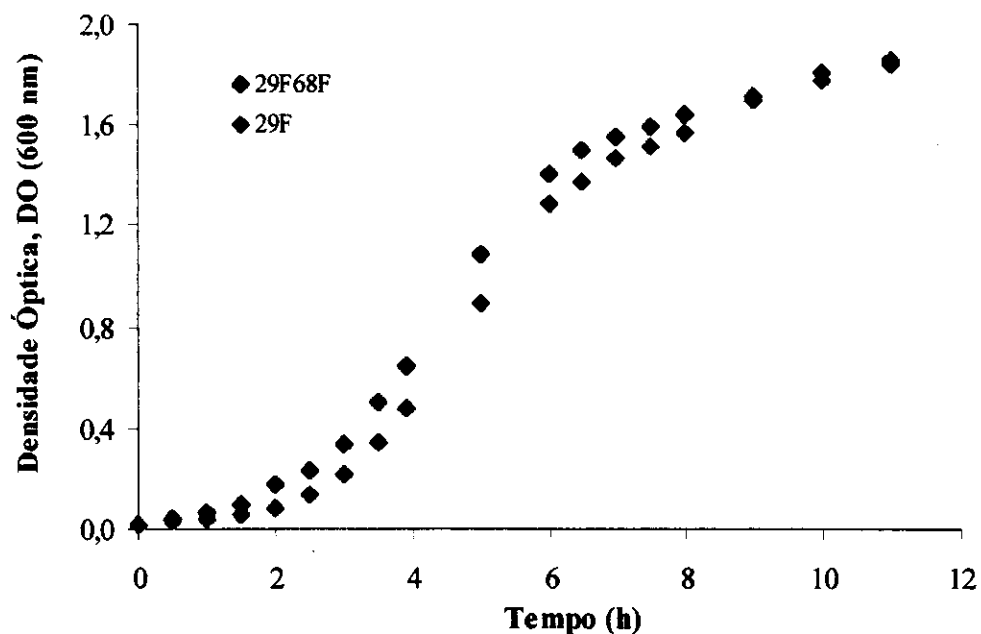


Figura 4.3: Curva de crescimento das mutantes 29F e 29F68F cultivadas em erlenmeyer a 37 °C, meio LB.

4.2.3 Produção de Cobalto-Proteínas

A qualidade das apoproteínas obtidas era avaliada por espectrofotometria. A Figura 4.4 mostra o espectro de absorção para uma apoproteína preparada a partir de mioglobina

do músculo cardíaco eqüino. A relação entre a absorção em 410 nm (A2) e aquela em 290 nm (A1) é um indicativo da eficiência de extração do hemo. Uma razão A2/A1 igual a 0,1 corresponde à, aproximadamente, 1 % de hemo residual (Ascoli et al., 1981). No exemplo mostrado, a razão foi 0,11.

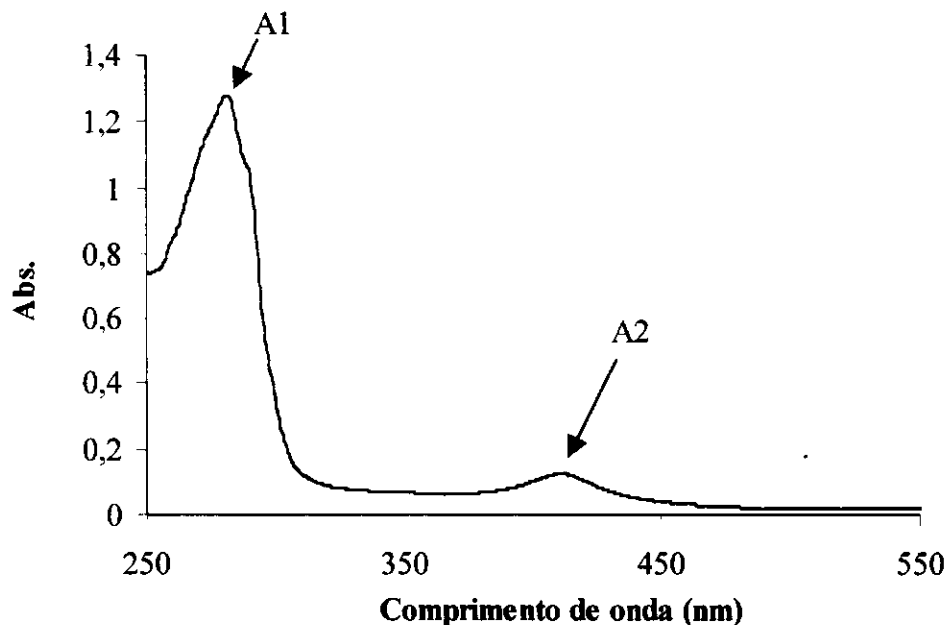


Figura 4.4: Espectro de absorção de uma apomioglobina eqüina preparada por extração do hemo com metil-etil-cetona. A1 é a absorção no comprimento de onda de 410 nm e A2, em 290 nm.

A Figura 4.5 mostra como varia o espectro de absorção da mioglobina com a adição de hemin. O aumento na densidade óptica da amostra é proporcional à quantidade de proteína reconstituída, uma vez que globinas desnaturadas não reincorporam o hemo.

Neste experimento, alíquotas de 5 μL eram sucessivamente adicionadas à solução da apomioglobina, sendo possível observar que, neste caso a saturação foi atingida com adição de 30 μL de uma solução de hemin 0,2 mg/mL. Posteriores adições não promovem um aumento proporcional no valor da absorção em torno de 410 nm (pico de absorção da metamioglobina). A partir deste valor e sabendo-se que a proporção heme/apoproteína é igual a 1, estima-se a quantidade de proteína presente na solução.

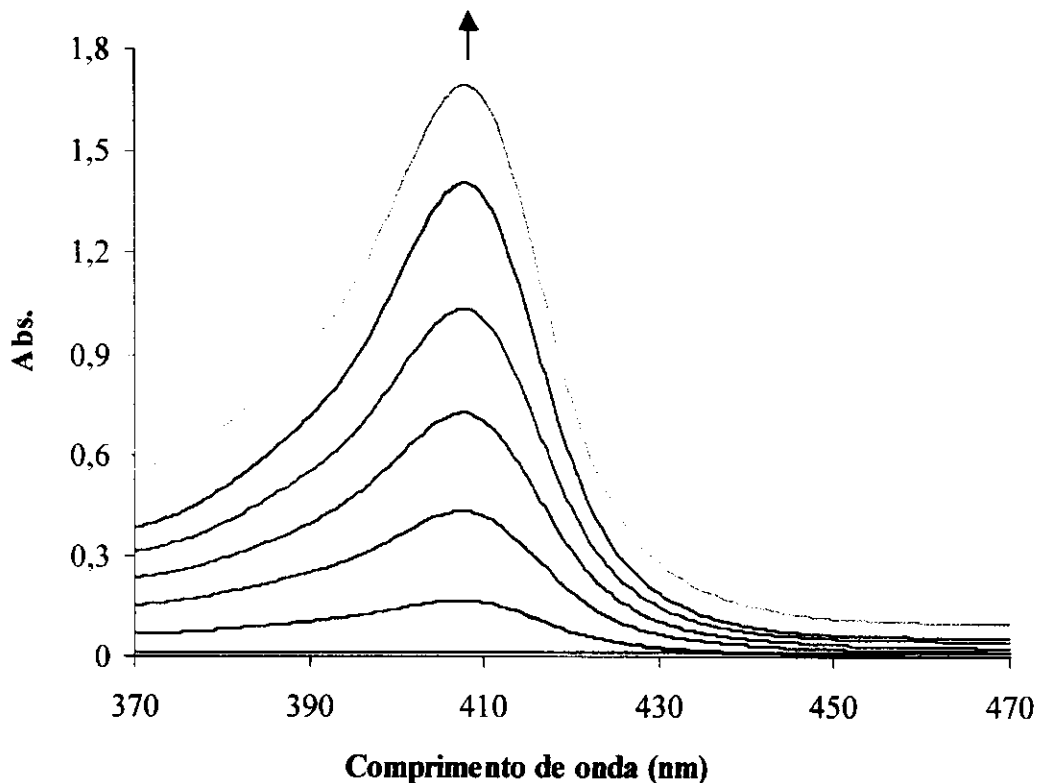


Figura 4.5: Curvas de titulação para mioglobina de baleia (Sigma). Cada curva corresponde ao espectro de absorção da solução, obtido após a adição de 5 μL da solução de hemin.

Após a titulação com hemin e o cálculo da quantidade de apomioglobina na solução, procedia-se à reconstituição da proteína com cobalto. Neste trabalho foram preparadas CoMbs a partir de mioglobinas com mutações simples, duplas e triplas. As CoMbs preparadas foram:

<i>Simples:</i>	<i>Duplas:</i>	<i>Triplas:</i>
✓ WT	✓ 67Y68F	✓ 29F64Q68F
✓ 29F	✓ 29F64Q	✓ 29F64Q68L
✓ 67R	✓ 64Q68L	
✓ 68F	✓ 64Q68F	
✓ 88A	✓ 29F68L	
	✓ 29F68F	

Como mencionado no Capítulo 2, adotou-se nesse trabalho uma nomenclatura pela qual a posição dos aminoácidos nas cadeias é representada por uma letra, relacionada à hélice na qual ele se encontra, seguida por um número, que representa sua posição na hélice. Assim, por exemplo, a mutante 29F apresenta o aminoácido Fenilalanina na posição 29 (em lugar da Leucina originalmente presente). A mutante 29F68F contém

duas mutações, nas posições 29 e 68, com a presença de Fenilalanina em lugar de Leucina e Valina, respectivamente. E assim sucessivamente, com as demais mutantes. WT corresponde à proteína selvagem (wild type), expressa em *E. coli* mas sem portar mutações.

As mioglobinas mutantes produzidas foram caracterizadas quanto à afinidade pelo oxigênio e quanto à estabilidade contra a oxidação, como discutido a seguir.

4.2.4 Afinidade pelo Oxigênio

A Figura 4.6 mostra a variação na fração de moléculas oxigenadas (Y) em função da pressão parcial de oxigênio (pO_2) para as várias mioglobinas mutantes produzidas e contendo cobalto em lugar de ferro (CoMbs). Na Tabela 4.1 encontram-se os valores de P_{50} calculados a partir das curvas da Figura 4.6.

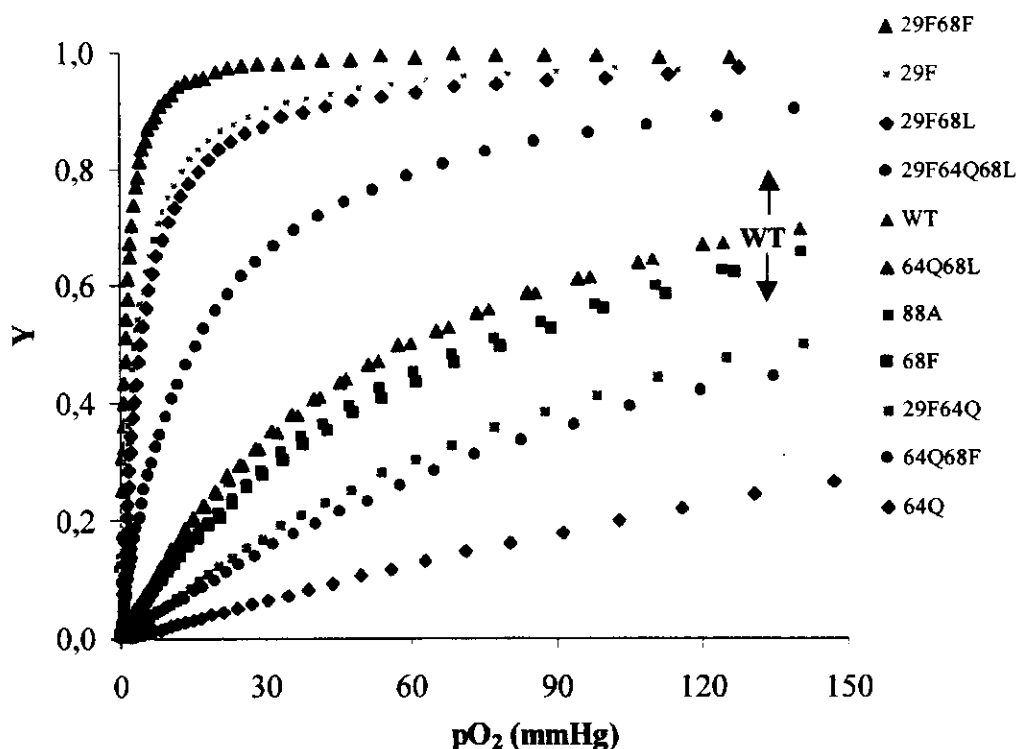


Figura 4.6: Fração de oxiCoMb como função da pressão parcial de oxigênio, a 25 °C.

Como pode ser observado, as mutações introduzidas na mioglobina provocaram mudanças significativas na afinidade pelo oxigênio. P_{50} variou de 1,6 μM , na mutante de maior afinidade entre as investigadas (29F68F), até 677 μM , na mutante com menor

afinidade (64Q). Esta variação representa uma diferença de aproximadamente 400 vezes na afinidade pelo O₂. Como comparação, a mioglobina selvagem (WT) apresentou P₅₀ intermediária, igual a 100 µM.

Tabela 4.1: Valor de P₅₀ para as CoMbs recombinantes a 25 °C.

Mutante	P₅₀ (µM)
64Q	677,4
64Q68F	277,5
29F64Q	230,6
68F	130,2
88A	120,0
WT	100,0
64Q68L	97,9
29F64Q68L	26,0
29F68L	7,0
29F	5,4
29F68F	1,6

Uma análise sobre a influência da substituição desses aminoácidos na afinidade pelo oxigênio será feita posteriormente, juntamente com o efeito da mesma na taxa de autoxidação das mioglobinas, visto que ambos os fatores estão intimamente correlacionados.

A Figura 4.7 apresenta uma comparação entre o valor de P₅₀ para CoMbs e FeMbs. Como pode ser observado, P₅₀ é cerca de 100 vezes menor para as CoMbs comparativamente às FeMbs. De fato, enquanto a constante de associação do oxigênio é da mesma ordem de grandeza para CoMbs e FeMbs, a constante de dissociação do oxigênio no caso da CoMb nativa é até 100 vezes menor (Yamamoto et al., 1974, Miller e Chance, 1995).

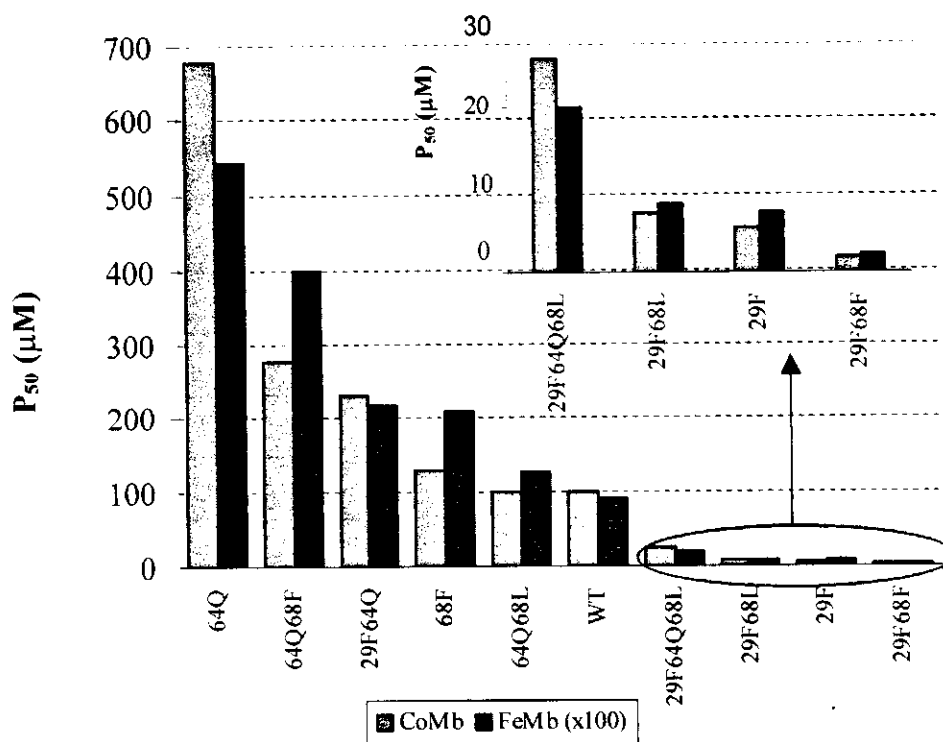


Figura 4.7: Comparação entre a afinidade de CoMbs e FeMbs a 25 °C. No detalhe, ampliação da região de menor valor de P₅₀. Dados para as FeMbs obtidos por Brantley et al. (1993) e Scott et al. (2000).

Nestes experimentos, foi também avaliada a influência da temperatura no valor de P₅₀. Como esperado, a diminuição da temperatura acarreta um aumento na afinidade pelo O₂, como pode ser visto na Figura 4.8. A extensão da influência, contudo, é diferenciada para cada uma das proteínas analisadas.

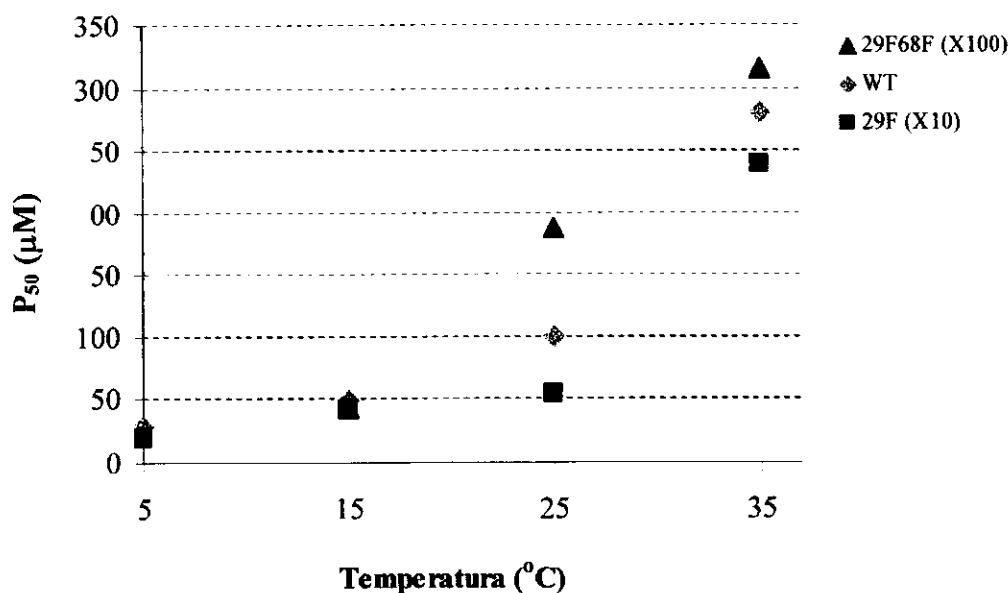


Figura 4.8: Efeito da temperatura na afinidade de CoMbs por O₂.

4.2.5 Taxa de Autoxidação

4.2.5.1 FeMbs

Soluções de oximioglobina apresentam duas bandas de absorção na região do Visível, uma mais intensa em aproximadamente 543 nm, e outra mais difusa em torno de 581 nm (coeficiente de extinção $\epsilon = 13,3 \text{ mM}^{-1}$). A forma reduzida (desoxiMb) apresenta uma única banda que se estende em 556 nm ($\epsilon = 11,8 \text{ mM}^{-1}$). A metamioglobina (metMb) apresenta uma banda em 630 nm e outras duas bem menos intensas na mesma faixa que a oximMb (Rius e Valenti, 1972). Na região de Soret, a oximMb absorve em 418 nm, a desoximMb, em 434 nm, e a metMb, em 409 nm ($\epsilon = 160 \text{ mM}^{-1}$). O espectro de absorção das diferentes formas da FeMb pode ser visto na Figura 4.9.

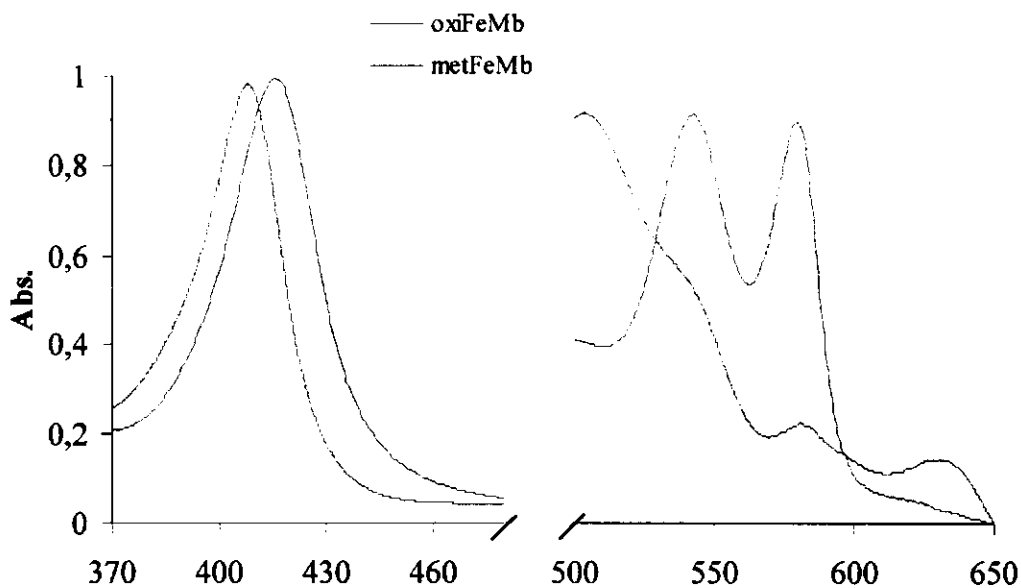


Figura 4.9: Espectro de absorção obtido para a mioglobina eqüina em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.

Como mencionado anteriormente, as transformações sofridas durante a oxidação da proteína podem ser acompanhadas por modificação no seu espectro de absorção quando em solução, na região de 400 nm a 650 nm. Durante a oxidação, os picos de absorção em 453 nm e 581 nm da oximMb vão desaparecendo e dando lugar ao pico em 630 nm. Por outro lado, o pico em 418 nm vai sendo deslocado para 409 nm, típico da metMb. Tais transformações podem ser vistas na Figura 4.10.

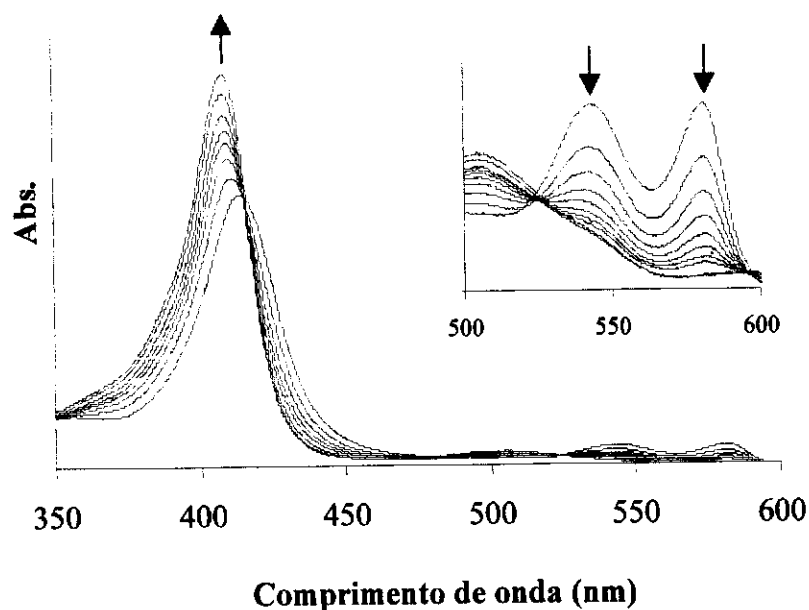


Figura 4.10: Mudança no espectro de absorção da mioglobina de baleia sofrendo oxidação. Proteína em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.

Cabe ressaltar que, após a caracterização da afinidade pelo oxigênio, fez-se uma seleção das mioglobinas mutantes, descartando as que possuíam uma afinidade muito inferior a da mioglobina selvagem, ou aquelas que não foram obtidas em quantidade suficiente para todos os testes e não estavam disponíveis em estoque. A Figura 4.11 mostra a evolução na fração de metMb com o tempo, para as diferentes mutantes selecionadas. Na Tabela 4.2 são encontrados os valores obtidos para a taxa de autooxidação dessas proteínas, após ajuste das curvas pelo modelo exponencial anteriormente apresentado (equação 4.1).

Verifica-se que as mutações produziram um efeito muito maior sobre a afinidade pelo O_2 que na taxa de oxidação. Comparativamente, houve uma variação na taxa de oxidação de até 10 vezes entre as FeMbs investigadas, enquanto que a variação observada no valor de P_{50} para as correspondentes CoMbs mutantes foi em torno de 80 vezes.

Outra observação que merece destaque é o fato de que a estabilização promovida pela mutante 29F a 37 °C, observada neste trabalho, foi inferior àquela relatada a 25 °C em trabalhos anteriores do grupo (Brantley et al., 1993). Tal discrepância pode ser uma consequência da temperatura mais elevada empregada neste trabalho para caracterizar a taxa de oxidação, visto que algumas mutantes podem ser menos resistentes à

desnaturação que pode ocorrer nessas condições. Além disso, no trabalho mencionado (Brantley et al., 1993), os testes de estabilidade foram conduzidos na presença de catalase e superóxido-dismutase, enzimas que podem contribuir para reduzir a taxa de autoxidação.

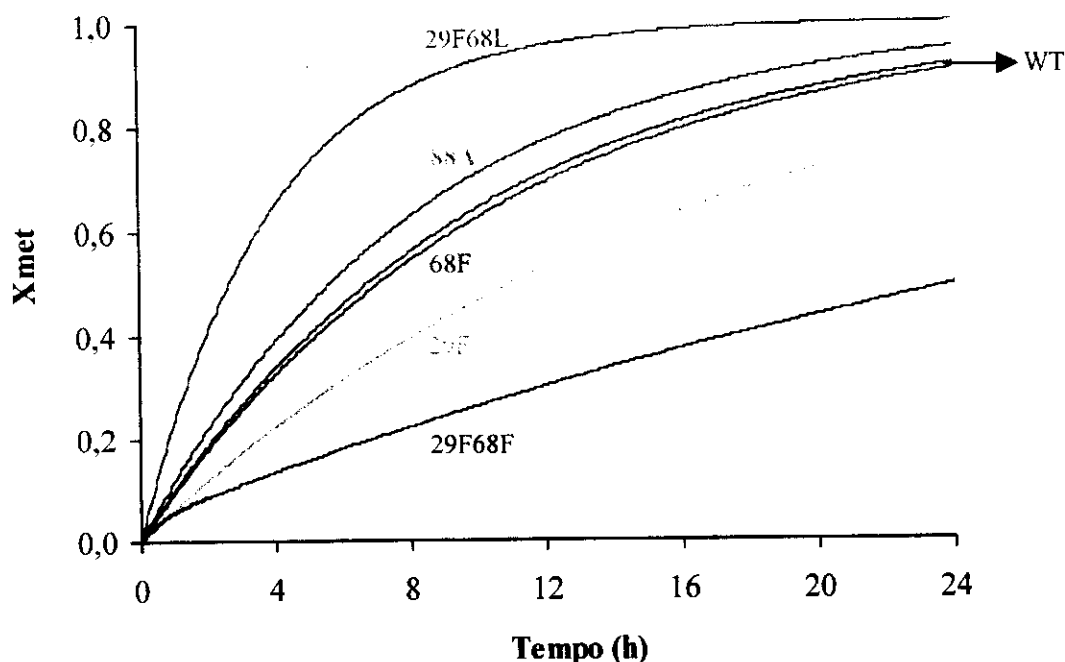


Figura 4.11: Oxidação de FeMb. Experimentos conduzidos em tampão fosfato 100 mM/ EDTA 1mM, pH 7,0 a 37°C, concentração inicial de proteína = 5 mM.

Tabela 4.2: Taxa de autoxidação de FeMbs a 37 °C.

<i>Mutante</i>	<i>k_{ox} (h⁻¹)</i>
29F68L	0,261
88A	0,123
WT	0,10
68F	0,098
29F	0,065
29F68F	0,028

A Figura 4.12 mostra a influência da temperatura na estabilidade das mioglobinas recombinantes. Como esperado, o aumento da mesma acarreta um aumento na taxa de autoxidação da proteína. Com isso, pode haver uma desnaturação irreversível

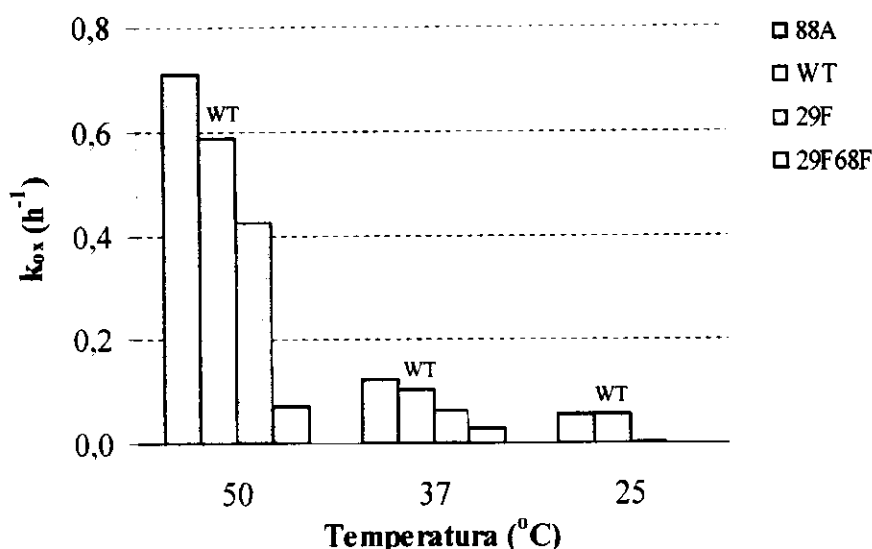


Figura 4.12: Oxidação de FeMb em função da temperatura. Experimentos conduzidos em tampão fosfato 100 mM/EDTA 1mM, pH 7,0. Concentração inicial de proteína = 5 mM. Dados a 25 $^{\circ}C$ para a mutante 29 F obtidos de trabalhos anteriores do grupo (Brantley et al., 1993).

Para entender o efeito das mutações nas propriedades da mioglobina, deve-se ter em mente que, em geral, os fatores que levam a uma redução na afinidade pelo oxigênio provocam, também, um aumento na taxa de oxidação das mioglobinas. Isto porque as reações envolvidas na oxidação envolvem a liberação do oxigênio como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), conseqüência de uma fraca ligação do mesmo com a proteína (Brantley et al., 1993).

A oxigenação da mioglobina envolve os seguintes passos: dissociação da molécula de água covalentemente ligada à Histidina; entrada do O_2 na cavidade distal; e ligação covalente do O_2 com o metal. Assim, os principais fatores que afetam a afinidade pelo oxigênio e, conseqüentemente, a estabilidade da mioglobina são polaridade, efeitos eletrostáticos e impedimentos espaciais na região de ligação do oxigênio.

A Histidina distal (His64) desempenha papel chave na estabilização do complexo Metal-O-O formando uma ligação de hidrogênio com o O_2 . Portanto, sua substituição irá afetar tanto a afinidade quanto a resistência à autooxidação. Como observado com a mutante 64Q, a presença da Glutamina aumentou P50 em seis vezes relativamente ao tipo selvagem. A taxa de autooxidação também foi afetada, visto que a cadeia lateral

amina da Glutamina forma uma ligação de hidrogênio com O₂ bem mais fraca que a Histidina.

O aminoácido Valina (Val68) possui um caráter hidrofóbico que é fundamental para garantir a alta afinidade do grupo prostético pelo oxigênio e para aumentar a estabilidade contra autoxidação. Ele interage com a histidina e com o O₂ ligado (Quillin et al., 1995). A substituição da Valina por Fenilalanina praticamente não alterou a taxa de autoxidação, o que pode ser atribuído a uma competição entre dois efeitos antagônicos: o enfraquecimento da ligação de hidrogênio da His64 com o O₂, que tem efeito negativo na estabilidade, e o aumento na hidrofobicidade pela presença do grupo fenil, que inibe a autoxidação (Brantley et al., 1993). A presença desse grupo fenil também inibe o movimento do ligante para dentro e para fora da proteína. O resultado líquido é uma diminuição na afinidade pelo O₂.

A substituição da Leucina (Leu29) por Fenilalanina na mutante 29F resultou em uma taxa de autoxidação um pouco menor (aproximadamente dois terços do valor da mioglobina selvagem). A diferença entre a taxa de autoxidação dessa mutante e aquela do tipo selvagem observada em trabalhos anteriores a 25 °C (Brantley et al., 1993) foi bem maior. A autoxidação é inibida, provavelmente, pelo preenchimento da cavidade distal pelo grupo fenil, o que dificulta o acesso do solvente ao grupo hemo. Além disso, ocorre uma interação entre o anel aromático e o oxigênio que estabiliza a ligação. Ao preencher a cavidade distal com o anel aromático, a constante de dissociação também diminui bastante pois o O₂ dissociado permanece nesta cavidade um tempo longo o suficiente para permitir sua recombinação com o metal. O resultado é um grande aumento na afinidade. (Carver et al., 1992)

A mutante 88A apresentou taxa de autoxidação e afinidade pelo O₂ semelhantes ao tipo selvagem. A razão para investigá-la foi o fato de possuir um aminoácido apolar numa posição que confere maior estabilidade à sua apomioglobina, que pode levar a níveis de expressão mais altos que no tipo selvagem (Hargrove e Olson, 1996).

4.2.5.2 CoMbs

Como discutido anteriormente, os espectros de absorção das formas oxigenada e oxidada das CoMbs são muito semelhantes, tornando difícil uma determinação precisa da concentração de cada uma das espécies pela simples análise do espectro (Yonetani et al., 1974, Yanamoto et al., 1974). Desta forma, antes do estudo sobre oxidação das

CoMbs, foi necessária uma investigação visando estabelecer uma metodologia adequada à caracterização da estabilidade dessas mioglobinas contendo cobalto, a qual será discutida a seguir.

➤ Espectro de absorção das CoMbs

Ambas as formas, oxiCoMb e metCoMb, apresentam picos de absorção na região do visível em torno de 576 nm e 538 nm, e na região de Soret em torno de 425 nm. A forma desoxi, por outro lado, apresenta um pico de absorção em torno de 405 nm e uma banda difusa, em torno de 570 nm, cujo formato depende da proporção de metMb presente. A Figura 4.13 mostra os espectros de absorção das espécies oxi, desoxi e metCoMb.

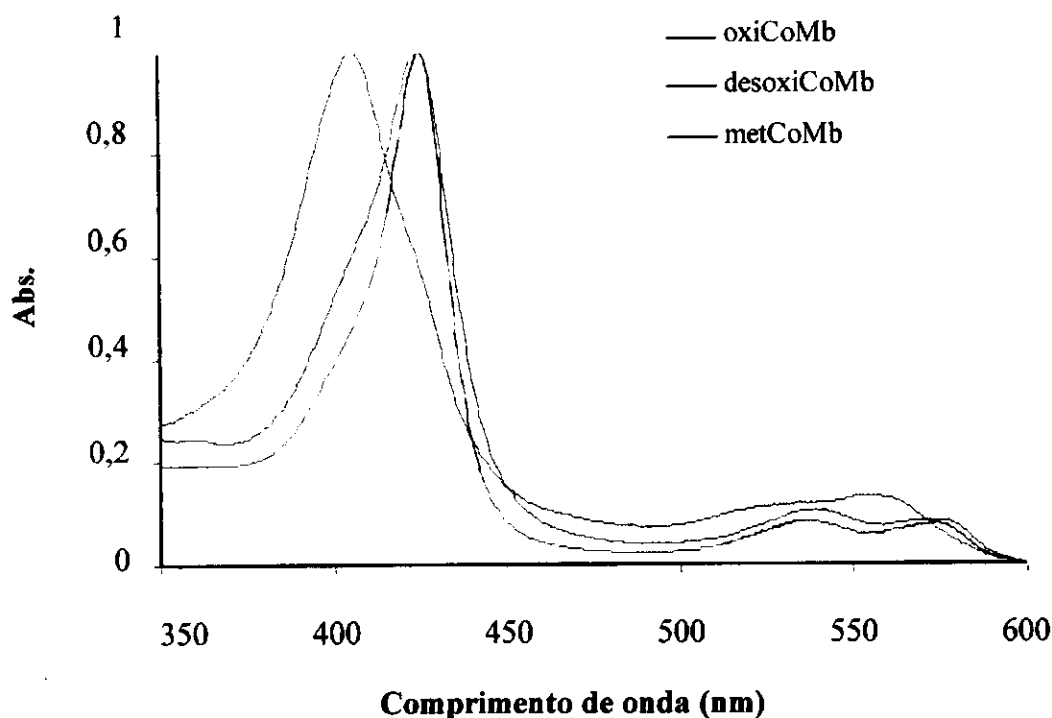


Figura 4.13: Espectro de absorção da cobalto-mioglobina de baleia nativa (Sigma), obtido em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.

Uma forma de avaliar qualitativamente a qualidade da CoMb é analisando-se as mudanças espectrais ocorridas durante a transição entre as formas oxigenada e desoxigenada. Na Figura 4.14 pode-se verificar a existência de um ponto isobestico em

414,5 nm, indicando a ausência de oxidação ou desnaturação.

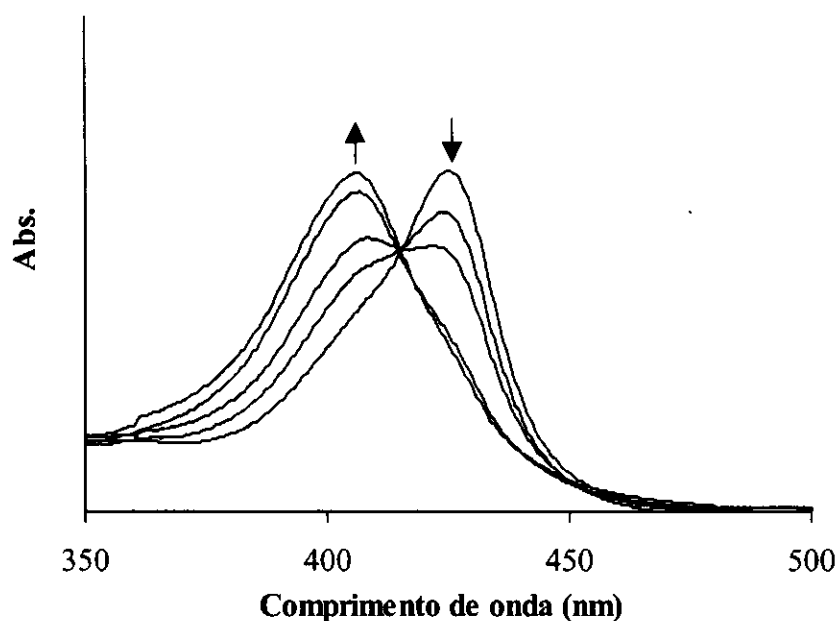


Figura 4.14: Transição oxi/desoxi para a cobalto-mioglobina de baleia, nativa, sob desaeração com N_2 .

O método para dosagem de metCoMb desenvolvido foi o utilizando cianeto de potássio. Como descrito no Anexo 2, item A.4, obteve-se uma curva de calibração a partir da qual foi possível determinar a concentração da espécie oxidada em solução.

Observou-se, ainda, que a forma do pico em 425 nm é sensivelmente afetada pela proporção entre oxiCoMb e metCoMb, como mostrado na Figura 4.15. Baseado nesta observação, recorreu-se a um planejamento experimental visando avaliar a extensão da contribuição de cada espécie e possibilitando, desta forma, a utilização destas informações para caracterizar a estabilidade das CoMbs.

O modelo proposto, detalhado no Anexo 2, item A.6, considera que a absorção total em 425 nm é igual à soma das absorções das formas oxi e met presentes na solução. Pelos resultados da estimativa, conclui-se que existe uma forte correlação entre o pico de absorção em 425 nm e a concentração de oxi e metmioglobina na amostra, como pode ser visto na Figura 4.16.

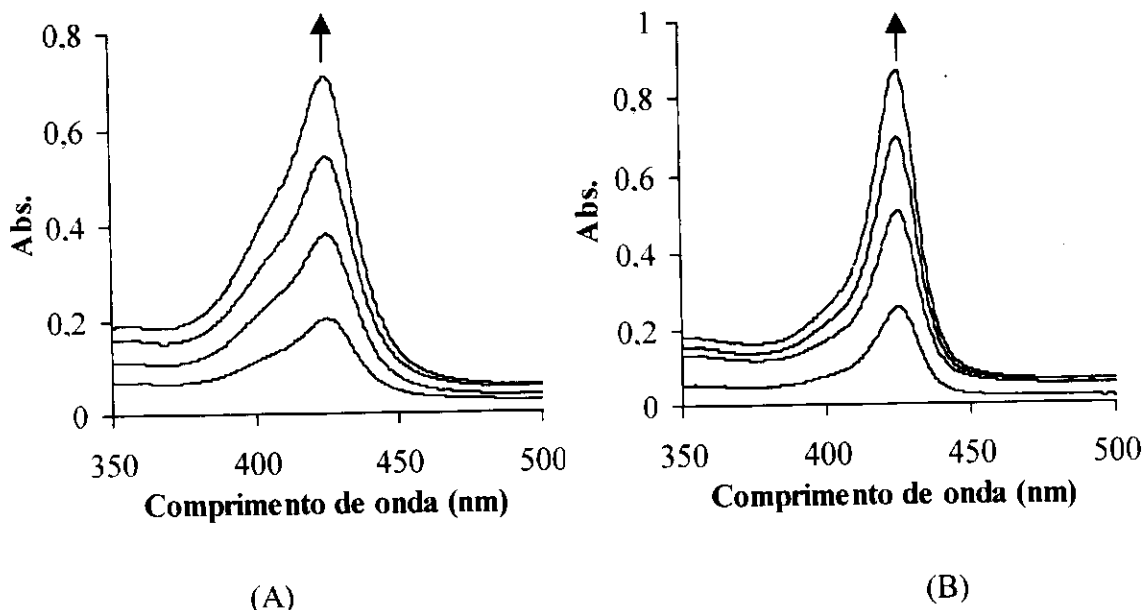


Figura 4.15: Variação do pico de absorção em 425 nm pela adição de oxiCoMb (A) e metCoMb (B). Proteína = mioglobina de baleia (nativa) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.

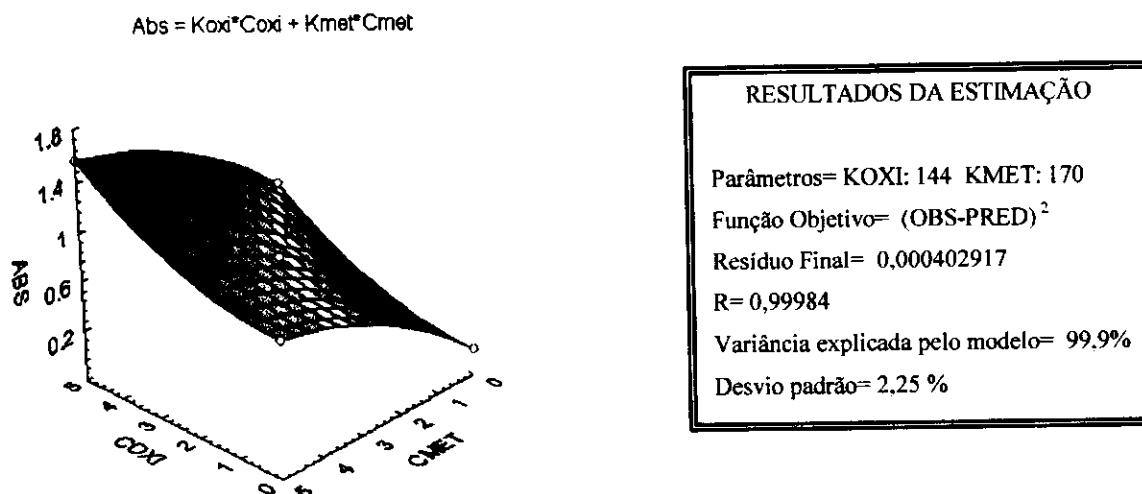


Figura 4.16: Correlação entre o pico de absorção em 425 nm e a concentração de oxi e metmioglobina presentes em solução. Proteína = CoMb de baleia (nativa) em tampão fosfato 0,1 M, concentração na faixa de 0 a 5 µM.

Utilizando-se as técnicas acima mencionadas, pôde-se, então, acompanhar a oxidação das CoMbs.

➤ Estabilidade das CoMbs

Os testes de autoxidação das CoMbs foram realizados com a proteína nativa, como padrão. Os resultados, contudo, podem ser extrapolados para as mioglobinas mutantes.

A Figura 4.16 mostra uma comparação entre a autoxidação de CoMb de cavalo e de baleia (ambas nativas) a 25 °C. Foram utilizados dois métodos para acompanhar a evolução da quantidade de metamioglobina: o método do cianeto e o aumento da absorção em 425 nm.

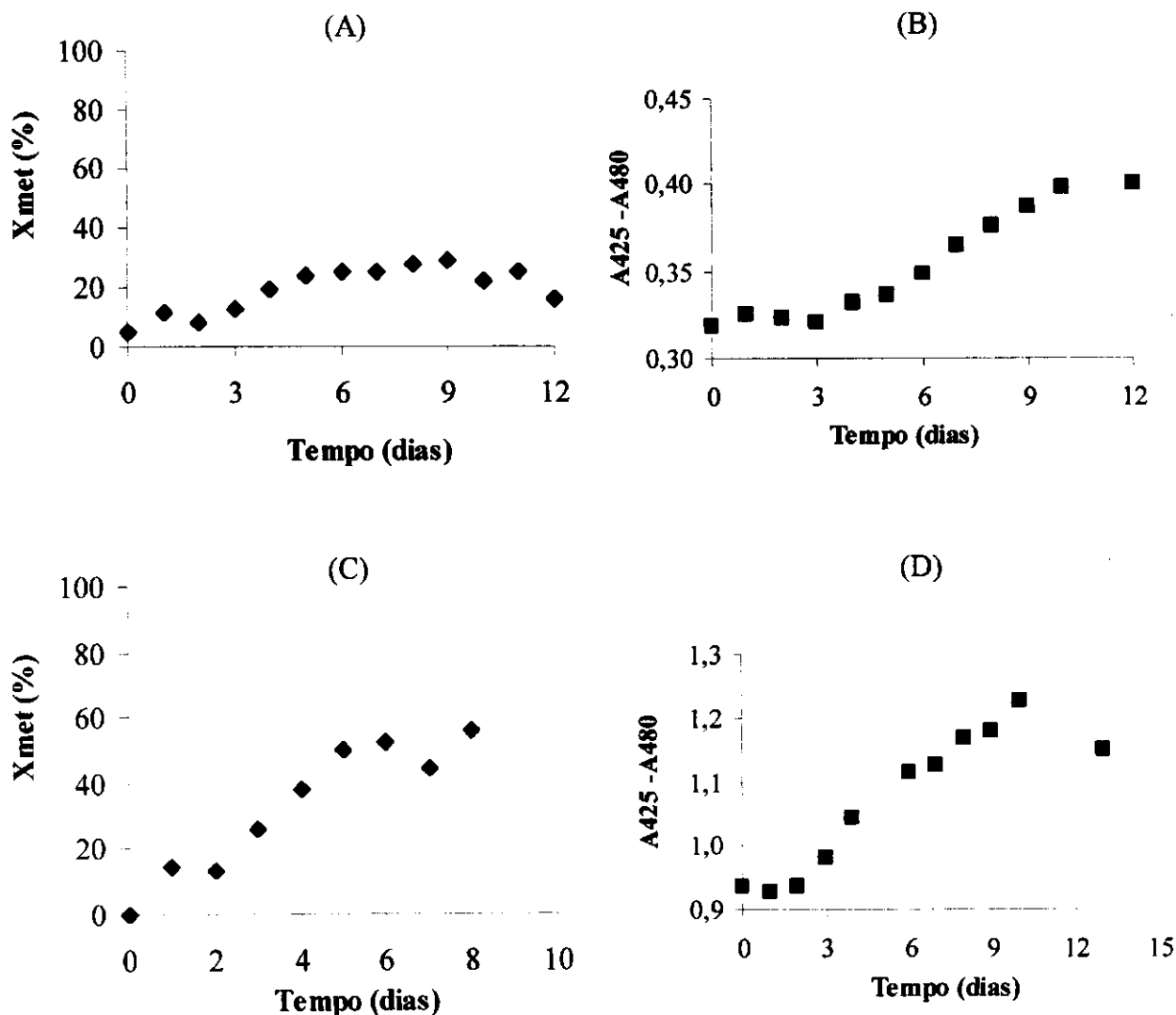


Figura 4.17: Autoxidação de CoMb de cavalo (A) e (B) e de baleia (C) e (D), ambas nativas. As figuras (A) e (C) mostram a evolução da fração de metamioglobina determinada pelo método do cianeto. As figuras (B) e (D) mostram a evolução da absorção em 425 nm, como resultado do aumento de metamioglobina na solução. Teste realizado em tampão fosfato 100 mM/EDTA 1mM, pH 7,0, a 25 °C, concentração inicial de CoMb = 3 µM.

Como pode ser observado, a oxidação das CoMb é bastante lenta comparativamente à da correspondente FeMb. Cabe notar que, nos experimentos representados na Figura 4.17 (A) e (C), a concentração de metCoMb parece diminuir depois de determinado período, o que pode ser atribuído, pelo menos parcialmente, a uma contaminação da solução por microrganismos. Em anaerobiose, a oxiMb é convertida em desoxiMb, mais estável, o que também interfere na dosagem. Desta forma, é difícil acompanhar o curso total da autooxidação das CoMb, mesmo tomando-se precauções como filtração das soluções com membrana de diâmetro de poro de 0,2 μm .

Devido às limitações dos métodos empregados, não foi possível determinar precisamente o tempo de meia-vida da CoMb. Assim, outro teste foi realizado, com um equipamento de fotólise a laser. Mediante a aplicação de um pulso, a ligação Co-O-O é quebrada produzindo desoxiCoMb e oxigênio livre na cavidade distal. Cessado o pulso, o O_2 recombina com o cobalto, restaurando a forma oxigenada. A transição da forma desoxi para a oxi é seguida por mudanças no espectro de absorção da proteína em solução e a extensão da recombinação pode ser usada para avaliar a quantidade de oxiMb presente na amostra (Carver et al., 1990).

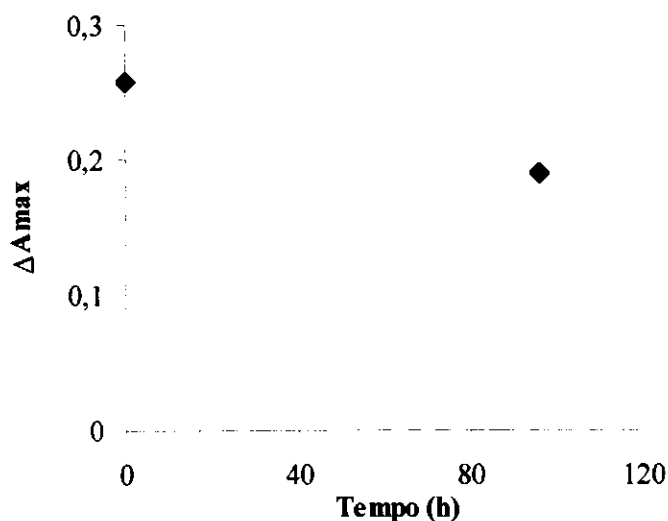


Figura 4.18: Variação da fração de mioglobina oxigenada com o tempo, expressa em termos da diferença máxima de absorção da solução de proteína quando submetida à reoxigenação. Amostra = CoMb eqüina em tampão fosfato 100 mM/EDTA 3 mM, a 25 °C.

Na Figura 4.18, a abscissa do gráfico representa a variação na absorção da amostra de CoMb após aplicação do pulso, quando ela passa de desoxi para oxiMb. Na ordenada,

tem-se o intervalo de tempo entre as duas medidas. Como pode ser observado, após 96 h a 25°C, a CoMb ainda foi capaz de recombinar 75% do O₂ comparativamente ao primeiro dia. Isto significa que a proporção de oxiCoMb na amostra diminui apenas 25% após 4 dias, indicando, mais uma vez, uma taxa de autooxidação bem reduzida.

A Figura 4.19 compara a estabilidade das CoMb e FeMb a 50 °C. Neste caso, foi utilizado o aumento na absorção em 425 nm para acompanhar a reação de oxidação. A variação na absorção foi apresentada em termos da variação máxima que seria observada se toda a mioglobina fosse convertida à metamioglobina.

Como pode ser observado, enquanto a oxiFeMb foi totalmente convertida a metFeMb em algumas horas ($t_{1/2} = 1h$), a correspondente CoMb manteve-se estável durante o mesmo período.

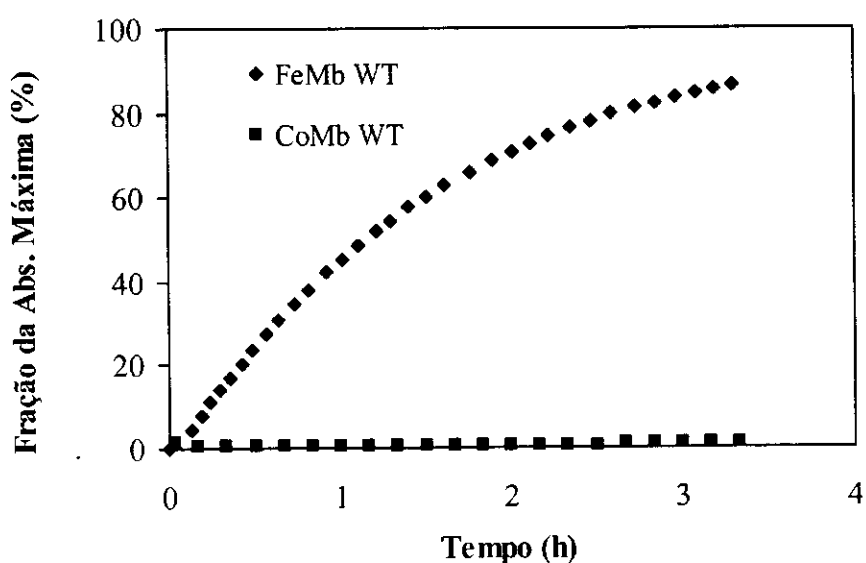


Figura 4.19: Oxidação de FeMb e CoMb a 50°C. Em ambos os casos, a proteína era de baleia, WT. Experimentos conduzidos em tampão fosfato 100 mM/EDTA 1mM, pH 7,0.

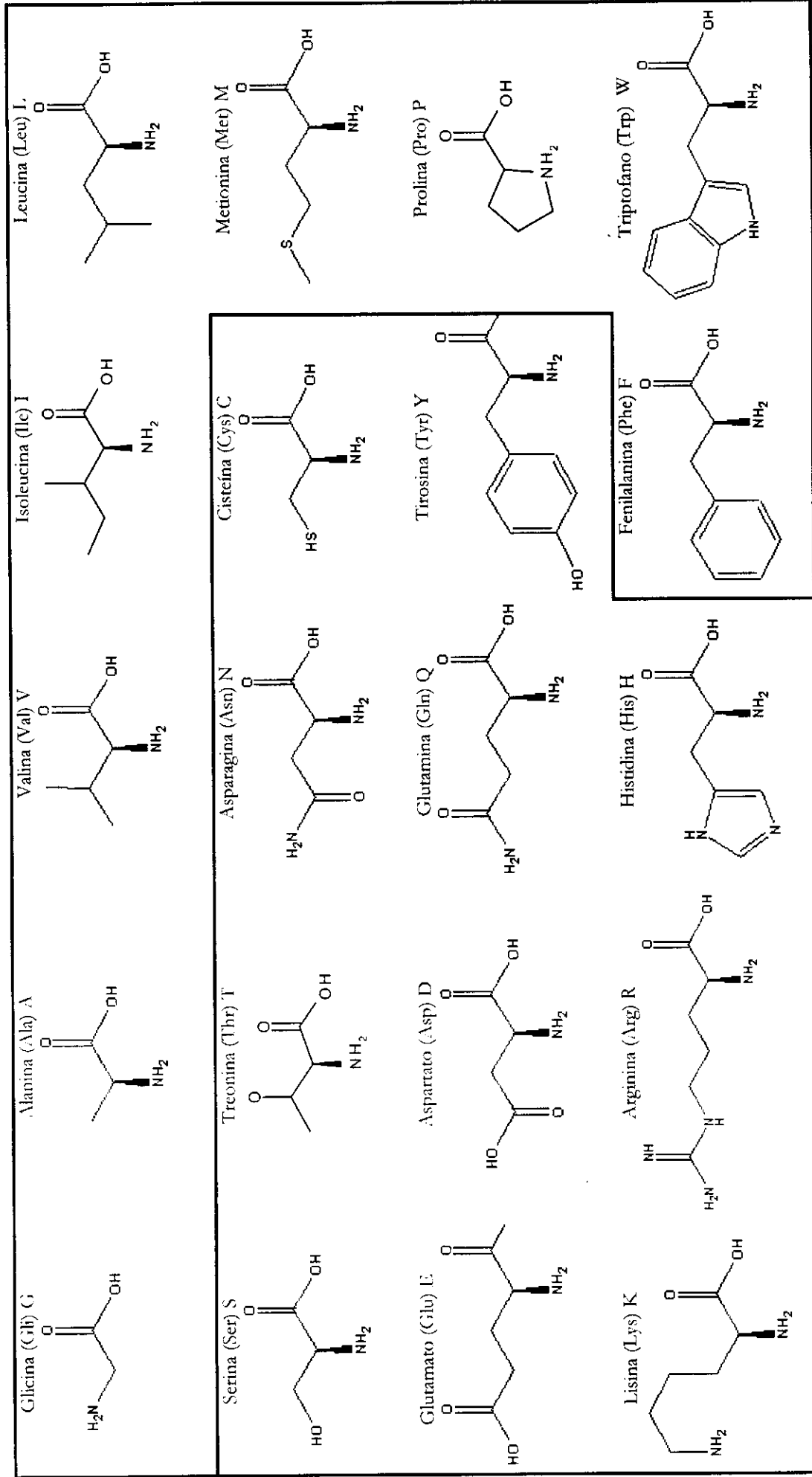
4.3 CONCLUSÕES

No sistema empregado, a eficiência da transformação das células de *E. coli* é elevada, embora não tenha sido feita uma estatística da mesma. No entanto, os custos de produção são altos e limitados pelo nível de expressão da proteína pela bactéria. O

rendimento em termos de massa celular (4 g/L) e de proteína (1 mg/L) precisam ser melhorados tendo em vista as aplicações pretendidas neste trabalho.

Quanto à oxidação da mioglobina, esta é indesejada uma vez que a forma férrica da proteína não transporta O₂. As estratégias investigadas visando obter uma maior estabilidade foram a construção de proteínas recombinantes e a substituição do metal por cobalto. A mutante 29F68F resultou em uma redução significativa na taxa de autoxidação, que foi 3,5 vezes menor que no caso da MbWT. Nas condições investigadas, a 37 °C, uma pequena melhoria na taxa de autoxidação foi obtida com a mutante 29F ($k_{OX_{29F}} = 2/3 k_{OX_{WT}}$). A estabilização a 25 °C, no entanto, pode ser muito superior ($k_{OX_{29F}} = 1/10 k_{OX_{WT}}$), como relatado em trabalhos anteriores (Brantley et al., 1993).

A substituição por cobalto resultou em uma grande melhora na estabilização da mioglobina. Enquanto o tempo de meia-vida para um FeMb WT foi de apenas 13 h, na correspondente CoMb o mesmo foi superior a 96 h. Assim, utilizando-se as duas técnicas simultaneamente, é possível obter mioglobinas até 80 vezes mais estáveis.



HIDROFÍLICOS

HIDROFÓBICOS

METODOLOGIAS DETALHADAS

A.1 CASSETE-MUTAGÊNESES

Materiais:

Enzimas e tampão da ligase = Promega

Tampão de ligação = Sigma

- Digestão do Vetor:

- Adicionar, em dois eppendorfs estéreis (uma para cada enzima de restrição):
 - 10 µg do vetor
 - 50 U da enzima (Hpa I em um e Bgl II em outro)
 - 20 µl do tampão da enzima
 - Completar para 200 µl com água deionizada estéril (ddH₂O)
- Aquecer a 37 °C por 2h;
- Separar uma alíquota de 10 µl para analisar por eletroforese;
- Ao restante, adicionar a mesma quantidade de uma mistura 1/1 de fenol/clorofórmio, agitar por vortex;
- Centrifugar a 14000 rpm por 3 min.
- Ao sobrenadante, adicionar 400 µl de etanol 100 % e agitar. Resfriar a -70 °C por 50 minutos;
- Centrifugar a 14000 rpm
- Adicionar etanol 70 %. Centrifugar a 14000 rpm por 5 min;
- Remover o sobrenadante com uma pipeta e centrifugar à vácuo para completar a remoção do etanol;
- Ressuspender em 5 µl de água. Adicionar:
 - 5 U da outra enzima de restrição
 - Completar para 100 µl com o tampão da enzima
- Repetir os passos anteriores a partir da extração com clorofórmio/fenol.

- Fosforilação dos Oligonucleotídeos (Ransom Hill Bioscience, Inc.)

- Adicionar, separadamente para cada lado da fita do DNA :
 - 1 µl do oligo (topo ou fundo)
 - 2 µl de tampão
 - 1 µl de ATP 0,05 mM
 - 0,5 µl de TPK
 - Completar para 20 µl com ddH₂O
- Aquecer a 37 °C por 1h;
- Aquecer a 65 °C por 10 min;
- Centrifugar a 14000 rpm por 1 min.

- Anelamento
 - Misturar os dois lados da fita do DNA
 - Aquecer a 95 °C por 3 min;
 - Resfriar em banho refrigeração até atingir temperatura ambiente.

- Ligaçãõ
 - Misturar :
 - 1 µl do vetor
 - 1 µl do oligonucleotídeo
 - 1 µl de tampão de ligaçãõ
 - 7 µl de ddH₂O
 - Aquecer a 75 °C por 5 min;
 - Resfriar até temperatura ambiente, por 1 a 2 h;
 - Adicionar:
 - 1 µl de tampão da ligase
 - 1 µl de ATP 0,05 mM
 - 1 µl de T4 DNA ligase
 - Manter a 15 °C por 12 h

- Transformaçãõ
 - Adicionar a mistura acima à 50 µl de células competentes, preparadas como descrito no item A.2;
 - Deixar em repouso por 30 min em banho de gelo;
 - Aquecer a 42 °C por 60 s;
 - Adicionar 50 µl de meio LB
 - Plaquear em meio LB com ampicilina;
 - Incubar a 37 °C por 12 h.

- Inoculaçãõ
 - Inocular 1 colônia em um tubo contendo meio LB com ampicilina;
 - Incubar a 37 °C por 12 h.

- Purificaçãõ do DNA
 - Seguir Protocolo do Sistema de Purificaçãõ MiniPrep Wizard ® (Promega).
 - O DNA obtido era estocado a -70 °C até posterior uso.

- Análise do DNA
 - Adicionar:
 - 3 μ l de ddH₂O
 - 3 μ l de tampão
 - 5 μ l do DNA purificado
 - 1 μ l de Hpa I diluída 5 vezes
 - Incubar a 37 °C por 1 h;
 - Adicionar 2 μ l de corante (Comassie Blue);
 - Preparar um padrão com 5 μ l de DNA sem cortar com a enzima
 - Proceder eletroforese em gel de agarose fluorescente (0,9 % de agarose em tampão TEAE com 4 μ l de brometo de etidium).

A.2 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES

- Inocular células de *E. coli* cepa DH5 α do estoque em glicerol em 5 ml de meio LB;
- Incubar a 37 °C por 12 h;
- Transferir 1 ml do cultivo para 50 ml de LB. Incubar a 37 °C por 1 h, com agitação;
- Centrifugar a 3000 rpm por 30 min. Descartar sobrenadante;
- Suspende em aproximadamente 20 ml de CaCl₂ 50 mM;
- Deixar em repouso em banho de gelo por 30 min.;
- Centrifugar a 3000 rpm por 30 min. Descartar sobrenadante;
- Ressuspender em uma solução 85% CaCl₂ 100 mM/ 15% glicerol
- Deixar em repouso em banho de gelo por 30 min.;
- Separar em alíquotas de 200 μ l;
- Estocar a - 80 °C.

A.3 PURIFICAÇÃO DA MIOGLOBINA

Dia 1:

- Preparar o tampão de lise:
 - Tris 50 mM
 - EDTA 1 mM
 - Ditiotreitol 0,5 mM
 - TSC (Tolueno Sulfonil Cloreto) 1mM
 - DNase I 40 U/ml
 - RNase A 3 U/ml
 - Lisozima 2 mg/ml
 - Ajustar o pH para 6,0
- Descongelar as células, adicionar ao tampão e agitar por 12 h, a 4 °C.

Dia 2:

- Centrifugar o lisado a 12000 rpm por 30 min. Descartar o precipitado;
- Ao sobrenadante, adicionar 50% (p/v) de sulfato de amônia. Agitar por 2 h a 4 °C;
- Centrifugar a 1200 rpm por 30 min. Descartar o precipitado;
- Ao sobrenadante, adicionar 95% (p/v) de sulfato de amônia. Agitar por 2 h a 4 °C;
- Centrifugar a 1200 rpm por 30 min. Descartar o sobrenadante;
- Ressuspender o precipitado em um tampão Tris 20 mM/ EDTA 1 mM, pH 8.
- Dialisar contra tampão Tris 20 mM/ EDTA 1 mM, pH 8, a 4 °C por 12 h.

Dia 3:

- Purificar a proteína por troca iônica, utilizando as resinas CM-52, catiônica (carboximetilcelulose - Whatman), e DEAE, aniônica (dietilaminoetil - Whatman).

Coluna de DEAE:

- Equilibrar com tampão tris 20 mM/ EDTA 1 mM pH 8;
- Aplicar a solução na coluna (concentrar primeiro se o volume for muito grande);
- Recolher a fração mais vermelha;
- Ajuste o pH para 6 com ácido acético, antes da próxima etapa.

Coluna CM52:

- Equilibrar com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 6;
 - Aplicar a solução na coluna;
 - Lavar com o mesmo tampão acima;
 - Quando toda proteína estiver presa no topo da coluna, eluir com um gradiente de pH (de fosfato de sódio 20 mM pH 6 a fosfato de sódio dibásico 50 mM pH 9);
- Concentrar a proteína e determinar sua concentração.

A.4 PREPARO DE COBALTO-MIOGLOBINA

Dia 1: Extração do Hemo

- Diluir uma solução de mioglobina oxidada com tris 2 mM, até a concentração final de 0,2 mM;
- Diminuir lentamente o pH para 2,0-2,2 com HCl;
- Adicionar à solução de mioglobina o mesmo volume de metil-etil-cetona a 0 °C;
- Agitar vigorosamente e deixar decantar até separação de fases;

- Descartar a camada superior e repetir o processo. Realizar todas as etapas acima em banho de gelo;
- Transferir a solução da apoproteína para um tubo de diálise e dialisar contra água deionizada a 4 °C, por 12 h.
- Efetuar uma diálise contra tampão tris 5 mM pH 7, por 2 horas e outra contra tampão tris 50 mM pH 7.

Dia 2: Reconstituição com Cobalto

- Centrifugar a apoproteína a 8500 rpm por 10 min; descartar o precipitado;
- Pesar a quantidade apropriada de cobalto porfirina (ver como calcular no final deste item *) e de ditionito de sódio (aproximadamente 1 mg de ditionito/ mg de proteína);
- Preparar uma coluna G-25, equilibrada com tampão Tris 5 mM pH 9,5, conforme esquema da Figura A.1.
- Purgar a solução de apoproteína com N₂ por 20 min;
- Dissolver o ditionito de sódio em 0,5 mL de água desaerada. Dissolver a porfirina em 0,5 mL de piridina. Adicionar uma parte desta solução à piridina e outra parte à apoproteína, a qual deve ser desaerada previamente com a passagem de N₂ por 20 minutos.
- Aplicar a solução na coluna G-25 previamente preparada;
- Recolher a proteína (fração vermelha que sai primeiro);
- Aplicar numa coluna DEAE equilibrada com tampão Tris 5 mM pH 9,5.
- Eluir com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6;
- Concentrar a solução.

* Titulação com hemin:

- Pesar 2 mg de hemin;
- Dissolver em 2 mL de NaOH 0,1M
- Diluir cinco vezes com água deionizada
- Em uma cubeta, diluir 100 µl da solução da apoproteína em 1 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7;
- Levar ao espectrofotômetro e adicionar alíquotas de 5 µl de hemin por vez, registrando o espectro de absorção da solução no intervalo de 350 nm a 450 nm, aproximadamente;
- Finalizar quando a adição de hemin não mais provocar mudanças significativas na curva de titulação;
- Determinar a quantidade de cloreto de cobalto a ser adicionada, segundo os cálculos:

$$Co = n_{\text{hemin}} \cdot \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{amostra}}} \cdot MM \quad (A.1)$$

Onde:

C_o = massa do cloreto de cobalto, em miligramas;
 n_{hemin} = número de mols de hemin gastos na titulação;
 V_{total} = volume total da solução de proteína
 V_{amostra} = volume da amostra titulada
 MM = massa molecular do cloreto de cobalto (600 g/gmol).

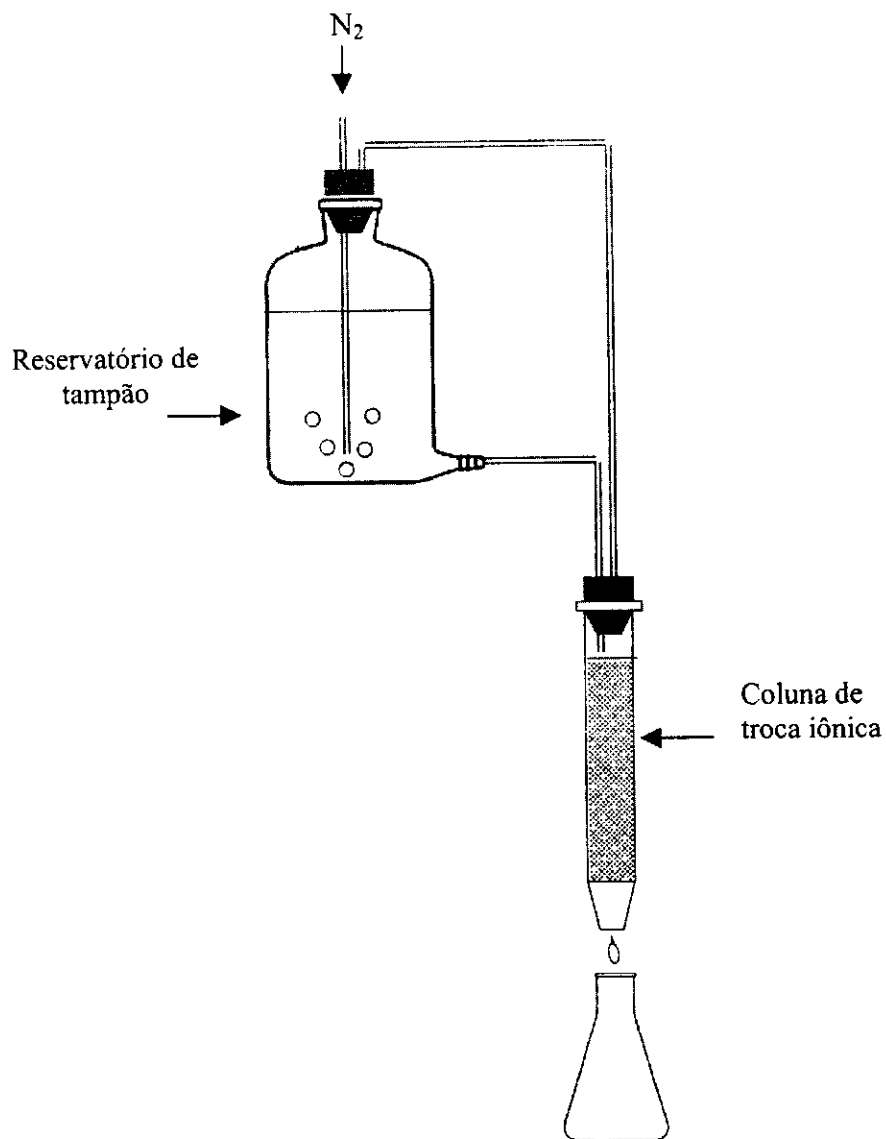


Figura A.1: Esquema do aparato experimental utilizado no preparo das mioglobina cobalto-substituídas.

A.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAMIOGLOBINA UTILIZANDO KCN

- Preparar soluções de metamioglobina de concentrações conhecidas;
- Para cada solução fazer a leitura da densidade óptica em 425 nm. Anotar o valor com DO1;
- Adicionar 1 μ l de uma solução de KCN a 50%. Ler novamente a 425 nm, chamando de DO2;
- Calcular, para cada solução, $\Delta DO = DO1 - DO2$;
- Construir uma curva de calibração de ΔDO em função da concentração de metamioglobina, como na Figura A.2;
- Utilizar a curva para determinar a concentração de metamioglobina em outras amostras.

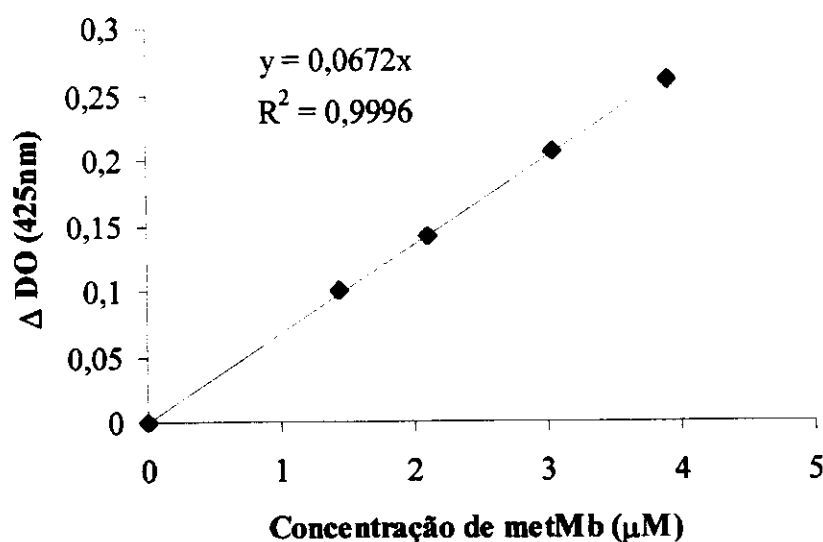


Figura A.2: Curva de calibração obtida para a mioglobina de baleia.

A.6 ESTUDO DOS ESPECTROS DA OXI E DA METAMIOGLOBINA

- Foi elaborado um planejamento experimental a 2 níveis com 2 variáveis: COXI e CMET, que representam a concentração de oxi e metamioglobina, respectivamente, com três réplicas no ponto central, como mostrado na tabela A.1;
- Foi proposto um modelo considerando-se que a absorção total em 425 nm é igual à soma das absorções das formas oxi e meta, estimando os parâmetros da seguinte equação:

$$ABS = KOXI \times COXI + KMET \times CMET$$

Onde:

KOXI e KMET = coeficiente de extinção das espécies oxigenada e oxidada, respectivamente

COXI e CMET = concentração molar das espécies oxigenada e oxidada, respectivamente

Tabela A.1: Plano experimental a dois níveis com duas variáveis e três réplicas no ponto central.

Experimento	COXI(μ M)	CMET(μ M)	DO (425 nm)
1	5	5	1,5614
2	5	0	0,7314
3	0	5	0,8595
4	0	0	0
5	2,5	2,5	0,7836
6	2,5	2,5	0,795
7	2,5	2,5	0,7921

RESULTADOS:

Utilizando-se o Software Statistica, obteve-se o seguinte resultado:

Função Objetivo (OBS-PRED)**2 => Resíduo Final = 0,000402917

R = 0,99984

Variância explicada pelo modelo = 99,967%

Parâmetros: KOXI = 144 KMET = 170 Desvio padrão 2,25 %

Interessante notar que os valores de KOXI e KMET estimados estão em acordo com aqueles obtidos por outros métodos:

KOXI = 140 mM (Yonetani et al., 1974)

KMET = 190 mM (Hambrecht et al., 1984, em Chen-Zhong et al., 2000)

Na Figura A.3 podem ser encontradas as superfícies de resposta previstas pelo modelo. Embora não tenha sido utilizado para determinar a concentração de metamioglobina presente, a variação na absorção em 425 nm mostrou-se útil para uma avaliação qualitativa da evolução da concentração da espécie oxidada.

$$\text{Abs} = K_{\text{oxi}} \cdot C_{\text{oxi}} + K_{\text{met}} \cdot C_{\text{met}}$$

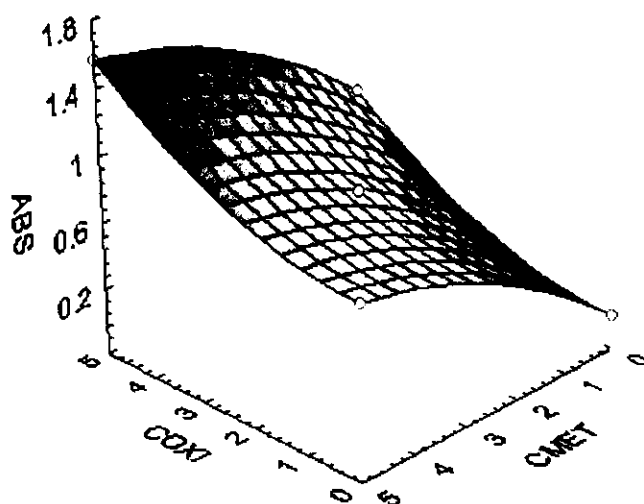


Figura A.3: Correlação entre o pico de absorção em 425 nm e a concentração de oxi e metamioglobina presentes em solução. Proteína = CoMb de baleia (nativa) em tampão fosfato 0,1 M, concentração na faixa de 0 a 5 μM .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ascoli, F., Rossi-Fanelli, M. R., Antonini, E. (1981). *Preparation and Properties of Apohemoglobin and Reconstituted Hemoglobins*, Meth. Enzym., 76, 72-87.
- Balagopalakrishna, C., Abugo, O. O., Horsky, J. et al. (1998), *Superoxide Produced in the Heme Pocket of the β -Chain of Hemoglobin Reacts with the β -93 Cysteine To Produce a Thiyl Radical*, Biochemistry, 37, 13194-13202.
- Benesch, R. E. (1994), *Bis(pyridoxal)Polyphosphates as Specific Intramolecular Cross-Linking Agents for Hemoglobin*, Meth. Enzym., 213, 267-274.
- Brantley R. E., Smerdon, S. J., Wilkinson A. J., Singleton, E. W., Olson, J. S. (1993), *The Mechanism of Autooxidation of Myoglobin*, J. Biol. Chem., 268, 6995-7010.
- Brooks, J. (1931), *The oxidation of Hemoglobin to Methaemoglobi by Oxygen*, Proc. Roy. Soc., 109, 35-50.
- Brown, W. D., Mebine, L. B. (1969), *Autoxidation of Oxymyoglobins*, J. Biol. Chem., 244, 6696-6701.
- Casiday, R., Frey, R., 1998, *Metal Complexes in the Blood for Oxygen Transport*, Department of Chemistry, Washington University. URL: <http://wunmr.wustl.edu/EduDev/LabTutorials/Hemoglobin/MetalComplexinBlood.html>
- Carver, T. E.; Brantley, R. E., Jr; Singleton, E. W. et al. (1992), *A Novel Site-Directed Mutant of Myoglobin with an Unusually High O₂ Affinity an Low Autoxidation Rate*, J. Biol. Chem. 267, 14443-14450.
- Carver, T., Rolphs, R. J., Olson, J. S. et al. (1990), *Analysis of the Kinetic Barriers for Ligand Binding to Sperm Whale Myoglobin Using Site-Directed Mutagenesis and Laser Photolysis Techniques*, J. Biol. Chem., 265, 20007-20020.
- Chang, T. M. S. (1999), *Artificial Cells, Encapsulation, and Immobilization*, An. N. Y. Ac. Sci., 875, 71-83.

- Chen, X-S, Nishide, H., Tsuchida, E. (1996), *Analysis of Facilitated Oxygen Transport in a Liquid Membrane of Hemoglobin*, Bull. Chem. Soc. Jpn, 69, 255-259.
- Chen-Zhong, L., Nishiyama, K., Taniguchi, I. (2000), *Eletrochemical and Spectroelectrochemical studies on Cobalt Myoglobin*, Electrochim. Acta, 45, 2883-2888.
- Dewilde, S., Blaxter, M., Hauwaert, M-L. V. et al. (1998), *Structural, Functional, and Genetic Characterization of Gastrophilus Hemoglobin*, J. Biol. Chem., 273, 32467-32474.
- Domokos, G., Jopski, B., Schmidt, K-H., *Preparation, Properties and Biological Function of Liposome Encapsulated Hemoglobin*, in: Blood Substitutes and Oxygen Carriers, Chang, T. M. S. (ed), Marcel Dekker, New York, 1993, 167-176.
- Egbert, K. D.; Springler, B. A.; Sligar, S.G. et al. (1990), *The Role of Val⁶⁸(E11) in Ligand Binding to Sperm Whale Myoglobin.*, J. Biol. Chem., 265, 11788-11795, 1990.
- Everse, J. (1994), *Photochemical Reduction of Methemoglobin and Methemoglobin Derivatives*, Meth. Enzym., 231, 525-535.
- Faithfull, N. S., *Oxygen Delivery from Fluorocarbon Emulsions – aspects of Convective and Difusive Transport*, in: Blood Substitutes and Oxygen Carriers, Chang, T. M. S. (ed), Marcel Dekker, New York, 1993, 167-176.
- Farmer, M. et al., *Validation of Virus Inactivation by Heat Treatment in the Manufacture of Diaspirin Crosslinked Hemoglobin*, in: Blood Substitutes and Oxygen Carriers, Chang, T. M. S. (ed), Marcel Dekker, New York, 1993, 167-176.
- Feit, A., Sladen, R. N. (1999), *New Hemoglobin Substitutes*, Curr. Opin in Anaesthesiology, 12, 473-479.
- Feitelson, J., McLendon, G. (1991), *Migration of Small Molecules Through the Structure of Hemoglobin: Evidence for Gating in a Protein Electron-Transfer Reaction*, Biochemistry, 30, 5051-5055.
- Findsen, E. W., Friedman, J. M., Ondrias, M. R. (1988), *Effect of Solvent Viscosity on the Heme-Pocket Dynamics of Photolized (Carbonmonoxy)hemoglobin*, Biochemistry, 27, 8719-8724.
- George, P., Stratmann, C. J. (1952), Biochem J., 51, 103-108.

- Guillochon, D., Esclade, L., Remy, M. H., Thomas, D. (1981), *Studies on Haemoglobin immobilized by Cross-Linking with Glutaraldehyde Cross-Linked Soluble Polymers and Artificial Membranes*, *Biochim. Biophys. Acta*, 670, 332-340.
- Guillochon, D., Esclade, L., Thomas, D. (1986), *Effect of Glutaraldehyde on Haemoglobin: Oxidation-Reduction Potentials and Stability*, *Biochem. Pharm.*, 35, 317-323.
- Hayashi, A., Suzuki, T., Shin, M. (1973), *An Enzymic Reduction System for Metmyoglobin and Methemoglobin, and Its Application to Functional Studies of Oxygen Carriers*, *Biochim. Biophys. Acta*, 310, 309-316.
- Hargrove, M. S., Olson, J.S. (1996), *The Stability of Holomyoglobin is Determined by Heme Affinity*, *Biochemistry*, 35(35), 11310-11318.
- Hargrove, M. S., Krzywda, S., Wilkinson, A. J. et al. (1994), *Stability of Myoglobin: A Model for the Folding of Heme Proteins*, *Biochemistry*, 33(39), 11767-11775.
- Herskovits, T. T., Gadegbeku, B., Jaillet, H. (1970), *On the Structural Stability and Solvent Denaturation of Proteins*, *J. Biol. Chem.*, 245, 2588-2598.
- Hsu, G. C., Spilburg, C. A., Bull, C., Hoffman, B. M. (1972), *Coboglobins: Heterotropic Linkage and the Existence of a Quaternary Structure Change Upon Oxygenation of Cobalt-hemoglobin*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 2122-2124.
- Imai, K. Measurement of Accurate Oxygen Equilibrium Curves by an Automatic Oxygenation Apparatus. *Methods Enz.*, v. 76, p. 438-449, 1981.
- Kaim, W., Schwederski, B., *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life: An Introduction and Guide*, John Wiley & Sons, England, 1994.
- Kawanish, S., Caughey, W. S. (1985), *Mechanism of Electron Transfer to Coordinated Dioxygen of Oxyhemoglobins to Yield Peroxide and Methemoglobin*, *J. Biol. Chem.*, 260, 4622-4631.
- Keilin, D. (1961), *Reactions of Haemoproteins With Peroxide and the Supposed Formation of Hydrogen Peroxide During the Autoxidation of Haemoglobin*, *Nature*, 4790, 769-770.
- Keipert, P. E., Gomez, C. L., Gonzales, A., Macdonald, V. W., Winslow, R. M., *The Role of the Kidneys in the Excretion of Chemically Modified Hemoglobins*, in: *Blood*

- Substitutes and Oxygen Carriers, Chang, T. M. S. (ed), Marcel Dekker, New York, 1993, 516-524.
- Ketcham, E. M. B. A., Cairns, C. B. M. D. (1999), *Hemoglobin-Based Oxygen Carriers: Development and Clinical Potential*, Am. Emergency Medicine, 33, 326-337.
- Kilmartin, J. V., Imai, K., Jones, R. T. et al. (1978), *Role of Bhor Group Slat Bridges in Cooperativity in Hemoglobin.*, Bioch. Bioph. Acta., 534, 15-25.
- Kunkel, T. A. (1985), *Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 488-492, 1985.
- Lee, C. J., Kan, P., Chen, W. K., *The Purification and Comparative Analysis of Hemoglobin from Animal Bloods*, in: Blood Substitutes and Oxygen Carriers, Chang, T. M. S. (ed), Marcel Dekker, New York, 1993, 167-176.
- Leung, R., Poncelet, D., Neufeld, R. J. (1997), *Enhancement of Oxygen Transfer Rate Using Microencapsulated Silicone Oils as Oxygen Carriers*, J. Chem Tech. Biotechnol., 68, 37-46.
- MacDonald, V. (1994), *Measuring Relative Rates of hemoglobin Oxidation and Desnaturation*, Meth. Enzym., 231, 481-490.
- Marta, M., Patamia, A. C., Sacchi, S. et al. (1998), *Anionic Binding Site and 2,3-DPG Effect in Bovine Hemoglobin*, Biochemistry, 37, 14024-14029.
- Matsumura, H., Aoki, H., Morioka, T., Nishi, K. (1993), *Pyrodoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene Conjugated (PHP) on the Endothelium-Dependent Relaxation in Rat Mesenteric Arterioles*, in: *Encapsulated Hemoglobin*, in: Blood Substitutes and Oxygen Carriers, Chang, T. M. S. (ed), Marcel Dekker, New York, 1993, 465-467.
- McGown, E. L., Lyons, M. F., Marini, M. A., Zegna, A. (1990), *Reduction of Extracellular Methemoglobin by Erythrocytes*, Biochim. Biophys. Acta, 1036, 202-206.
- Miele, A. E., Santanché, S., Travaglini-Allocatelli, C. et al. (1999), *Modulation of Ligand Binding in Engineered Human Hemoglobin Distal Pocket*, J. Mol. Biol., 290, 515-524.

- Miller, L. M., Chance, M. (1995), *Structural and Electronic Factors that Influence Oxygen Affinities: A Spectroscopic Comparison of Ferrous and Cobaltous Oxyhemoglobin*, *Biochemistry*, 34, 10170-10179.
- Minato, N., Sasaki, T., Sakuma, I. et al., *Potential Clinical Application of the Oxygen Carrying Solutions*, in: *Blood Substitutes and Oxygen Carriers*, Chang, T. M. S. (ed), Marcel Dekker, New York, 1993, 57-64.
- Mizukami, H., Lumry, R. (1967), *Studies of Heme-Proteins I- Dissociation Equilibria of Horse Hemoglobin*, *Arch. Biochem. Bioph.*, 118, 434-447.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., *Harper's Biochemistry*, 24 ed., Prentice Hall, 24th ed., Connecticut, USA, 1996.
- Nedjar-Arroume, N., Castellano, A., Guillochon, D. (1995), *Stabilizing Effect of Water/Alcohol Solvents Towards Autoxidation of Glutaraldehyde-Modified Haemoglobin*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 21, 173-183.
- Nedjar-Arroume, N., Castellano, A., Piot, J.-M., Guillochon, D. (1993), *Stabilizing Effect of Water/Alcohol Solvents Towards Autoxidation Human Haemoglobin*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 18, 25-35.
- Nelson, D., Azari, M., Brown, R. et al., *Preparation and Characterization of Dispirin Cross-Linked Hemoglobin Solutions for Preclinical Studies*, in: *Blood Substitutes and Oxygen Carriers*, Chang, T. M. S. (ed), Marcel Dekker, New York, 1993, 241-245.
- Niederhoffer, E. C., Timmons, J. H., Martell, A. E. (1984), *Thermodynamics of Oxygen Binding in Natural and Synthetic Dioxygen Complexes*, *Chem. Rev.*, 84, 137-203.
- Nosé, Y. (1998), *Oxygen-Carrying Macromolecules*, *Art. Organs*, 22(7), 618-622.
- Page, T. C., Light, R., McKay, C. B., Hellums, J. D. (1998) *Oxygen Transport by Erythrocyte/Hemoglobin Solution Mixtures in an in Vitro Capillary as a Model of Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Performance*, *Microvascular Research.*, 53, 54-64.
- Perutz, M. F. (1970), *Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin*, *Nature*, 228, 726-739.

- Quillin, M. L., Li, T., Olson, J. S., Phillips Jr, G. N et al. (1995), *Structural and Functional Effects of Apolar Mutations of the Distal Valine in Myoglobin*, J. Mol. Biol., 245, 416-436.
- Rachmilewitz, E. A., Peisach, J., Blumberg, W. E. (1971), *Studies on the Stability of Oxyhemoglobin A and Its Constituent Chains and Their Derivatives*, J. Biol. Chem., 246, 3356-3366.
- Raw, I., Freedman, A., Mennucci, L., *Bioquímica para as Ciências Biomédicas*, Ed. McGraw-Hill do Brasil, vol.1, 1981.
- Reed, C., Cheung, S. (1977), *On The Bonding of FeO₂ in Hemoglobin and Related Dioxygen Complexes*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74(5), 1780-1784.
- Riess, J. G., *Overview of Progress in the Fluorocarbon Approach to In Vivo Oxygen Delivery*, in: Blood Substitutes and Oxygen Carriers, Chang, T. M. S. (ed), Marcel Dekker, New York, 1993, 24-43.
- Rifkind, J. M., Abugo, O., Levy, A., Heim, J. (1994), *Detection, Formation and Relevance of Hemichromes and Hemochromes*, Meth. Enzym., 231, 449-480.
- Riggs, A. (1981), *Preparation of Blood Hemoglobins of Vertebrates*. Methods Enz., 76, 5-29.
- Ruf, H. H., Altemüller, A. G., Gersonde, K. (1994), *Preparation and Characterization of Insect Hemoglobins from Chironomus thummi thummi*, Meth. Enzym., 231, 95-111.
- Sadrzadeh, S. M. H., Graf, E., Panter, S. S., Hallaway, P. E., Eaton, J. W. (1984), *Hemoglobin: A Biologic Fenton Reagent*, J. Biol. Chem., 259, 14354-14356.
- Sakai, H., Hamada, K., Takeota, S., Nishide, H., Tsuchida, E. (1996), *Functional Evaluation of Hemoglobin- and Lipidheme-vesicles as Red Cell Substitutes*, Pol. Adv. Technol., 7, 639-644.
- Satoh, Y., Shikama, K. (1981), *Autoxidation of Oxymyoglobin: A Nucleophilic Displacement Mechanism*, J. Biol. Chem., 256, 10272-10275.
- Scholander, P. F. (1960), *Oxygen Transport through Hemoglobinn Solution*, Science, 131, 585-590.

- Scott, E. E., Paster, E. V., Olson, J. S. (2000), *The Stabilities of Mammalian Apomyoglobins Vary Over a 600-Fold Range and Can Be Enhanced by Comparative Mutagenesis*, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 27129-27136.
- Sekiguchi, S., *Oxygen-Transport and Solution properties of Poly lipid/Hb Vesicles*, in: *Blood Substitutes and Oxygen Carriers*, Chang, T. M. S. (ed), Marcel Dekker, New York, 1993, 167-176.
- Shikama K. (1984), *A Controversy on the Mechanism of Autoxidation of Oxymyoglobin and Oxyhaemoglobin: Oxidation, Dissociation, or Displacement?*, *Biochemical Journal*, 223, 279-280.
- Shikama K. (1998), *The Molecular Mechanism of Autoxidation for Myoglobin and Hemoglobin: A Venerable Puzzle*, *Chem. Rev.*, 98, 1357-1373.
- Smith, R. D. - *Correlations Between Bound n-Alkyl Isocyanide Orientations and Pathway for Ligand Binding in Recombinant Myoglobin*. PHD Thesis, Rice University, Houston/TX, USA, 1999.
- Snyder, S. R., Welty, E. V., Wlader, R. Y et al. (1987), *HbXL99 α : A Hemoglobin Derivative that is cross-linked between the α Subunits is Useful as a Blood Substitute*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 84, 7280-7284.
- Springler, B. A.; Sligar, S. G. *High Level Expression of Sperm Whale Myoglobin in Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 84, p. 8961-8965, 1987
- Standl, T., Horn, P., Wilhelm, S. et al. (1996), *Bovine Haemoglobin is more Potent than Autologous Red Blood Cells in Restoring Muscular Tissue Oxygenation after Profound Isovolaemic Haemodilution in Dogs*, *Can. J. Anaesth.*, 43, 714-723.
- Stryer, L., *Biochemistry*, 2nd ed., Yi Hsien Publishin Co., Taiwan, 1981.
- Sutton, H. C., Roberts, P. B., Winterbourn, C. C. (1976), *The Rate of Reaction of Superoxide Radical Ion with Oxyhaemoglobin and Methaemoglobin*, *Biochem. J.*, 155, 503-510.
- Takeoka, S., Ohgushi, T., Kose, T., Nishide, H., Tsuchida, E. (1997), *Construction of Artificial Methemoglobin Reduction Systems in Hb Vesicles*, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, 25, 31-41.

- Thorsteinsson, M. C., Bevan, D. R., Potts, M. (1999), *A Cyanobacterial Hemoglobin with Unusual Ligand Binding Kinetics and Stability Properties*, *Biochemistry*, 1999, 38, 2117-2126.
- Tobias, M. D. (1999), Hemoglobin Based Oxygen Carriers – Erythrocyte Substitutes, *Anesthesiology Online Journal*, janeiro. URL:
http://www.anesthesiologyonline.com/articles/onepage.cfm?chapter_id=19&journal=1
- Tsuchida, E., *Synthesis and Characterization of Artificial Red Cell (ARC)*, in: *Blood Substitutes and Oxygen Carriers*, Chang, T. M. S. (ed), Marcel Dekker, New York, 1993, 159-166.
- Tsuruga, M., Shikama, K. (1997), *Biphasic Nature in the Autoxidation Reaction of Human Oxyhemoglobin*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1337, 96-104.
- Vestling, C. S. (1942), *The Reduction of Methemoglobin by Ascorbic Acid*, *J. Biol. Chem.*, 143, 439-446.
- Vinogradov, S., Sharma, P. (1994), *Preparation and Characterization of Invertebrate Globin Complex*, *Meth. Enzym.*, 231, 112-124.
- Wallace, W. J., Houtchens, R. A., Maxwell, J. C., Caughey, W. S. (1982), *Mechanism of Autoxidation for Hemoglobins and Myoglobins: Promotion of Superoxide Production by Protons and Anions*, *The Journal of Biological Chemistry*, 257, 4966-4977.
- Wallace, W. J., Maxwell, J. C., Caughey, W. S. (1974), *The Mechanisms of Hemoglobin Autoxidation Evidence for Proton-Assisted Nucleophilic Displacement*, *Biochemical and Biophysical Research and Communications*, 57, 1104-1110.
- Wang, L. Takeoka, S., Tsuchida, E. et al. (1992), *Preparation of Dehydrated Powder of Hemoglobin Vesicles*, *Polym. Adv. Technol.*, 3, 17-21.
- Wang, D., Kreutzer, U., Chung, Y., Jue, T. (1997), *Myoglobin and Hemoglobin Rotational Diffusion in the Cell*, *Biophysical J.*, 73, 2764-2770.
- Waschke, K. F. e Frietsch, T. (1999), *Modified Haemoglobins and Perfluorocarbons*, *Curr. Opinion in Anaesthesiology*, 12, 195-202.

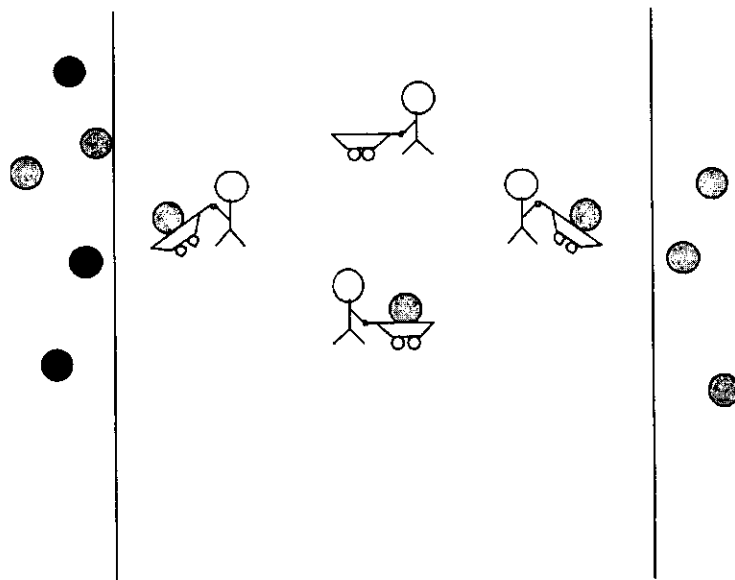
- Watkins, J. A., Kawanishi, S., Caughey, W. S. (1985), *Autoxidation Reactions of Hemoglobin A Free From Other Red Cell Components: A Minimal Mechanism*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 132, 742-748.
- Weiss, J. J. (1964), *Nature of the Iron-Oxygen Bond in Oxyhaemoglobin*, Nature, 4927, 83-84.
- Wever, R., Oudega, B. e Van Gelder, B. F. (1973), *Generation of Superoxide Radicals During the Autoxidation of Mammalian Oxyhemoglobin*, Biochim. Biophys. Acta, 302, 475-478.
- White, F. L. and Olsen, K. (1987), *Effects of Crosslinking on the Thermal Stability of Hemoglobin*, Arch. Biochem. Bioph., 258, 51-57.
- Winslow, R., Chapman, K. W. (1994), *Pilot-Scale Preparation of Hemoglobin Solutions*, Meth. Enzym., 231, 3-16.
- Wittenberg, J. (1966), *The Molecular Mechanism of Hemoglobin-facilitated Oxygen Transport*, J. Biol. Chem., 241, 104-114.
- Winterbourn, C. C., McGrath, B. M., Carrell, R. W. (1976), *Reaction Involving Superoxide and Normal and Unstable Haemoglobins*, Biochem. J., 155, 493-502.
- Yamamoto, H., Kayne, F. J., Yonetani, T. (1974), *Studies on Cobalt Myoglobins and Hemoglobins. II. Kinetic Studies of Reversible Oxygenation of Cobalt Myoglobins and Hemoglobins by the Temperature Jump Relaxation Method*, J. Biol. Chem., 249, 691-698.
- Yang, T., Olsen, K. W. (1991), *Thermal Stability of Hemoglobin Crosslinked in the T-State by Bis(3,5-Dibromosalicyl)Fumarate*, Bioch. Biophys. Res. Comm., 174(2), 518-523.
- Yang, T., Olsen, K. W. (1989), *The Effect of Crosslinking by Bis(3,5-Dibromosalicyl)Fumarate on the Autoxidation of Hemoglobin*, Biochim. Biophys. Res. Commun., 163, 733-738.
- Yonetani, T., Yamamoto, H., Woodrow, G. (1974), *Studies on Cobalt Myoglobins and Hemoglobins. I. Preparation and Optical Properties of Myoglobins and Hemoglobins Containing Cobalt Proto-, Meso-, and Deuteroporphyrins and Thermodynamic Characterization of Their Reversible Oxygenation*, J. Biol. Chem., 249, 682-690.

Zhang, L., Levy, A., Rifkind, J. M. (1991), *Autoxidation of Hemoglobin Enhanced by Dissociation into Dimers*, J. Biol. Chem., 266, 24698-24701.

Home Page do Departamento de Biologia Química da Michigan University. URL:

<http://www.med.umich.edu/biochem/bc550/cpack/hb/catalog.html>

MEMBRANAS PARA SEPARAÇÃO DE OXIGÊNIO



CONTEÚDO – CAPÍTULO 5

5.1 Introdução.....	118
5.2 Aspectos Teóricos	120
5.3 Transporte Facilitado de Oxigênio	124
5.4 Membranas Líquidas	125
5.4.1 Mecanismos de Transporte em Membranas Líquidas.....	128
5.5 Membranas com Transportador Fixo	131
5.6 Transportadores de Oxigênio	132
5.7 Separação O ₂ /N ₂	138
5.7.1 Membranas com Transportador Fixo	138
5.7.2 Membranas Líquidas	140
5.8 Estabilidade das Membranas	143
5.9 Membranas Líquidas Ultrafinas	145
5.10 Transportadores Naturais.....	145
5.11 Conclusões.....	146

T RANSPORTE FACILITADO

Este capítulo inicia com uma revisão dos principais conceitos envolvidos em permeação de gás através de membranas poliméricas. Em seguida, são apresentados os tipos de membranas de transporte facilitado, suas características, aplicações e vantagens, com ênfase no transporte seletivo do oxigênio. O papel do agente transportador é discutido, bem como os fatores que influenciam sua atuação. Por fim, é apresentada uma revisão da literatura, mostrando os resultados mais relevantes obtidos com membranas de transporte facilitado para separação de oxigênio.

5.1 INTRODUÇÃO

Genericamente falando, uma membrana pode ser definida como uma barreira que separa duas fases restringindo, total ou parcialmente, o transporte de uma ou mais espécies químicas presentes nas fases. Os processos de separação com membranas apresentam uma série de vantagens que os permitem competir com técnicas clássicas de separação:

- Economia de energia: Em geral, os processos com membranas não envolvem mudança de fase, sendo, portanto, energeticamente favoráveis.
- Seletividade: Característica comum aos processos com membranas, visto que a separação se dá por diferença entre as propriedades dos componentes, como tamanho, forma, carga elétrica, solubilidade, taxa de difusão.
- Condições amenas de operação: São geralmente conduzidos em temperatura

ambiente, sendo, por isso, indicados na separação de misturas com componentes termolábeis.

- Simplicidade de operação e escalonamento: Os sistemas empregados são modulares e os dados para dimensionamento de uma planta podem ser obtidos a partir de equipamentos pilotos com módulos de membrana de mesma dimensão dos utilizados industrialmente.

Nos processos com membrana a separação é atingida pela diferença nas taxas de transporte dos componentes. O grau de separação é governado pela habilidade da membrana em discriminar os diferentes componentes bem como pela força motriz relativa a cada componente.

O esquema de um típico processo com membrana para separação de gases é mostrado na Figura 5.1:

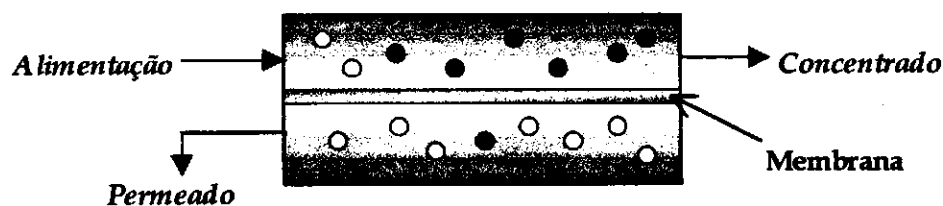
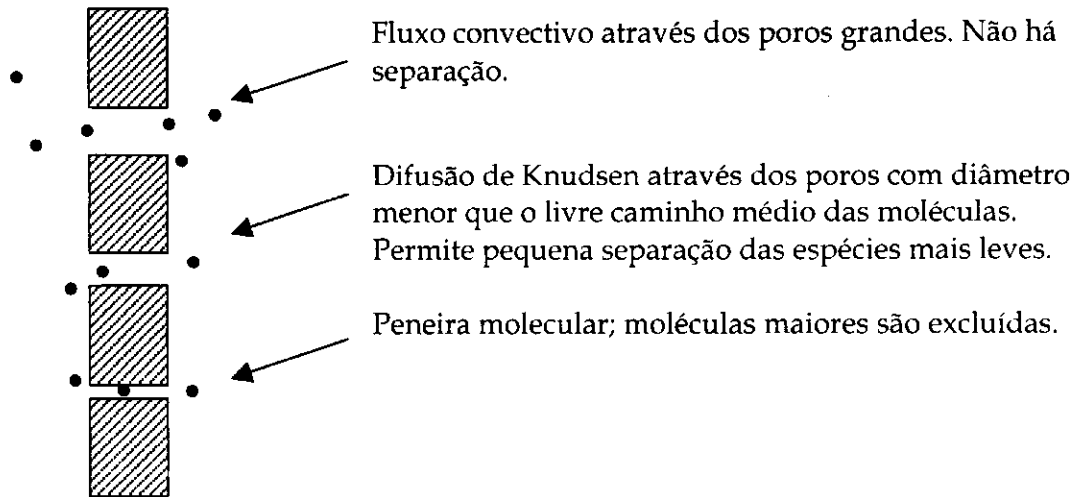


Figura 5.1: Representação esquemática do processo de separação de gases utilizando membrana.

O mecanismo de separação depende do tipo de membrana empregado, como pode ser visto na Figura 5.2 (Zolandz e Fleming, 1992).

Membranas porosas são sistemas bifásicos onde as moléculas dos gases pouco interagem com o material da membrana e transitam preferencialmente pelos poros desta por convecção e/ou difusão, dependendo da morfologia. As membranas porosas têm aplicação limitada na separação de gases, principalmente pela dificuldade em se controlar a distribuição de tamanho de poros e de problemas decorrentes da condensação de vapores de água nos poros, que afeta a taxa de transporte.

I) Membrana porosa:



II) Membrana densa:

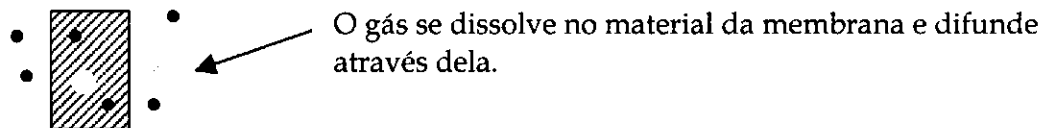


Figura 5.2: Mecanismos de transporte em membranas poliméricas.

As membranas comumente utilizadas em separação de gases são do tipo densa, isentas de poros ou canais detectáveis, nas quais o transporte ocorre pela dissolução seguida pela difusão das moléculas através da membrana (Zolandz e Fleming, 1992). A força motriz para a maioria dos processos de separação de gases usando membranas é o gradiente de pressão parcial.

5.2 ASPECTOS TEÓRICOS

A difusão de gás através de membranas não porosas é um processo movido pelo gradiente de concentração, que geralmente pode ser bem descrito pela primeira lei de Fick (Zolandz e Fleming, 1992), dada pela equação 5.1.

$$\mathbf{J} = -D\nabla c \quad (5.1)$$

Onde D é o coeficiente de difusão e c , a concentração local do gás.

Para difusão unidirecional através de uma membrana plana, a equação 5.1 pode ser escrita para a espécie i como:

$$J_i = -D(c_i) \frac{dc_i}{dx} \quad (5.2)$$

$D(c_i)$ indica que o coeficiente de difusão pode depender da concentração local da espécie i .

O coeficiente de permeabilidade é definido em termos do fluxo J_i calculado no estado estacionário, tendo como força motriz a diferença de fugacidade, normalizado pela espessura da membrana l ,

$$P_i = \frac{J_i}{\Delta f_i / l} \quad (5.3)$$

Para a maioria dos gases a pressões moderadas (<50 atm), a diferença entre fugacidade e pressão é pequena. Assim,

$$P_i = \frac{J_i}{\Delta p_i / l} \quad (5.4)$$

A unidade normalmente utilizada para P_i é Barrer, que equivale a 10^{-10} cm³(CNTP).cm/(cm.s.cmHg). A substituição de (5.3) em (5.2) resulta em uma expressão para a permeabilidade que pode ser reorganizada convenientemente para dar:

$$P_i = D_i S_i \quad (5.5)$$

S_i é o coeficiente de solubilidade para o componente i , uma grandeza de natureza termodinâmica, que é afetada pelas interações polímero-penetrante. O coeficiente de difusão D_i tem natureza cinética, e é determinado pela dinâmica polímero-penetrante.

A habilidade da membrana em separar diferentes componentes de uma mistura é caracterizada pelo fator de separação α :

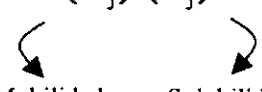
$$\alpha_{ij} = \frac{y_i / y_j}{x_i / x_j} \quad (5.6)$$

Onde x_i , y_i e x_j , y_j referem-se à fração molar de i e j na alimentação e no permeado, respectivamente. Na ausência de efeitos plastificantes, o fator de separação para uma mistura de gases pode ser aproximado pela razão entre as permeabilidades das espécies puras:


$$\alpha^*_{ij} = \frac{P_i}{P_j} \quad (5.7)$$

Inserindo (5.5) em (5.7), tem-se:

$$\alpha^*_{ij} = \left(\frac{D_i}{D_j} \right) \left(\frac{S_i}{S_j} \right) \quad (5.8)$$



Mobilidade
Relativa



Solubilidade
Relativa

Desta forma, para se obter uma membrana para separação de gases com seletividade adequada é necessário entender como a estrutura desta membrana irá afetar os dois componentes do fator de separação.

Em um elastômero, polímero que nas condições de operação está acima da sua temperatura de transição vítrea (T_g), a solubilidade de penetrantes de baixo peso molecular e em baixas concentrações pode ser descrita pela lei de Henry:

$$c = k_D p \quad (5.9)$$

Onde c é a concentração do gás no polímero, k_D é o coeficiente de Henry e p , a pressão do penetrante. Assim, a permeabilidade neste tipo de material polimérico pode ser dada por:

$$P = k_D D \quad (5.10)$$

No caso de um polímero vítreo, que nas condições de operação está abaixo da T_g , os movimentos são mais restritos, tornando-os mais seletivos quanto à forma e tamanho das moléculas do que os elastômeros. Por isso, em geral, os materiais vítreos apresentam menor permeabilidade, porém maior seletividade. A solubilidade de gases

neste tipo de material é mais complexa que no caso dos elastômeros. Uma isoterma de sorção típica pode ser vista na Figura 5.3

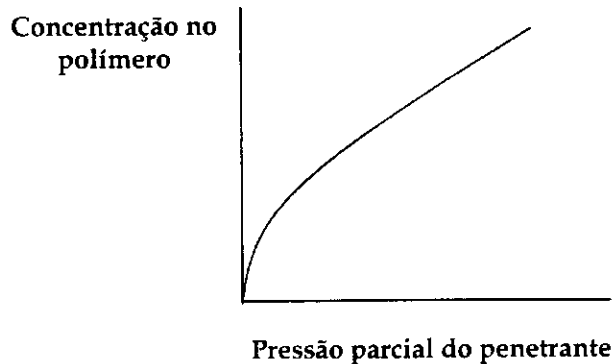


Figura 5.3: Forma típica de uma isoterma de sorção gás em polímero vítreo.

A solubilidade de gases em polímeros vítreos pode ser adequadamente descrita pelo modelo da dupla sorção. Esse modelo assume que o material tem duas regiões distintas: uma região com comportamento semelhante ao dos elastômeros, com solubilidade descrita pela lei de Henry, e uma outra região cuja solubilidade é devida à existência das microcavidades, descrita pela isoterma de sorção de Langmuir. A sorção total é dada pela soma desses dois termos, da seguinte forma:

$$c = k_D p + \frac{c'_H b p}{1 + b p} \quad (5.11)$$

Onde k_D , p e D são como antes, c'_H é a constante de capacidade de Langmuir e b é a constante de afinidade. A expressão da permeabilidade fica, então:

$$P = k_D D_D + \frac{c'_H b}{1 + b p} D_H \quad (5.12)$$

Onde D_D e D_H referem-se às mobilidades do componente dissolvido e de Langmuir, respectivamente.

5.3 TRANSPORTE FACILITADO DE OXIGÊNIO

O transporte seletivo de um componente através da membrana pela ação de agentes complexantes é denominado transporte facilitado. A reação de complexação na membrana gera outro mecanismo de transporte em adição à dissolução-difusão. A taxa total de transferência de massa de uma espécie é dada pela soma dos fluxos da espécie complexada e não complexada.

Existem três tipos gerais de membranas de transporte facilitado: membrana com transportador fixo, membrana de troca iônica com solvente e membrana líquida (Way e Noble, 1992).

As membranas com transportador fixo são filmes poliméricos contendo grupos funcionais reativos ligados à cadeia polimérica. A teoria para o mecanismo de transporte facilitado neste tipo de material é bastante controversa, já que não existe mobilidade do transportador. Em geral, a permeabilidade em membranas com transportador fixo é menor que em membranas líquidas, mas, por outro lado, não apresentam problemas de perda do transportador da membrana para as fases adjacentes.

As membranas de troca iônica com solvente são preparadas inchando um filme polimérico em solvente e introduzindo o agente transportador por difusão ou por meio de troca iônica. Como este é mantido por forças eletrostáticas, perdas só ocorrerão se ele for deslocado por outro íon presente na fase fluida. Outra vantagem é que a concentração de transportador na membrana pode ser bastante elevada já que esta não é limitada pela sua solubilidade, e sim, pela densidade de sítios de troca iônica.

Membranas líquidas são preparadas usualmente pela impregnação de um fino suporte microporoso com a solução contendo o transportador. Como a solução é mantida nos poros por forças capilares, precauções devem ser tomadas para evitar perdas de líquido da membrana.

O uso de membranas de transporte facilitado apresenta as seguintes vantagens em relação aos processos com membrana convencionais (Kemperman, 1995):

- ❖ Fluxos maiores podem ser obtidos pela presença do transportador;
- ❖ A natureza seletiva do transportador provê melhor seletividade do que quando o

processo é baseado apenas nas diferenças relativas de solubilidade e difusividade;

- ❖ Espécies, principalmente íons, podem ser transportadas mesmo contra seu gradiente de concentração;

Dentre os tipos de membrana de transporte facilitado acima apresentadas, membranas líquidas parecem ser a melhor solução para os problemas de baixo fluxo e seletividade que exibem as membranas poliméricas convencionais na separação oxigênio/nitrogênio. Isto porque a permeabilidade de um gás na fase líquida é sempre mais elevada que em materiais sólidos. A permeabilidade, como definida na equação (5.5) é o produto da difusividade e solubilidade na membrana. Enquanto os valores da solubilidade de gases em sólidos amorfos e líquidos são comparáveis, a difusividade de gases em líquidos é da ordem de 10^{-6} a 10^{-5} cm^2/s , muito superior àquela típica de materiais sólidos, em torno de 10^{-8} cm^2/s .

Estes e outros aspectos importantes sobre membranas líquidas serão discutidos a seguir.

5.4 MEMBRANAS LÍQUIDAS

Uma membrana líquida pode ser definida como um filme líquido delgado que geralmente separa dois líquidos miscíveis ou dois gases e que controla a transferência de massa entre as duas fases (Kemperman, 1995).

O tipo mais comum de uma membrana líquida para separação de gases, denominada membrana líquida imobilizada (MLI) pode ser vista na Figura 5.4.



Figura 5.4: Membrana líquida imobilizada em um filme microporoso.

Outro tipo são as membranas líquidas contidas entre feixes de fibras ocas (MLC). Neste tipo de membrana, as correntes da alimentação e do produto circulam no interior das fibras enquanto a fase líquida contendo o transportador (a membrana líquida propriamente dita) é mantida no lado externo. Em geral o material da fibra é tal que esta

fase líquida não molha os poros do suporte e a interface líquido/gás fica estagnada no diâmetro externo das fibras. Este tipo de membrana está ilustrado na Figura 5.5 (Majundar et al., 1988). A Figura 5.6 mostra a disposição das fibras e da membrana líquida em um permeador (Way e Noble, 1992).

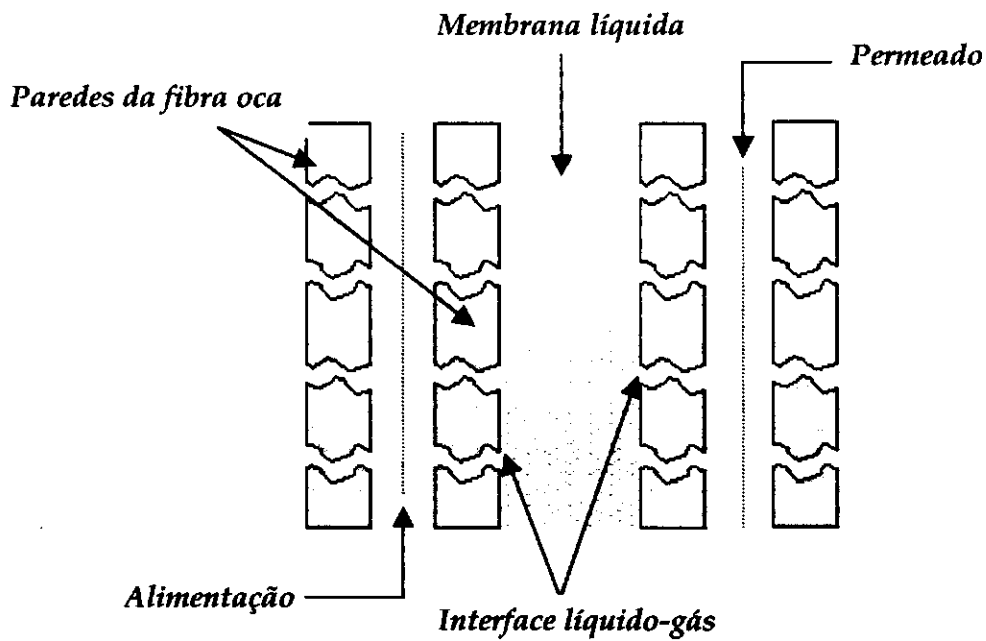


Figura 5.5: Membrana líquida contida em fibras ocas.

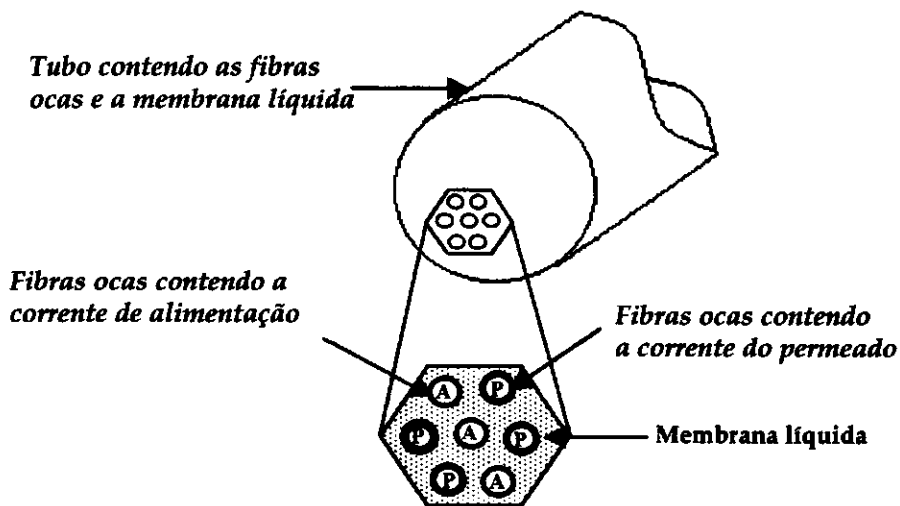


Figura 5.6: Configuração de uma membrana líquida contida em fibras ocas em um permeador.

As membranas líquidas contidas (MLC) apresentam algumas vantagens em relação às imobilizadas (MLI):

- Em caso de deterioração ou envenenamento do transportador, a membrana líquida é facilmente substituída;
- O contato entre as correntes de alimentação e produto dificilmente ocorre, já que a distância entre elas é maior;
- A membrana líquida pode ser recirculada pelo permeador, diminuindo a resistência à transferência de massa. Além disto, havendo perdas por evaporação do solvente da membrana, este pode ser automaticamente repostado;
- A porosidade e a tortuosidade dos poros geralmente não afetam o fluxo do gás;

A desvantagem da MLC é que a espessura da membrana líquida é bem maior que no caso das MLI, sendo tanto maior quanto menor a densidade de empacotamento. Espessuras de 100 a 500 μm podem ser obtidas, dependendo do diâmetro da fibra e da densidade de empacotamento.

Especial atenção deve ser dada às condições de operação do sistema quando se empregam membranas líquidas imobilizadas. Como o líquido é mantido nos poros do suporte por forças capilares, a diferença de pressão através da membrana é um importante fator que afeta a sua estabilidade. Acima de um valor crítico, chamado ΔP_{cr} , a fase impregnante é expulsa dos poros do suporte. Considerando o suporte microporoso como um conjunto de poros cilíndricos paralelos de raio r_p , a pressão crítica pode ser obtida pela equação de Laplace-Young:

$$\Delta P_{cr} = \frac{2\sigma}{r_p} \cos \theta \quad (5.13)$$

Onde σ é a tensão superficial do líquido e θ , o ângulo de contato medido a partir da parede do poro tangenciando a interface líquido gás. Zha et al. (1992) obtiveram expressões que permitem calcular a pressão crítica em membranas com poros irregulares, visto que as únicas membranas comerciais com poros cilíndricos são Anapore[®] e Nucleopore[®].

O uso de solventes com elevada tensão superficial em suportes com tamanho de poro reduzido minimiza o problema de expulsão do líquido do suporte.

5.4.1 Mecanismos de Transporte em Membranas Líquidas

O transporte em uma membrana líquida pode ser do tipo passivo ou facilitado. Nas membranas de transporte simples, o líquido está isento de transportador. A seletividade, neste caso, é uma função das diferenças de permeabilidade que, por sua vez, dependem da difusividade e solubilidade das espécies no meio líquido. Como oxigênio e nitrogênio têm aproximadamente o mesmo diâmetro molecular, pela equação de Stokes-Einstein os mesmos apresentam valores comparáveis de difusividade. Logo as diferenças de permeabilidade são devidas principalmente às diferenças de solubilidade dos dois gases na membrana (Baker et al., 1987).

Nas membranas de transporte facilitado, a presença do transportador provoca um aumento tanto na seletividade quanto na taxa de transporte da membrana. A seletividade aumenta porque a reação de complexação é específica, sem efeito algum sobre espécies não-complexadas. O incremento na taxa de transporte é causado pelo maior gradiente de concentração da espécie através da membrana, consequência do aumento da solubilidade pela reação de complexação. Com o transporte facilitado é possível transferir espécies mesmo contra seu gradiente de concentração, através do transporte acoplado de espécies. Na Figura 5.7 estão ilustrados os mecanismos de transporte descritos.

Em se tratando de separação oxigênio/nitrogênio, o transporte de interesse é do tipo facilitado simples. O processo pode ser dividido nas seguintes etapas: o transportador liga-se ao oxigênio na interface com a alimentação, o complexo transportador-oxigênio difunde através da membrana e libera o oxigênio na corrente do permeado, difundindo-se de volta para complexar mais moléculas. Como o transportador é específico para o oxigênio, a taxa de transporte deste é aumentada sem influência sobre o transporte de nitrogênio, resultando em um enriquecimento do permeado significativamente maior do que seria possível na ausência do transportador (Johnson et al., 1987). A Figura 5.8 ilustra o transporte preferencial do oxigênio em uma membrana líquida contendo transportador.

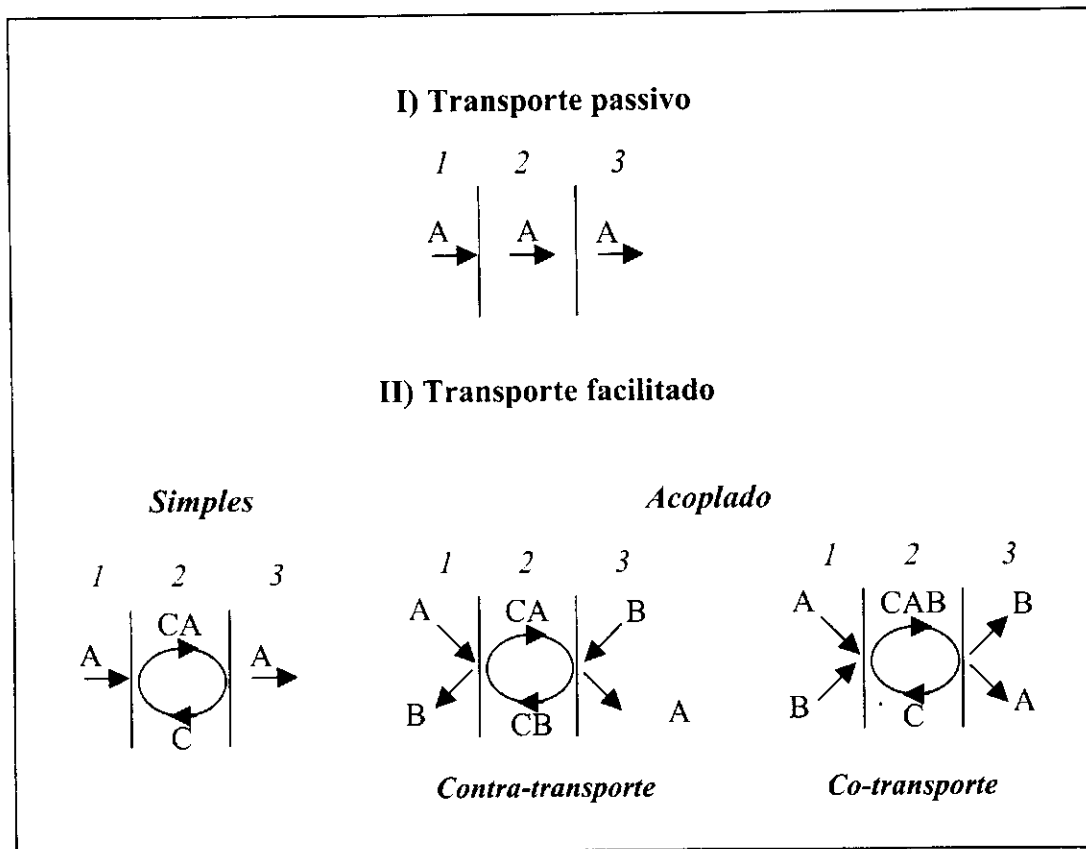


Figura 5.7: Mecanismos de transporte em membranas líquidas. Números:1- alimentação; 2- membrana líquida; 3- permeado. Letras: A e B- componentes da mistura; C- transportador; CA, CB e CAB- complexos do transportador com os componentes.

O fluxo total do oxigênio é o resultado do fluxo do complexo gás-transportador mais o fluxo das moléculas não complexadas. Quando a reação química é instantânea na interface gás/membrana líquida, o processo é controlado pela difusão. Neste caso, o fluxo facilitado é inversamente proporcional à espessura da membrana e pode ser continuamente aumentado com a diminuição da espessura da membrana (Johnson et al., 1987). O fluxo total do oxigênio é dado por:

$$J_{O_2} = \frac{D_{O_2} \Delta c_{O_2}}{\Delta x} + \frac{D_{C-O_2} \Delta c_{C-O_2}}{\Delta x} \tag{5.14}$$

Onde D é a difusividade na membrana líquida, Δc_{O_2} e Δc_{C-O_2} , a diferença de concentração através da membrana do oxigênio dissolvido e do complexo transportador-oxigênio, respectivamente, e Δx , a espessura da membrana.

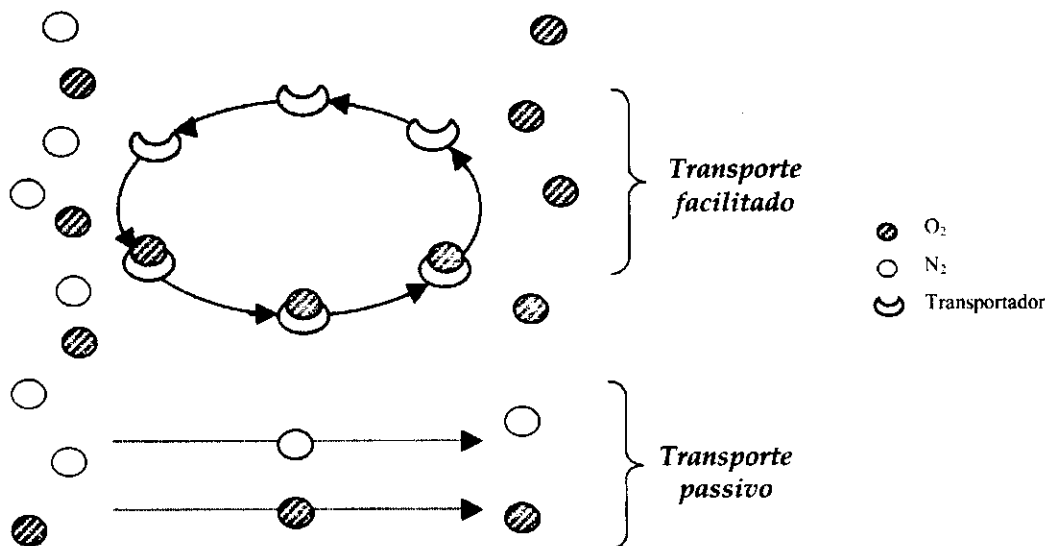


Figura 5.8: Representação do transporte de oxigênio em uma membrana líquida. O fluxo total é a soma dos termos do transporte facilitado e do transporte passivo.

O transportador atua em resposta a um gradiente de concentração, alternando entre as formas oxi e desoxi, conforme ele esteja ou não ligado ao oxigênio, respectivamente. A concentração do complexo transportador-oxigênio na membrana líquida $[C-O_2]$ a uma determinada temperatura é dada pela isoterma de Langmuir:

$$[C - O_2] = \frac{[C]_0 K_{O_2} P_{O_2}}{1 + K_{O_2} P_{O_2}} \tag{5.15}$$

Onde $[C]_0$ é a concentração do transportador na membrana líquida, P_{O_2} , a pressão parcial do oxigênio no lado da alimentação e K_{O_2} , com já mencionado, a constante de equilíbrio da reação de ligação com o oxigênio.

A permeabilidade do oxigênio na membrana líquida é geralmente bem descrita pelo modelo da dupla sorção, de acordo com o esquema de Figura 5.8, que tem a seguinte equação:

$$P_{O_2} = kD_{O_2} + \frac{[C]_0 K_{O_2} D_c}{1 + K_{O_2} P_{O_2}} \tag{5.16}$$

k e D_{O_2} são, respectivamente, a solubilidade e difusividade do oxigênio na membrana

líquida, e D_c é a difusividade do transportador.

A Figura 5.9 ilustra a dependência entre a permeabilidade da membrana e a pressão parcial de oxigênio, descrita pela equação 5.16. Para pressões parciais de O_2 mais baixas, a solubilidade desse gás na fase líquida é aumentada grandemente pela presença do transportador e, assim, o termo facilitado contribui com uma parcela maior para a permeabilidade total do oxigênio. Para valores suficientemente elevados de pO_2 , todos os sítios de ligação do transportador estarão ocupados, atingindo-se, assim, uma condição de saturação. A partir desse ponto, PO_2 vai tender assintoticamente ao valor da permeabilidade do oxigênio na solução na ausência do transportador, descontado o efeito da viscosidade da solução.

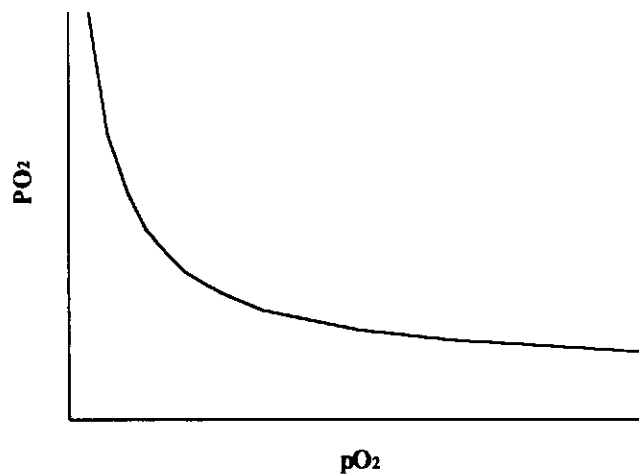


Figura 5.9: Representação da dependência entre a permeabilidade da membrana e a pressão parcial de oxigênio na alimentação, de acordo com o modelo da dupla sorção.

5.5 MEMBRANAS COM TRANSPORTADOR FIXO

Como já mencionado anteriormente, outro tipo de membrana de transporte facilitado são as membranas com transportador fixo, que consistem de filmes poliméricos aos quais são incorporados os agentes complexantes. Nestas, a fase líquida está ausente, o que contribui para aumentar a estabilidade do sistema, mas, por outro lado, representa um limite ao transporte facilitado, já que não há mobilidade do agente complexante.

O mecanismo de transporte facilitado neste sistema difere daquele presente em membranas líquidas, nas quais o complexo transportador-oxigênio se difunde através

da membrana. Nishide et al. (1990) propuseram que o mecanismo de transporte também pode ser bem descrito pelo modelo da dupla sorção. Neste caso, a equação 5.16 é acrescida de outros termos visando levar em conta as alterações entre o modo de transporte passivo e facilitado. A Figura 5.10 ilustra o transporte em uma membrana com transportador de acordo este modelo.

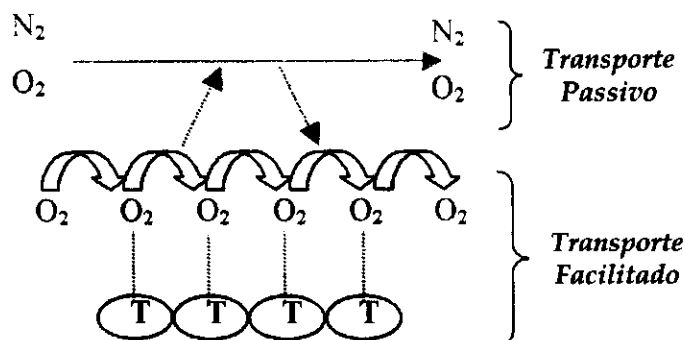


Figura 5.10: Representação esquemática do transporte facilitado de oxigênio em uma membrana com transportador fixo.

Noble (1990) derivaram um modelo matematicamente equivalente ao da dupla sorção, mas considerando uma mobilidade intersegmental das cadeias poliméricas juntamente com os sítios de ligação. Uma descrição exata deste transporte, no entanto, ainda é objeto de estudo e outros modelos têm sido propostos (Barnes et al., 1988, Noble, 1990, Delaney, 1990, Suzuki et al., 1995).

5.6 TRANSPORTADORES DE OXIGÊNIO

Transportadores adequados para uso em membranas de transporte facilitado devem possuir as seguintes características principais: ligar-se rápida e reversivelmente ao oxigênio em temperaturas e pressões moderadas; apresentar alta solubilidade no solvente da membrana; ser estável, com resistência à oxidação irreversível (Johnson et al., 1987). Em geral, os transportadores de oxigênio utilizados são compostos organometálicos com a parte orgânica da molécula ligada a metais de transição, mais comumente ferro e cobalto. Para que ocorra ligação reversível entre o oxigênio e o transportador é necessário que o íon metálico possa existir em mais de um estado de oxidação. Além disso, a energia de ligação entre as moléculas de oxigênio e de

transportador deve assumir um valor intermediário para ser efetiva. Se a ligação for muito fraca, haverá baixa sorção do gás no lado da alimentação e o fluxo através da membrana será prejudicado. Por outro lado, ligações muito fortes dificultam a liberação do gás no lado do permeado, o que também afeta negativamente o transporte. A região de trabalho adequada é mostrada na Figura 5.11.

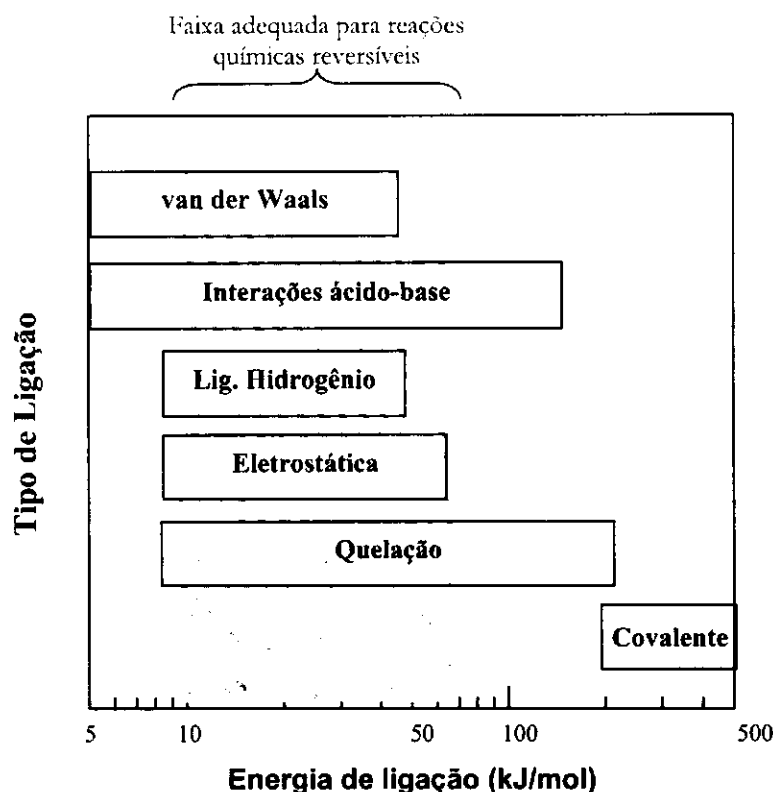
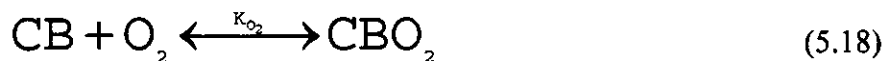


Figura 5.11: Valores da energia de ligação para reações de complexação comuns em processos de separação (Johnson et al., 1987).

A reação de ligação do oxigênio ao transportador geralmente produz um complexo 1:1, segundo a equação abaixo:



Onde CB é o complexo metálico com a base axial, CBO₂, o complexo oxigenado, e K_{O₂}, a constante de equilíbrio da reação de ligação com o oxigênio, que é uma medida da afinidade pelo oxigênio (Johnson et al., 1987).

Schultz e colaboradores (Johnson et al., 1987) mostraram que existe uma afinidade pelo

oxigênio ótima, função das pressões no lado da alimentação (p_1) e do permeado (p_2), dada pela equação 5.19. Transportadores que apresentem este grau de afinidade seriam os mais adequados ao uso em transporte facilitado.

$$K_{\text{oxi}}^{-1} = \sqrt{p_1 p_2} \quad (5.19)$$

Uma grande variedade de compostos sintéticos que ligam reversivelmente o oxigênio tem sido estudada. A estrutura das moléculas transportadoras, em sua maioria, guarda semelhanças com o grupo heme, um organometálico presente na hemoglobina e responsável pelo transporte de oxigênio na maioria dos seres vivos (Rodwell, 1996).

O metal presente na hemoglobina é o ferro, mas outros elementos como cobalto, irídio e ródio também formam complexos coordenados reversíveis com o oxigênio (Kaim e Scwedrski, 1994). Os compostos sintéticos são formados geralmente por um centro metálico complexado com um ligante que pode ser uma base de Schiff, uma porfirina ou similares (Way e Noble, 1992). Um típico transportador de oxigênio é apresentado na Figura 5.12.

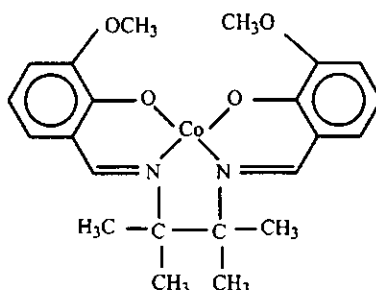


Figura 5.12: Estrutura química de um transportador de oxigênio do tipo base de Schiff-cobalto, conhecido como Co(3-MeoSaltmen).

Em geral, o metal possui dois sítios de ligação, um acima e outro abaixo do plano da molécula. Para que a ligação com o oxigênio ocorra, é necessário que o metal central tenha a sua quinta posição de coordenação ligada a um átomo doador de elétrons; usualmente este quinto elemento, que é chamado de base axial por sua posição em relação ao plano da molécula, é suprido por uma base de Lewis (Way e Noble, 1992).

O efeito de algumas variáveis no transporte facilitado de O_2 pelo transportador tem sido estudado, sendo os principais deles comentados a seguir.

Efeito do Solvente

É desejável que o solvente possua boa seletividade ao O₂, mesmo na ausência do transportador. Dados para alguns solventes podem ser vistos na Tabela 5.1 (Baker et al., 1987). O fluido Dow Corning 200 é um óleo de silicone com viscosidade de 0,82 cP que oferece uma permeabilidade quase 5 vezes maior que a membrana de polidimetilsiloxano. Já o Dow Corning 360 tem viscosidade igual a 19 cP, apresentado, por isso, uma permeabilidade bem inferior. A solubilidade do oxigênio em óleo de silicone é pelo menos o dobro daquela em líquidos perfluorcarbono (Way e Noble, 1992, Leung et al., 1997).

Tabela 5.1: Dados de permeação para o oxigênio em diferentes solventes a 25 °C (Baker et al., 1987).

<i>Líquido</i>	<i>Permeabilidade (Barrer)</i>	<i>Seletividade O₂/N₂</i>
Mediflor FC-47 *	560	1,8
Dow Corning 200 **	3000	1,7
Dow Corning 360 **	530	1,9
NMP	109	2,1
DMAC	240	1,9
Butirolactona	160	1,9
DMSO	56	2,3
Etilenoglicol	14	3,4
Água	70	1,8
Glicerol	91	3,8

*Óleo mineral

**Óleo de silicone

Outras características desejáveis são baixa volatilidade, reduzida viscosidade, boa molhabilidade e compatibilidade química com o suporte (Baker et al., 1987). O uso de solvente com alta polaridade também são mais indicados, uma vez que solventes com baixa polaridade podem favorecer a formação de complexos 2:1, nos quais uma molécula de oxigênio encontra-se irreversivelmente ligada a duas moléculas do transportador, o qual perde a habilidade de transportar o O₂. Além disso, solventes próticos favorecem a autoxidação irreversível do metal, uma vez que os prótons liberados em solução são competidores eletrofílicos com relação ao metal,

enfraquecendo sua ligação com o oxigênio (Kaim e Scwedrski, 1994). Os detalhes dos mecanismos de oxidação foram discutidos anteriormente no Capítulo 3.

A formação dos peroxo-dímeros pode ser evitada criando-se uma barreira acima do plano de ligação do metal, de forma a proteger a molécula do oxigênio (Ward et al., 1981). Este tipo de arranjo está presente na molécula da hemoglobina, onde resíduos de aminoácidos localizados próximo ao grupo heme impedem a aproximação de outras moléculas (Kaim e Scwedrski, 1994).

Efeito da Concentração do Transportador

O aumento da concentração do transportador resulta, inicialmente, em um incremento na permeabilidade simplesmente porque mais transportador fica disponível para transportar o O₂. No entanto, verifica-se muitas vezes que concentrações elevadas afetam negativamente a permeabilidade. No caso de membranas líquidas, isto ocorre pelo aumento na viscosidade da solução com conseqüente diminuição na difusividade do oxigênio. Em membranas com transportador fixo, concentrações muito elevadas provocam alterações na temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero resultando em redução na sua permeabilidade (Suzuki et al., 1994, Chen e Lai, 1996).

Efeito da Temperatura

Em membranas poliméricas convencionais, a permeabilidade geralmente aumenta com a temperatura, enquanto que a seletividade permanece inalterada, ou mesmo, diminui. Em membranas de transporte facilitado, a temperatura também afeta a permeabilidade do O₂, já que a constante de equilíbrio obedece a equação de Arrhenius:

$$\ln K_{O_2} = \ln A - \frac{\Delta H}{RT} \quad (5.20)$$

Onde **A** é uma constante e ΔH é a entalpia de formação do complexo.

Como já mencionado, a afinidade pelo O₂ não deve assumir valores extremos, de forma que haverá um valor ótimo de **K_{O2}** para o qual a permeabilidade será máxima. A seletividade, no entanto, tende a diminuir com o aumento da temperatura visto que o

transporte passivo do N_2 é favorecido (Suzuki et al., 1995).

Efeito da Pressão

O efeito da diferença de pressão através da membrana é previsto pelo modelo da dupla sorção. Com o aumento da pressão no lado da alimentação, o termo de Henry torna-se mais importante, diminuindo a influência do transporte facilitado. Como consequência, a permeabilidade tende a diminuir. Do mesmo modo, se a pressão no lado do permeado é aumentada, menos O_2 é desorvido, resultando em uma menor permeabilidade (Tsuchida et al., 1987, Suzuki et al., 1995, Aoki et al., 1996).

Efeito da Base Axial

No caso de membranas líquidas, a base axial pode ser suprida à solução da membrana como um aditivo ou pode ser o próprio solvente. Algumas das bases de Lewis normalmente empregadas são 1-metilimidazola, 2-metilimidazola, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), 1-metilpirrolidona (NMP), piridina (Pi) e cianopiridina (CP).

A presença da base axial é essencial à reação de complexação, já que afeta diretamente a ligação do O_2 . Desta forma, espera-se que diferentes bases tenham efeitos diversos na afinidade pelo O_2 (Park et al., 1998). Tsuchida et al. (1987) utilizaram membranas de CoS fixo em polioctilmetacrilato com imidazola ou piridina como base axial. Observaram que a imidazola aumentou a afinidade da membrana por ser uma base mais forte que a piridina. Johnson et al. (1987) também observaram diferenças significativas na permeabilidade de uma membrana líquida contendo Co(3-MeoSaltmen) quando diferentes bases axiais foram testadas.

A seguir, será apresentada uma revisão da literatura sobre os principais resultados obtidos na separação de oxigênio e nitrogênio com membranas de transporte facilitado.

5.7 SEPARAÇÃO O₂/N₂

Foi Tsumaki, em 1938, quem primeiro observou a propriedade dos complexos base de Schiff-cobalto de ligar reversivelmente o oxigênio molecular. A partir desta descoberta, vários outros compostos têm sido amplamente estudados e utilizados como transportadores de O₂.

O primeiro trabalho sobre transporte facilitado de oxigênio em membranas líquidas foi feito por Scholander (1960). Neste trabalho, um suporte microporoso de acetato de celulose foi impregnado com uma solução de hemoglobina. Wittenberg deu continuidade a esta linha de pesquisa, estudando o mecanismo de difusão facilitada do oxigênio neste tipo de membrana (Wittenberg, 1966). Posteriormente, Bassett e Schultz, em 1970, realizaram o primeiro trabalho utilizando um transportador sintético, o bis(histidine)-Co(II) (Johnson et al., 1987). Desde então, um grande número de estudos envolvendo a permeação seletiva de oxigênio e nitrogênio em membranas de transporte facilitado tem sido conduzido.

Os derivados da porfirina também são indicados ao uso como transportador, visto que a reação com o O₂ é quase instantânea, o que torna o processo limitado pela difusão (Chen et al., 1997). A seguir, serão apresentados os resultados mais relevantes encontrados na literatura, obtidos com o uso desses transportadores em membranas de transporte facilitado.

5.7.1 Membranas com Transportador Fixo (MCTF)

A maior parte dos trabalhos publicados com membranas de transporte facilitado para separação do O₂ é da autoria de Nishide, Tsuchida e co-autores (vide Tabela 5.1). Este grupo pesquisa membranas de poliaquilmetracilatos contendo cobalto ligado a porfirinas ou bases de Schiff, com desempenhos expressivos em termos de permeabilidade e seletividade.

As melhores seletividades são geralmente observadas a baixas pressões na alimentação, pois nestas condições o transporte pelo transportador torna-se mais significativo que o transporte passivo do gás. Para contornar este problema, em um dos trabalhos Nishide et al. (1987) utilizaram uma membrana de PBMA contendo o transportador fixo CoP,

aderida a uma segunda membrana de PHMA, que apresenta uma baixa solubilidade do O₂. A face recoberta com PHMA foi disposta no lado de maior pressão, de modo a diminuir a influência da parcela de Henry no transporte. Uma seletividade igual a 12 foi conseguida para pressão de 50 mmHg. A seletividade sem a presença da segunda membrana foi de 4,7. Entretanto, a permeabilidade caiu bastante, para algo em torno de 10⁻¹ Barrer.

Aoki et al. (1996) obtiveram valores de permeabilidade relativamente elevados em pressão atmosférica, em torno de 110-290 Barrer, empregando uma base de Schiff com cobalto, CoS. A seletividade, no entanto, foi de 3,4-4,0.

Membranas de policarbonato têm sido estudadas por Chen, Lai e co-autores. Estas apresentam, em geral, boa resistência mecânica, e uma razoável seletividade de 8 em temperatura ambiente; a permeabilidade do O₂, contudo, não é satisfatória, sendo inferior a 1 Barrer (Chen e Lai, 1996). O grupo tem realizado trabalhos no sentido de aumentar a permeabilidade destas membranas sem comprometer a sua seletividade, incorporando transportadores do tipo Base de Schiff-cobalto.

Utilizando o transportador CoS a 35°C, eles conseguiram uma melhora na permeabilidade da membrana, que passou de 0,96 Barrer, no polímero puro, para 1,65 Barrer, na presença do transportador. A seletividade, no entanto, permaneceu praticamente inalterada. Com outro transportador a 5 °C, a seletividade aumentou significativamente, de 8,8 para 15. No entanto, a permeabilidade continuou igual à do polímero puro. A preparação da membrana pela técnica de inversão de fases resultou em uma estrutura altamente porosa, possibilitando o aumento da permeabilidade mas a seletividade, por outro lado, foi comprometida (Chen et al., 1997).

Posteriormente (Chen et al., 2000), o mesmo transportador foi utilizado em membranas de poliuretano. Este polímero apresenta boas propriedades mecânicas, estabilidade térmica, resistência química e uma considerável permeabilidade de 32 Barrer. A presença do CoS na membrana possibilitou um aumento na seletividade de 2,5 para 4, mas a permeabilidade foi reduzida a 3,1 Barrer.

O transportador CoS foi também utilizado por He et al. (1998), desta vez numa matriz de polidimetilsiloxano, que apresenta naturalmente uma boa permeabilidade ao O₂. No entanto, nenhum resultado expressivo foi obtido. O polímero puro apresentava

permeabilidade igual a 590 Barrer e seletividade de 2. Na presença do transportador e na melhor condição de operação, uma permeabilidade de 600 e uma seletividade de 2,2 foram obtidas.

Wang et al. (2000) preparam membranas de um copolímero de metilmetacrilato (MMA) e butilacrilato (BA) contendo Co^{2+} , obtendo seletividades entre 2,2 e 10 e permeabilidades na faixa de 26 a 260 Barrer, dependendo da temperatura, pressão de alimentação e concentração de transportador utilizadas. Na Tabela 5.2, para efeito de comparação, apenas o resultado a 35 °C foi apresentado.

Na Tabela 5.2 a seguinte notação foi utilizada: O_2 : permeabilidade do oxigênio em Barrer, α : seletividade (PO_2/PN_2), p_1 : pressão de O_2 na alimentação, p : pressão total, no caso de alimentação de ar, T : temperatura, $[\text{C}]_0$: concentração do transportador

5.7.2 Membranas Líquidas (ML)

Como pode ser visto na Tabela 5.3, um número bem menor de trabalhos empregando membranas líquidas tem sido publicado, comparativamente àquele envolvendo membranas com transportador fixo. Isto se deve, principalmente, à falta de estabilidade exibida pelos transportadores em solução, que será considerada no item 5.8.

Os resultados obtidos por Pez e Carlin (1986), Bellobono et al. (1987) e Kazuhiro et al. (1989) foram retirados de Noble e Way (1992), de forma que alguns dados estão incompletos por não terem sido fornecidos na mencionada referência.

O trabalho de Scholander, em 1960, foi o pioneiro em membrana líquida para separação de oxigênio. A seletividade de 14 encontrada por ele dava indícios de que a hemoglobina poderia ser um bom transportador de oxigênio também em soluções *ex-vivo*. Muitos outros trabalhos se sucederam empregando transportadores sintéticos que mantinham semelhança com o grupo heme da hemoglobina. Posteriormente, Chen et al. (1996) voltaram a utilizar a hemoglobina em soluções aquosas e obtiveram excelentes resultados em temperatura ambiente. Nenhuma observação foi feita quanto à estabilidade química da molécula, no entanto.

Tabela 5.2: Desempenho de membranas com transportador fixo na separação O₂/N₂.

Referência	Transportador	Suporte	Resultados α PO ₂		Condições de operação	
Nishide	Nishide et al. (1986)	CoP	PBMA	12	23	p ₁ = 5 mmHg T = 25 °C [C] ₀ = 4,5 %
	Tsuchida et al. (1987)	CoS	POMPpy	15	14,7	p ₁ = 10 mmHg T = 35 °C [C] ₀ = 2,5 %
	Nishide et al. (1987)	CoP	PBMA	4,7	10	p ₁ = 50 mmHg T = 25 °C
			PBMA/PHAM	2	0,1	[C] ₀ = 2,5 %
	Nishide et al. (1988)	COMP	HM	2,5	21	p ₁ = 200 mmHg T = 30 °C [C] ₀ = 0,17 %
	Nishide et al. (1990)	COP	POMIm	3, 4	26	p ₁ = 100 mmHg T = 45 °C [C] ₀ = 1,3 %
	Suzuki et al. (1995)	CoP CoM ₃ P CoE ₃ P CoB ₃ P	POMIm	4	18-26	p ₁ = 200 mmHg T = 45 °C [C] ₀ = 1,3 %
Suzuki et al. (1996)	COP	POMIm	10	50	p ₁ = 5 mmHg T = 25 °C [C] ₀ = 2 %	
Chen	Chen et al. (1996)	CoS	Policarbonato	15	0,34	p = 1 atm T = 5 °C [C] ₀ = 3 %
	Ruaan et al. (1997)	CoSalPr	Policarbonato	6,9	1,65	p = 1 atm T = 35 °C [C] ₀ = 3 %
	Chen et al. (1997)	CoS/CoSb	Policarbonato (+ 15 % de DMF)	5,2	0,4 (GPU) *	T = 35 °C [C] ₀ = 3,6 %
	Chen et al. (2000)	CoS	Poliuretano	4	3,1	p = 1 atm T = 35 °C [C] ₀ = 5 %
Outros	Aoki et al. (1996)	CoS	Poliazometino	3,4-4	110-290	p = 1 atm T = 25 °C
	Hsiue et al. (1996)	CoS ₃	ESBS	6,5	30	p ₁ = 50 mmHg T = 30 °C
	He et al. (1998)	CoS/CoST	PDMS	2,2	600	p = 1 atm T = 20 °C PDMS
			EC	3,7-4,1	14	T = 30 °C EC [C] ₀ = 4 %
Wang et al. (2000)	Cobalto ²⁺	Poli(EDTA-MMA-BA)	7,2	130	p ₁ = 0,2 K/cm ² T = 30 °C [C] ₀ = 1,5 %	

* Neste caso foi dada a permeância, P/l, em GPU = 10⁻⁶ cm³(CNTP)/(cm².s.cmHg)

O nome completo dos compostos e solventes abreviados nas Tabelas 5.2 e 5.3 pode ser consultado no final deste capítulo.

Tabela 5.3: Desempenho de membranas líquidas na separação oxigênio/nitrogênio.

Referência	Transportador	Suporte	Resultados		Condições de operação
			α	PO_2	
Scholander (1960)	Hemoglobina em Água	Celulose	14	-	$p_1 = 13$ mmHg $T = 25$ °C
Kawakami et al. (1982)	Cu(SCN) em Tetren	PTFE	20	-	$p_1 = 20$ mmHg $T = 40$ °C
Pez e Carlin (1986)	NaNO ₃ ou LiNO ₃ fundidos	Tela de metal	79	1110	$T = 528$ °C
Johnson et al. (1987)	Co(3-eoSaltmen) em BLO ou NMP	Ultipor: nylon-6,6	7,4	200	$p = 1$ atm $T = 25$ °C $[C]_o = 0,4$ M
Bellobono et al. (1987)	CoS em DMF	Epoxidiacrilato sobre celulose	50	-	$T = 70$ °C
Kazuhiro et al. (1989)	HistidinaCo(II) em etilenoglicol	PVDF	25	0,31 (GPU)	-
	HistidinaCo(II) em água	PVDF	4	0,24 (GPU)	-
Chen et al. (1996)	Hemoglobina em água	Celgard: PP e PE	18	620	$p_1 = 5,4$ mmHg $T = 25$ °C $[C]_o = 12,8$ %
Chen et al. (1997)	CoP em 4-metilanisola	Nitrocelulose	10	1000	$P_1 = 38$ mmHg $T = 10$ °C $[C]_o = 10$ %

$$* 1 \text{ GPU} = 10^{-6} \text{ cm}^3(\text{CNTP})/(\text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{cmHg})$$

A comparação entre o desempenho dos dois tipos de membrana (MLI e MCTF) torna-se difícil tendo em vista as diferentes condições empregadas. Como já foi discutido, a temperatura e a pressão exercem grande influência nas propriedades de permeação das membranas. A Figura 5.13 mostra uma comparação entre os resultados obtidos em condições experimentais semelhantes. Por esta figura, vê-se que, para um mesmo transportador, a permeabilidade na membrana líquida é superior àquela na membrana polimérica, o que já era esperado visto que a difusão em meio líquido é pelo menos duas ordens de grandeza maior que em meio sólido. As maiores seletividades também foram observadas em membranas líquidas.

No caso do transportador CoP, a pressão de alimentação foi a mesma em ambos os tipos de membrana (38 mmHg). A temperatura, no entanto, foi de 10 °C para a membrana líquida e 25 °C para a polimérica. No outro caso as condições experimentais foram as mesmas; os transportadores comparados, contudo, apresentavam uma pequena diferença

na sua estrutura, como pode ser conferido no Anexo 3, a qual, entretanto, não deve interferir significativamente nos resultados observados.

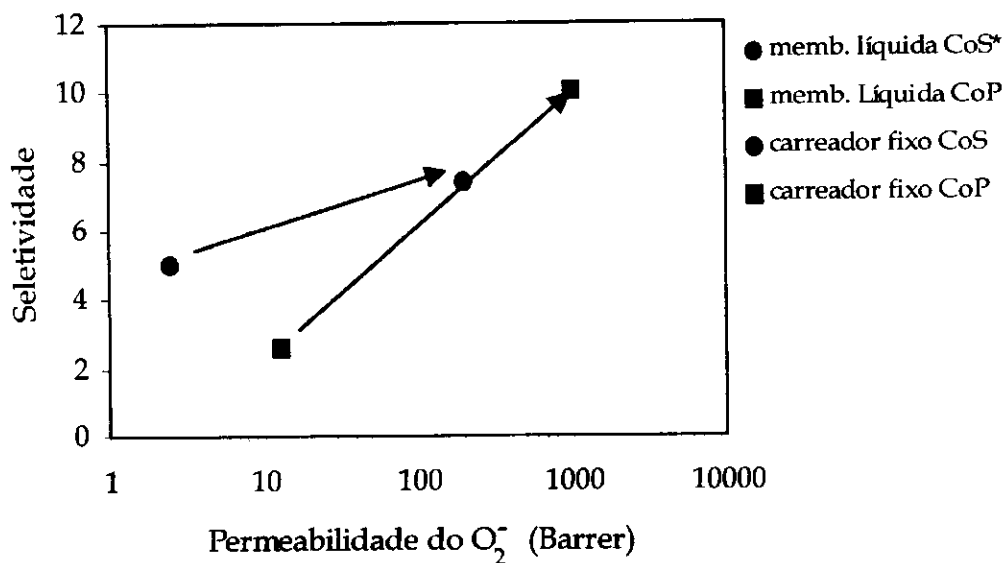


Figura 5.13: Comparação entre o desempenho de membranas líquidas e membranas com transportador fixo. Dados experimentais das seguintes referências: Membrana líquida = CoS* (Johnson et al., 1987), CoP (Chen et al., 1997), Membrana com transportador fixo = CoS (Chen et al., 2000), CoP (Suzuki et al., 1996). O transportador CoS* corresponde ao Co(3-MeoSaltmen) em Johnson et al., 1997.

5.8 ESTABILIDADE DAS MEMBRANAS

A falta de estabilidade das membranas líquidas é um problema que limita sua aplicação prática. Como a solução é mantida nos poros do suporte apenas por forças capilares, conforme predito pela equação de Laplace-Young, é comum haver perdas do solvente e transportador durante a operação (Takeuchi et al., 1987, Zha et al., 1992). Como resultado da perda do solvente, o aumento da viscosidade acarreta uma diminuição da difusividade do oxigênio. Além disso, se os poros do suporte poroso ficam totalmente desobstruídos, ocorre fluxo convectivo de todos os gases da corrente de alimentação, resultando em perda da seletividade (Johnson et al., 1987).

Alguns procedimentos podem ser adotados visando contornar este problema. Johnson et al. (1987) dispuseram o suporte poroso contendo a membrana líquida entre dois filmes de teflon. A presença dos filmes garantiu uma camada estagnada de vapor do solvente

adjacente à membrana líquida, minimizando sua evaporação. É importante notar que tal procedimento não afetou a permeabilidade da membrana. Adicionalmente, nos teste de longa duração o ar foi saturado com o solvente, reduzindo ainda mais as perdas por evaporação.

Outra estratégia para contornar o problema de perda do solvente foi adotada por Nakano et al. (1987), que utilizaram um sistema em que a fibra impregnada com a membrana líquida foi disposta verticalmente sobre um compartimento contendo o solvente da membrana, proporcionando uma regeneração constante.

O envenenamento por outros constituintes do ar, como CO₂ e água e a degradação química do transportador de O₂ também são fatores que provocam a instabilidade das membranas. Johnson et al. (1987) observaram que CO₂, normalmente presente no ar na concentração de 300 ppm, teve efeito prejudicial na estabilidade da membrana, sendo capaz de envenenar irreversivelmente o transportador. A presença da água na solução do transportador também reduziu bruscamente a vida útil da membrana, o que pode ser atribuído à oxidação irreversível do transportador pela presença deste solvente prótico. O pré-tratamento da corrente gasosa com colunas com zeólitas é uma prática usual em plantas de criogenia para remover esses e outros constituintes indesejáveis do ar.

A oxidação do metal responsável pela complexação do O₂ têm sido relatada em vários trabalhos. Kawakami et al. (1982) constataram uma ligação irreversível do oxigênio nas moléculas de tetraetilenopentamina (tetren), catalisada pelos íons cobre do transportador. Chen et al. (1997) observaram que CoP em solução de 4-metilnisola foi irreversivelmente oxidado durante repetidas reações de oxigenação. Nishide et al. (1988) observaram que CoMP em tolueno permanecia estável por menos de 24 h; ligado covalentemente a uma matriz polimérica obtida por copolimerização com hexilmetacrilato, seu tempo de meia vida se aproximava de 30 dias (Nishide et al., 1988 e 1990).

Aoki et al. (1996) observaram que CoS numa matriz de poliazometino mantinha mais de 90 % de sua seletividade mesmo após 50 dias de operação. Semelhante resultado havia sido observado para o transportador Co-(3-MeoSaltmen) em uma membrana líquida de tetrametilenosulfóxido (Johnson et al., 1987). Cabe notar que, a menos de dois grupos CH₃OH, esses transportadores apresentam igual estrutura.

Delaney et al. (1990), no entanto, verificaram acentuada perda na seletividade de uma membrana de estireno-cloreto de divinilbenzeno contendo CoSalphen, o que mostra que mesmo estando imobilizado o transportador pode perder sua atividade. A causa da instabilidade da membrana foi atribuída principalmente à perda da base axial durante a operação, embora a ocorrência de uma oxidação irreversível não tivesse sido descartada.

5.9 MEMBRANAS LÍQUIDAS ULTRAFINAS

Além da seletividade, a espessura da membrana é um importante parâmetro que vai determinar a viabilidade econômica do processo. Isto porque o custo de capital é inversamente proporcional ao fluxo, que, por sua vez, é inversamente proporcional à espessura, no caso do processo controlado pela difusão (equação 5.15). Por isso, muita ênfase vem sendo dada à produção de membranas ultra-finas (Maçom et al., 1986, maçom e Lonsdale, 1987, Johnson et al., 1987).

As menores espessuras das membranas líquidas empregadas atualmente variam de 5 a 25 μm , o que é cerca de duas ordens de magnitude maior que a espessura da camada densa de membranas poliméricas assimétricas (Baker, 2002). Johnson et al. (1987) sintetizaram membranas ultrafinas de celofane, com espessuras variando de 2 a 6 μm obtendo fluxos de 60 a 90 cm^3 (Cntp)/ cm^2 .dia, vinte vezes maior que o observado com uma membrana líquida impregnada em suporte de Nylon de 125 μm de espessura. Grande parte da literatura japonesa de patentes nesta área dedica-se ao desenvolvimento de suportes ultra-finos para membranas líquidas, produzidos pela técnica de polimerização de plasma. Yamada et al. (1987) produziram um filme de 0,2 μm de espessura pela polimerização de NMP sobre uma fibra oca de éter de poliarileno. O filme foi impregnado com DMSO, produzindo um permeado com concentração de O_2 de 61 %, e permeabilidade de 2,4 Barrer (Way e Noble, 1992).

5.10 TRANSPORTADORES NATURAIS

A presença da hemoglobina no interior dos eritrócitos representa um aumento da capacidade de transporte do sangue de 5 para 250 mL de O_2 /litro (Rodwell, 1996). O

grupo responsável pela ligação do oxigênio na hemoglobina é o heme, formado por quatro moléculas pirrole unidas por pontes de α -metileno, com um íon ferro no centro. Além da hemoglobina, existem outras moléculas transportadoras de O_2 naturalmente ocorrentes nos seres vivos.

A mioglobina, que também apresenta o grupo hemo na sua estrutura, possui uma afinidade muito alta pelo O_2 , tendo, por isto, a função de estocá-lo para que seja liberado devidamente, em condições de grande esforço muscular (Rodwell, 1996). Hemeritrina e hemocianina são outras moléculas presentes em alguns invertebrados, que também apresentam propriedades de transporte do O_2 (Niederhoffer et al., 1984).

Como discutido anteriormente, bons resultados em termos de seletividade e permeabilidade foram obtidos com membranas líquidas contendo hemoglobina (Scholander, 1960). Testes preliminares com a mioglobina (Wittenber, 1966) também indicaram um aumento substancial no transporte de O_2 ; no entanto, a solução aquosa não era estável, perdendo em poucas horas sua seletividade.

Desta forma, pretendeu-se, neste trabalho, investigar mais profundamente o uso de mioglobinas e hemoglobinas em membranas para separação de O_2 . Possivelmente em virtude da elevada massa molar dessas proteínas bem como da tendência à oxidação, passou-se a investigar moléculas sintéticas na quase totalidade dos trabalhos encontrados na Literatura sobre o assunto, mas sem sucesso no que diz respeito à estabilização e às propriedades de transporte de oxigênio.

A importância da porção globina na estabilização do centro metálico (Shikama, 1998), bem como a facilidade de obtenção e o grande conhecimento acumulado sobre as suas características, justificam uma retomada no interesse pelo uso de mioglobinas e hemoglobinas como transportadores de oxigênio em membranas de transporte facilitado.

5.11 CONCLUSÕES

O uso de processos com membranas na separação de gases tem sido bastante difundido em virtude de suas vantagens em relação aos métodos clássico, concentrando muitos esforços em torno do desenvolvimento de membranas com boas características de

permeabilidade e seletividade. Em membranas poliméricas convencionais, essas duas grandezas apresentam tendências opostas. As membranas de transporte facilitado oferecem uma possibilidade de aumento simultâneo da permeabilidade e seletividade e, por isso, têm sido amplamente investigadas, especialmente nas últimas décadas.

Dentre as possíveis aplicações deste tipo de sistema, o fracionamento do ar é potencialmente a mais importante tendo em vista o mercado que ele movimenta. Os métodos tradicionais de enriquecimento do ar em oxigênio, destilação criogênica e PSA demanda um alto consumo energético, o que acaba refletindo no custo de produção do oxigênio. Os processos com membranas encontram aí um grande potencial de aplicação.

Entretanto, para que estes sejam economicamente competitivos é imprescindível que membranas com seletividade mais elevada estejam disponíveis. Membranas com seletividade mínima em torno de 20 seriam necessárias para se obter oxigênio com grau de pureza maior que 90%, a um custo inferior ao dos processos já existentes (Figoli, 2001). Membranas com seletividade inferior a esse valor podem ser empregadas na obtenção de oxigênio com menor grau de pureza, o qual encontra aplicações nas indústrias de papel, vidro e de produção de peróxidos, no tratamento de efluentes, entre várias outras.

Embora membranas com seletividade maior que 10 tenham sido obtidas (Way e Nobel, 1992, Chen et al., 1996, Chen et al., 1997), sua ampla utilização esbarra nos problemas de falta de estabilidade do transportador. Para superar essa limitação, é essencial a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de degradação química, sua relação com a estrutura do transportador e o efeito dos demais constituintes das membranas e do ar, entre outros pontos, para que se possa ter controle sobre processo como um todo, possibilitando a utilização desta tecnologia.

O uso de moléculas transportadoras naturais apresenta-se como uma alternativa aos complexos sintéticos. A hemoglobina é conhecida por ser o mais eficiente e bem estudado transportador de oxigênio à temperatura ambiente. Apesar dos problemas de instabilidade relatados, os resultados de permeabilidade e seletividade obtidos com membranas líquidas de hemoglobina e os avanços em direção à sua estabilização são bastante animadores.

CONTEÚDO – CAPÍTULO 6

6.1 Metodologia Experimental.....	149
6.1.1 Caracterização de Suportes e Solventes para a Membrana Líquida.....	149
6.1.2 Permeabilidade e Seletividade das Membranas	150
6.1.2.1 Membranas Líquidas Contendo Mioglobina e Hemoglobina	153
6.1.2.2 Membranas de Transportador Fixo	153
6.2 Resultados.....	153
6.2.1 Caracterização das membranas.....	153
6.2.2 Membrana Líquida Contendo Hemoglobina	154
6.2.2 Membrana Líquida Contendo Mioglobina	155
6.2.2 Membrana com Transportador Fixo	159
6.3 Conclusões	165
ANEXO 3 – Nomenclatura e Estruturas	167
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171

P ARTE EXPERIMENTAL - II

Neste capítulo, serão discutidos os principais resultados obtidos no preparo e caracterização das membranas de transporte facilitado. Foram preparadas membranas impregnadas com soluções aquosas de mioglobina de baleia bem como membranas nas quais a proteína era imobilizada. Nas membranas líquidas, estudou-se o efeito da pressão de operação e da concentração de mioglobina nas propriedades de permeabilidade e seletividade ao oxigênio. A maioria dos experimentos foi realizada com mioglobina comercial de baleia, contendo ferro. No fim, fez-se um teste com uma mioglobina cobalto-substituída. As membranas com transportador fixo foram preparadas com poli(álcoolvinílico). Além da permeabilidade e seletividade ao O₂, a influência da imobilização na estabilidade da proteína foi também avaliada.

6.1 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

6.1.1 Caracterização de Suportes e Solventes para a Membrana Líquida

O preparo das membranas líquidas consiste basicamente na impregnação do suporte microporoso com a solução da membrana. Como discutido no Capítulo 6, o líquido é mantido nos poros por forças capilares. Na escolha do suporte, levou-se em conta a disponibilidade do material, bem como suas propriedades em termos de porosidade, molhabilidade, compatibilidade química e máxima pressão de operação

A princípio, selecionaram-se dois suportes comerciais e dois outros de fabricação própria. A espessura e o diâmetro de poro dos suportes podem ser vistos na Tabela 6.1.

Tabela 6.1: Suportes microporosos empregados nos testes preliminares.

<i>Suporte</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Espessura</i> (μm)	<i>Diâmetro nominal de poro</i> (μm)
Acetato de celulose	Millipore Corp.	160	0,45
Nylon-6,6 (Ultipor®)	Pall Trinity Corp.	125	0,20
EVA	PAM/PEQ	170	ND*
PES	PAM/PEQ	180	ND*

ND = não determinado

Água foi escolhida como solvente padrão para a realização de todos os testes preliminares, embora não seja o solvente adequado por aumentar a taxa de autoxidação das hemo-proteínas, como já foi discutido no Capítulo 3. Posteriormente, outros solventes também foram avaliados.

6.1.2 Permeabilidade e Seletividade das Membranas

Como discutido no Capítulo 5, a permeabilidade de uma membrana pode ser calculada pela equação 5.6, considerando-se um escoamento unidirecional do gás em baixa pressão.

$$P = \frac{J}{\Delta p / l} \quad (5.6)$$

Onde:

J= fluxo do gás

Δp = diferença de pressão através da membrana

l= espessura da membrana

A unidade utilizada para P foi o Barrer ($1 \text{ Barrer} = 10^{-10} \text{ cm}^3(\text{CNTP}).\text{cm}/\text{cm}.\text{s}.\text{cmHg}$).

O fluxo J, por sua vez, pode ser calculado considerando-se um comportamento ideal para o gás permeando através da membrana:

$$J = \frac{dV}{dt} \frac{1}{A} = \frac{dn}{dt} \left(\frac{T(\text{CNTP}).R}{P(\text{CNTP})} \right) \frac{1}{A} \quad (5.7)$$

Onde A é a área de permeação da membrana, R, a constante dos gases, P e T, a pressão e a temperatura nas CNTP e V, o volume de gás.

A variação do número de mols (dn/dt) pode ser calculada considerando comportamento ideal para o gás que ocupa o lado do permeado, que possui volume conhecido Vs:

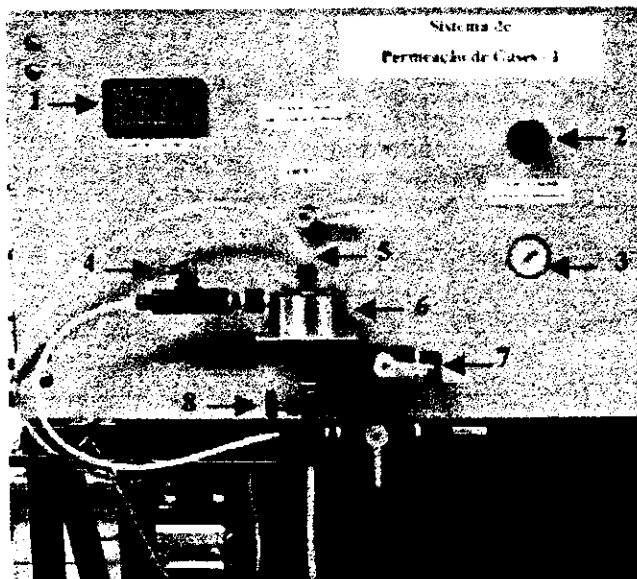
$$\frac{dn}{dt} = \frac{dP}{dt} \frac{V_s}{T(AMB).R} \quad (5.8)$$

T(AMB) é a temperatura nas condições de operação. A substituição de (5.7) e (5.8) em (V.6) resulta em:

$$\frac{P}{l} = \frac{dp}{dt} \left(\frac{V_s}{A.\Delta p} \right) \left(\frac{T(CNTP)}{T(AMB)P(CNTP)} \right) \quad (5.9)$$

Nos cálculos de permeabilidade, considerou-se que o suporte poroso possuía uma porosidade de 20%, uma vez que não foi possível caracterizar essa propriedade para os suportes utilizados.

A permeabilidade das membranas foi, então, determinada utilizando-se o equipamento ilustrado na Figura 6.1.



Legenda:

- | | |
|--|--------------------------------------|
| 1. Milivoltímetro | 6. Célula de permeação de aço |
| 2. Válvula de controle da pressão de alimentação | 7. Saída para o transdutor |
| 3. Manômetro | 8. Válvula de isolamento do sistema |
| 4. Saída para o sistema de vácuo | 9. Saída para o fluxímetro de bolhas |
| 5. Entrada de gás | 10. Transdutor de pressão |

Figura 6.1: Fotografia do sistema experimental de permeação de gás, utilizado para caracterizar as membranas.

O transdutor de pressão (10) expressa o aumento de pressão do lado do permeado em termos de um sinal elétrico, que é lido no voltímetro (1). Através de uma curva de calibração, o sinal em mV é convertido em pressão. Nos experimentos de longa duração, foi utilizado um sistema de aquisição de dados (IQ Logger, modelo IQ-VMA).

No caso das membranas líquidas, utilizou-se um procedimento para saturar o gás com vapor do solvente, visando reduzir a taxa de evaporação do líquido contido nos poros do suporte. O dispositivo consiste de um tanque contendo uma quantidade mínima do solvente da membrana, colocado antes da célula de permeação, de forma que o gás tem que permear através filme de solvente antes de atingir a membrana, promovendo a sua saturação.

A seguir, são apresentados os procedimentos adotados no preparo das membranas contendo hemoglobina e mioglobina.

6.1.2.1 Membranas Líquidas Contendo Mioglobina e Hemoglobina

Inicialmente, fez-se um teste com hemoglobina extraída de sangue de cavalo segundo procedimento de Rius e Valenti (1972), que consiste no rompimento das células vermelhas do sangue por choque osmótico, seguido da recuperação da hemoglobina pela extração dos fragmentos celulares com clorofórmio.

No caso da mioglobina comercial, como esta se encontrava na forma oxidada, as soluções dessa proteína eram preparadas da seguinte forma:

1. Dissolve-se a proteína comercial (Mioglobina de baleia, Sigma) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0.
2. Adicionam-se quantidades estequiométricas de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) também dissolvido em tampão fosfato. A solução é, então, aplicada imediatamente em uma coluna de filtração em gel (Sephadex G-25, Sigma) para retirar o excesso de ditionito.
3. Concentra-se a solução da proteína por ultrafiltração (concentradores Centriprep[®], Millipore).

Membranas líquidas contendo hemoglobina ou mioglobina eram preparadas por imersão do suporte microporoso na solução aquosa da proteína.

6.1.2.2 Membranas de Transportador Fixo

Membranas foram preparadas com PVA 99% hidrolisado (Aldrich, MW 85000 – 146000) da seguinte forma:

1. Prepara-se uma solução 6% de PVA em água;
2. Aquece-se lentamente, sob agitação e com refluxo, até atingir 100 °C;
3. Mantém-se a 100 °C por 5 h ou até completa solubilização do PVA;
4. Desliga-se o aquecimento e mantém-se sob agitação por 12 h;
5. Deixa-se em repouso até completo desaparecimento de bolhas de ar;
6. Adiciona-se a solução de mioglobina, de concentração previamente conhecida, de forma que a proporção final de mioglobina seja de 1/1 com relação ao PVA. Agita-se lentamente.
7. Espalha-se a solução em placas de vidro. Deixa-se secando para evaporação do solvente.

O efeito da presença de um agente plastificante foi avaliado adicionando-se diferentes concentrações de glicerol à solução de PVA, logo após a etapa 4.

6.2 RESULTADOS

6.2.1 Caracterização das membranas

Os resultados obtidos nesta etapa podem ser vistos na Tabela 6.2. A membrana de PES apresentou uma pressão crítica muito reduzida, tendo sido excluída dos demais testes. A membranas EVA foi inicialmente testada, mas, posteriormente, foi descartada devido à falta de reprodutibilidade dos dados, que pode ser atribuída à não uniformidade na sua estrutura. As membranas de nylon, como esperado por possuírem menor tamanho de poro, exibiram uma pressão crítica mais elevada.

Tabela 6.2: Resultado da caracterização das membranas.

<i>Membrana</i>	<i>Solvente</i>	<i>Pressão Crítica (bar)</i>
Acetato de celulose	Água	2,0
	Glicerol	1,9
Nylon	Água	3,5
	Glicerol	3,2
PES	Água	< 0,05
	Glicerol	< 0,07

A saturação do gás com vapor do solvente prolonga a vida útil da membrana, como pode ser observado na Figura 6.2. Desta forma, em todos os testes de permeação foi adotado tal procedimento.

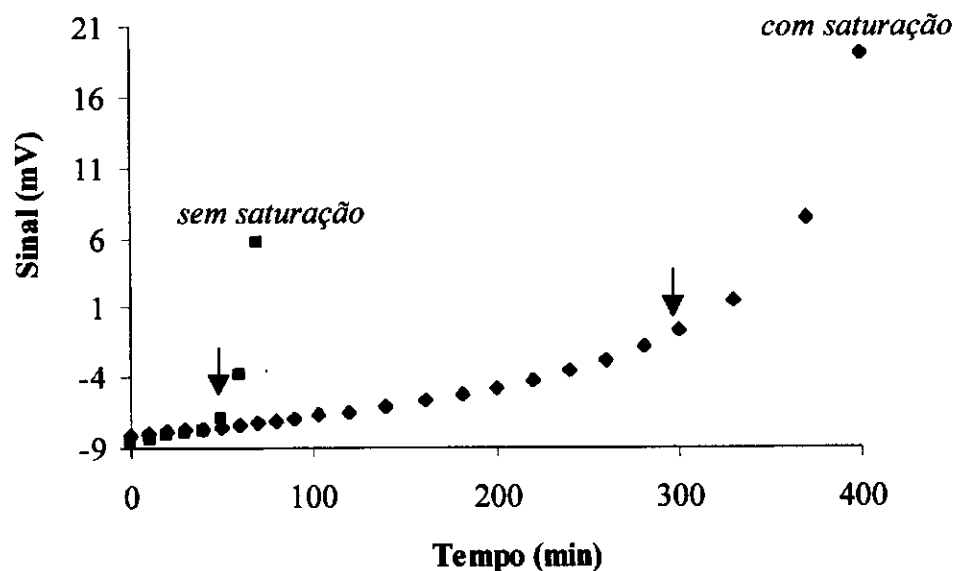


Figura 6.2: Curva de permeação do nitrogênio em uma membrana líquida, com e sem o dispositivo de saturação do gás. Pressão de operação = 0,8 bar.

6.2.2 Membrana Líquida Contendo Hemoglobina

A Figura 6.3 mostra a variação na permeabilidade da membrana líquida contendo mioglobina com a pressão de O_2 na alimentação. Cabe ressaltar que cada ponto experimental foi obtido com uma membrana recém preparada (mesmo suporte, mesma solução) visando inimizar os erros que poderiam advir de uma possível oxidação da proteína ao longo dos testes.

Como pode ser observado, para pressões de operação mais baixas, houve um aumento na permeabilidade do oxigênio relativamente à membrana sem o transportador, ou com este na forma oxidada. Tal comportamento é característico da ocorrência do transporte facilitado desse gás e é bem descrito pelo modelo da dupla sorção, descrito anteriormente no Capítulo 5. Na menor pressão investigada, 0,02 bar, aproximadamente 1,5 cmHg, a permeabilidade do O₂ foi de 500 Barrer e a seletividade, 6,2.

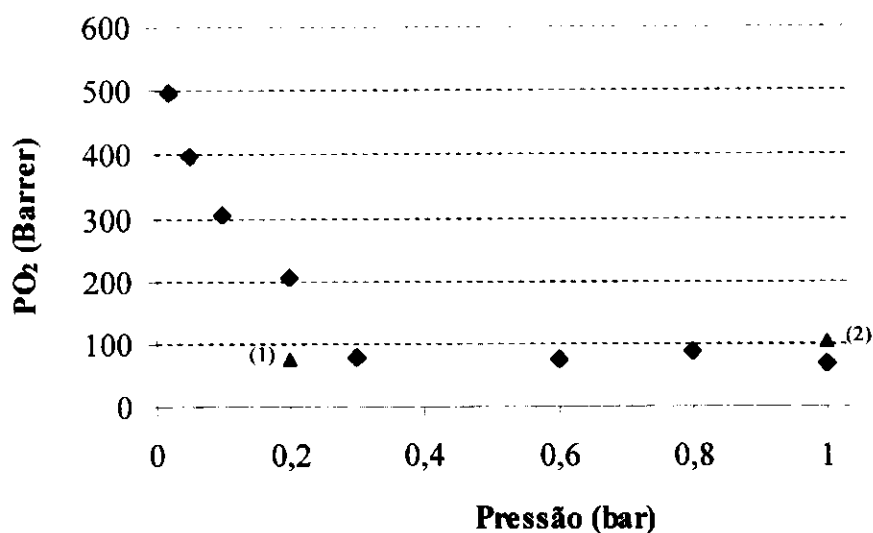


Figura 6.3: Efeito da presença da hemoglobina na membrana líquida sobre a permeabilidade do oxigênio. Os pontos em azul correspondem à permeabilidade do O₂ em uma membrana líquida contendo metaemoglobina (1) e em uma membrana líquida contendo apenas o solvente (2). T = 25 °C, concentração de hemoglobina = 32 g/L.

6.2.3 Membrana Líquida Contendo Mioglobina

A Figura 6.4 mostra a permeabilidade ao O₂ de uma membrana líquida contendo mioglobina, na concentração de 43 g/L. Assim como antes, cada ponto experimental corresponde a uma membrana idêntica com relação à concentração de mioglobina mas recém-preparada.

Da mesma forma que para a hemoglobina, observou-se um aumento na permeabilidade do oxigênio com a diminuição da pressão de operação, caracterizando o transporte facilitado. A permeabilidade ao N₂ da membrana líquida manteve-se constante em 55 Barrer e foi representada por uma linha pontilhada no gráfico da Figura 6.4. Como comparação, a permeabilidade ao O₂ da membrana líquida sem mioglobina foi

determinada e também se manteve constante em torno de 65 Barrer.

Na menor pressão investigada, 0,04 bar, aproximadamente 3 cmHg, a permeabilidade do O₂ foi de 400 Barrer e a seletividade, 7.

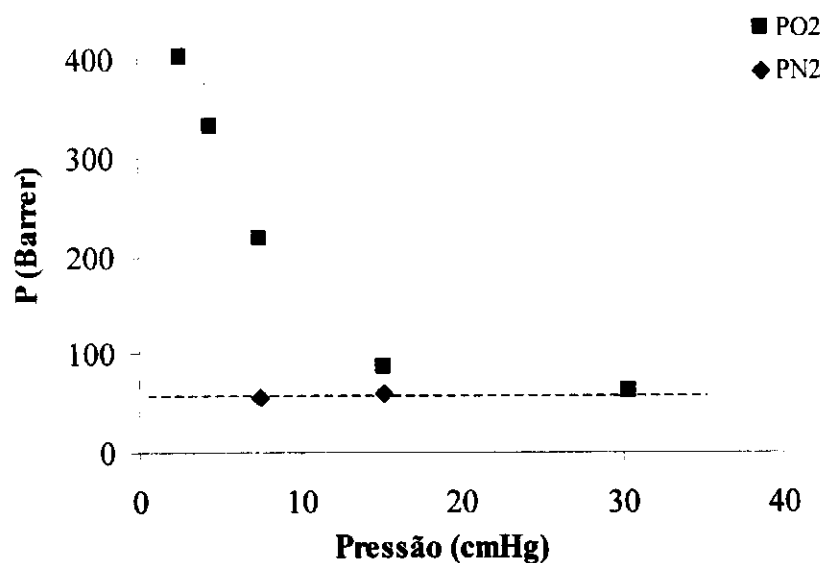


Figura 6.4: Permeabilidade ao O₂ e ao N₂ de uma membrana líquida contendo mioglobina. T= 25 °C, Concentração de mioglobina = 43 g/L.

O efeito da concentração de proteína sobre a permeabilidade da membrana pode ser visto na Figura 6.5, calculada na pressão de 0,1 bar. Observa-se um máximo na permeabilidade para concentrações de mioglobina em torno de 50 g/L.

O comportamento da curva é também previsto pelo modelo da dupla sorção, pelo qual concentrações baixas da proteína tornam o efeito facilitado pouco significativo enquanto que maiores concentrações implicam em viscosidades mais elevadas, o que diminui a difusividade do complexo transportador/O₂.

Embora nos experimentos apresentados acima tenha sido observado um comportamento típico de transporte facilitado, observou-se uma queda na permeabilidade com o tempo ainda nos estágios iniciais das corridas, a qual que não poderia ser atribuída à oxidação da proteína. Além disso, foi verificada uma influência da taxa de evaporação do solvente sobre o fluxo total de gás que permeia através da membrana, conduzindo a resultados imprecisos no cálculo da permeabilidade. Desta forma, foram realizados novos experimentos visando confirmar os resultados obtidos. Nestes testes, utilizou-se ar em vez de oxigênio puro, possibilitando, assim, trabalhar com a mesma faixa de

pressão parcial de oxigênio que antes, mas com uma pressão total de operação maior.

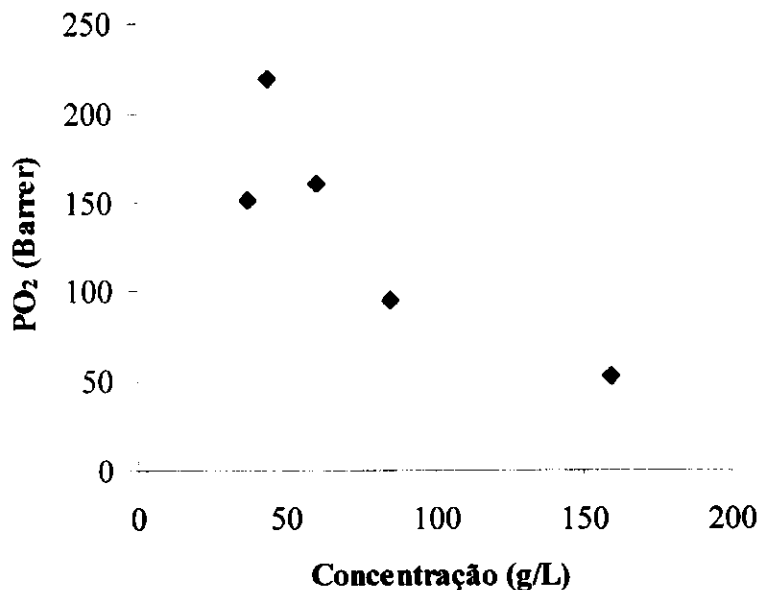


Figura 6.5: Efeito da concentração de mioglobina na permeabilidade ao O₂ da membrana líquida. $\Delta p = 0,1$ bar.

A Figura 6.6 mostra a variação da permeabilidade da membrana com a pressão total de operação nesse novo sistema. O mesmo comportamento anterior foi observado, mas desta vez os valores absolutos da permeabilidade foram superiores.

A permeabilidade do ar na membrana contendo mioglobina aumentou com a diminuição da pressão de operação. Por outro lado, a permeabilidade do N₂ manteve-se inalterada na mesma faixa de pressão. O mesmo aconteceu para a permeabilidade do N₂ em uma membrana contendo apenas o solvente.

Na Figura 6.7 os dados da Figura 6.6 foram representados em termos da pressão parcial de cada gás. Foram representados, também, os valores de seletividade obtidos.

Na pressão parcial de oxigênio de 3 cmHg, uma permeabilidade ao O₂ de 1600 Barrer e uma seletividade de 21 foram obtidas, o que é bem superior aos resultados relatados na literatura para outros transportadores (Figoli et al., 2001), considerando-se as mesmas condições de operação.

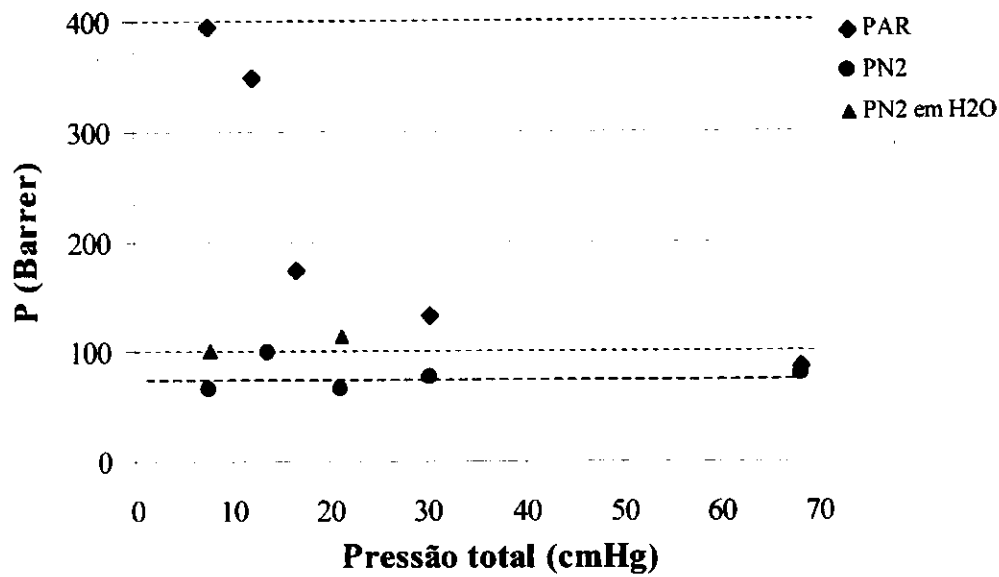


Figura 6.6: Permeabilidade de uma membrana líquida contendo mioglobina em função da pressão total de cada gás. T= 25 °C, Concentração de mioglobina = 60,6 g/L.

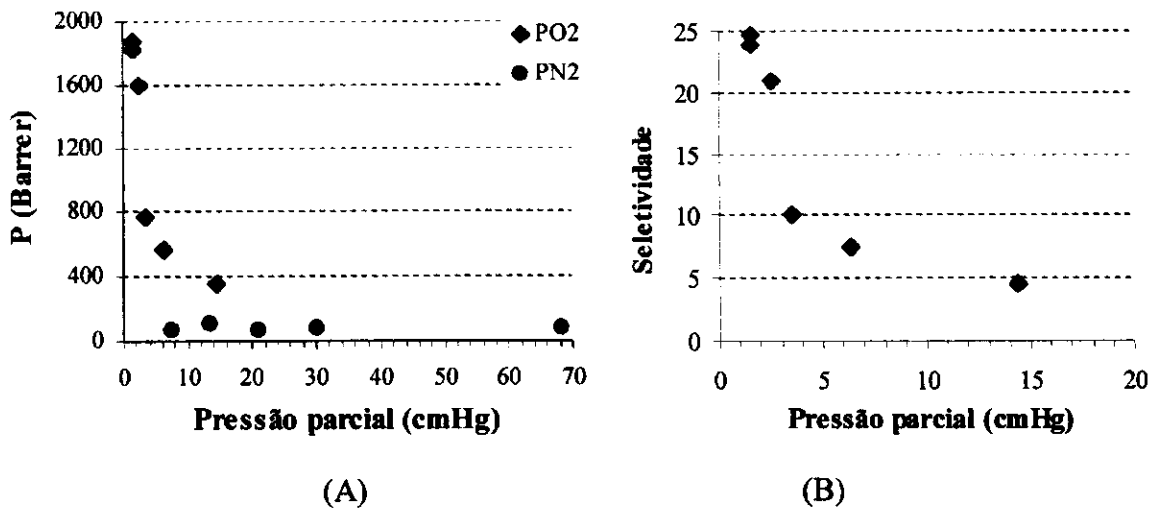


Figura 6.7: Permeabilidade (A) e Seletividade ao O₂ (B) da membrana líquida contendo mioglobina, como função da pressão parcial de cada gás. T= 25 °C, Concentração de mioglobina = 60,6 g/L.

Um outro teste foi realizado utilizando cobalto-mioglobina preparada a partir da mioglobina comercial. A Figura 6.8 mostra a comparação entre a permeabilidade ao O₂ desta CoMb e da correspondente mioglobina contendo ferro. Como pode ser observado, o comportamento da membrana contendo a CoMb foi semelhante ao observado anteriormente para a FeMb, demonstrando a presença do transporte facilitado.

Embora a afinidade das CoMbs seja cerca de 100 vezes menor que a das FeMbs, tal diferença parece não ter afetado significativamente as propriedades de transporte das membranas preparadas com cobalto. Novos testes seriam necessários para uma melhor compreensão desse efeito. No entanto cabe destacar que a principal conclusão deste experimento é que a CoMb apresentou propriedades de transporte semelhantes à FeMb, com a vantagem de possuir uma estabilidade muito superior, como apresentado no Capítulo 4.

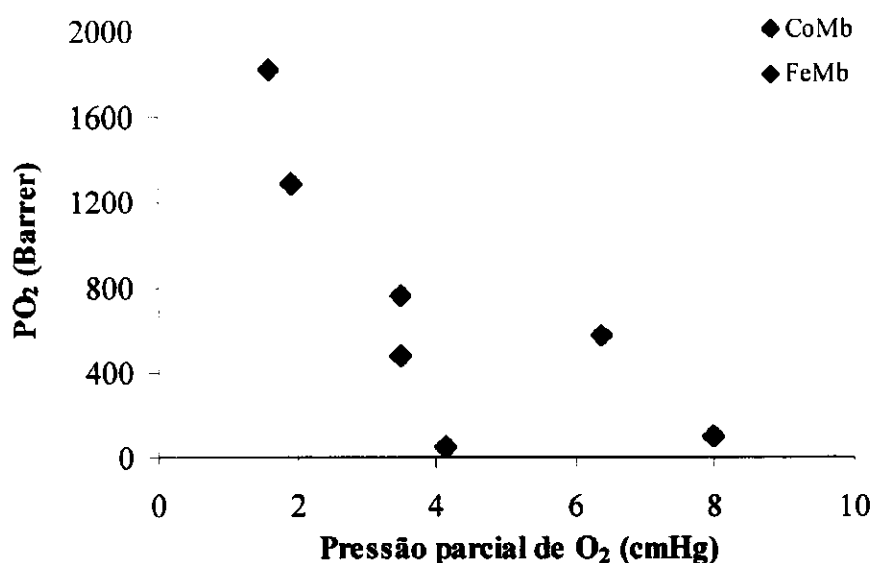


Figura 6.8: Comparação entre a permeabilidade ao O₂ da membrana líquida. $\Delta p = 0,1$ bar. Os dados para a FeMb são os mesmos da Figura 6.7.

6.2.4 Membrana com Transportador Fixo

A Figura 6.9 mostra o efeito da adição do agente plastificante glicerol sobre a permeabilidade das membranas de PVA, ainda sem proteína. PVA é um polímero que, a 25 °C, está abaixo da sua T_g sendo, portanto, vítreo. A adição de pequenas quantidades de glicerol promove um aumento inicial na mobilidade segmental das cadeias poliméricas gerando microcavidades por onde a molécula do gás pode se difundir, o que resulta em um aumento na permeabilidade da membrana. Posteriores adições de glicerol, contudo, irão promover um preenchimento desses espaços livres, provocando uma redução na permeabilidade. Quando a concentração de glicerol torna-se suficientemente elevada, a permeabilidade na membrana tende ao valor que seria observado no glicerol puro. Este comportamento pode ser observado na Figura 6.9.

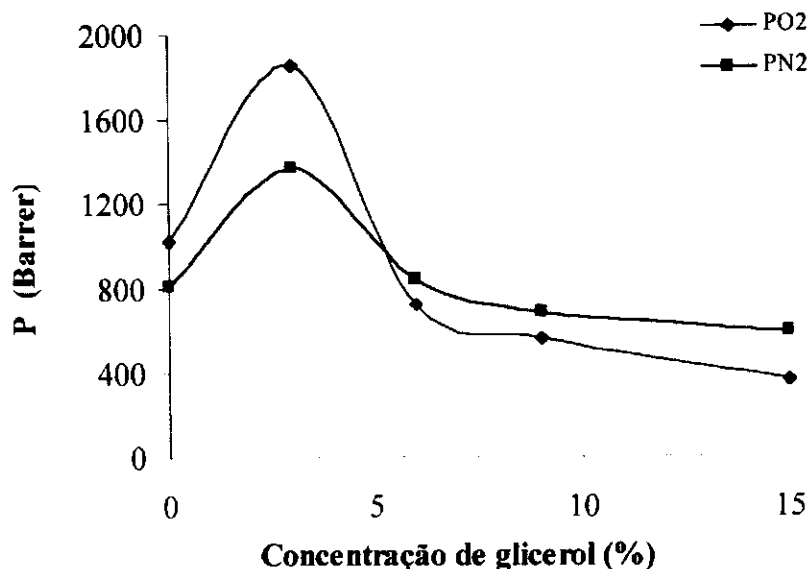


Figura 6.9: Efeito da adição do agente plastificante (glicerol) na permeabilidade da membrana de PVA.

As membranas contendo mioglobina foram inicialmente preparadas com 3 % de glicerol. No entanto, com o procedimento adotado, a etapa de secagem das mesmas prolongava-se muito, aumentando a oxidação da proteína. Além disso, a presença de glicerol residual ocasionava a aderência da membrana no suporte de nylon utilizado nos testes de permeação. Desta forma, nos testes abaixo, as membranas produzidas não continham glicerol.

A imobilização da mioglobina não resultou em perda da sua funcionalidade, o que pode ser confirmado pela aparência da membrana, na qual a proteína mantém a cor característica da forma oxigenada, como pode ser visto na Figura 6.10. A mesma figura também apresenta, como comparação, uma membrana contendo mioglobina oxidada.

Além do aspecto característico da oxiMb, o espectro da proteína em solução, obtido após ressolubilização da membrana em tampão fosfato, também confirma a manutenção das propriedades funcionais da mioglobina.

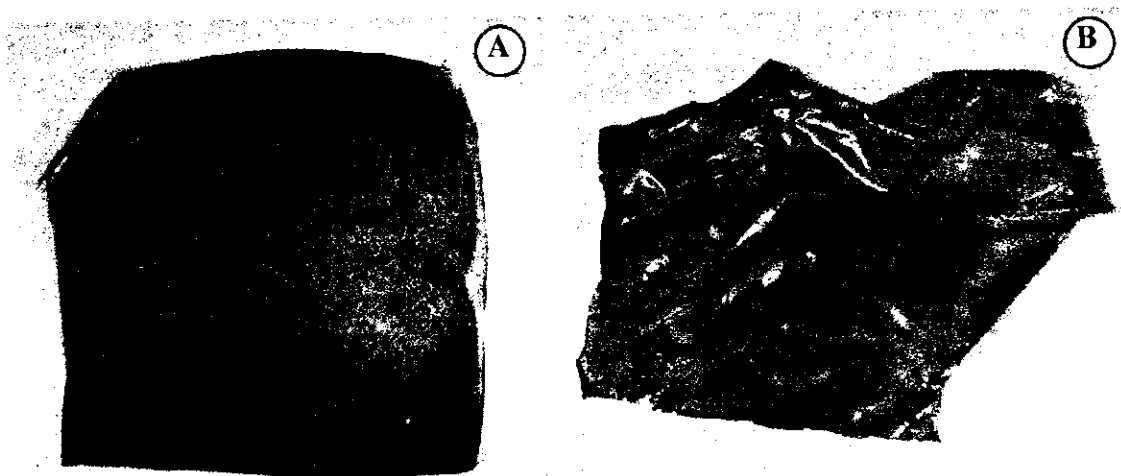


Figura 6.10: Fotografia da membrana de PVA contendo mioglobina recém-preparada (A) e após uma semana em temperatura ambiente (B).

A próxima etapa foi avaliar o efeito da imobilização na estabilidade da proteína. Os experimentos estão representados nas Figuras 6.11 a 6.13. Nestes experimentos, a evolução da oxidação foi acompanhada pelas modificações no espectro de absorção da proteína em solução. Como discutido no Capítulo 4, os espectros das formas oxi e met são bem distintos entre si nas FeMbs, com picos de absorção característicos em 581 nm e 630 nm, respectivamente.

A Figura 6.11 mostra uma comparação entre a oxidação da proteína imobilizada e em solução. No caso da mioglobina em solução, esta foi mantida em temperatura ambiente, tendo seu espectro obtido em intervalos regulares de tempo. Por outro lado, a oxidação na membrana de PVA a 25 °C foi avaliada solubilizando-se amostras da mesma em tampão fosfato 100 mM pH 7,0 instantes antes da obtenção do seu espectro.

Pode-se concluir, analisando-se a Figura 6.11, que a imobilização da mioglobina resultou numa melhoria significativa da sua estabilidade. Enquanto na proteína em solução o tempo decorrido para sua total oxidação foi de 48 horas, na mioglobina imobilizada esse tempo foi de 168 h, aproximadamente 3,5 vezes maior. Além disso, deve-se considerar que já havia uma concentração inicial de metMb na membrana, formada, provavelmente, durante o procedimento de preparo da mesma. Sendo assim, o fator de estabilização foi ainda maior que 3,5.

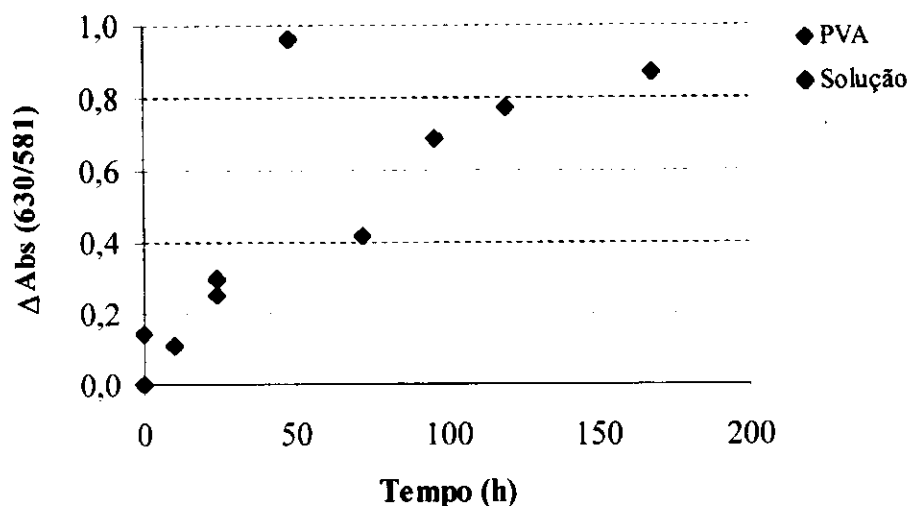


Figura 6.11: Comparação entre a estabilidade da mioglobina em solução e immobilizada na membrana de PVA, a 25 °C.

A influência da temperatura na estabilidade da proteína immobilizada pode ser observada na Figura 6.12. Como já esperado, a diminuição da temperatura provoca uma diminuição na taxa de oxidação da proteína, em ambos os casos. Enquanto a mioglobina foi completamente oxidada em 168 h a 25 °C, a mesma mantém-se essencialmente na forma oxi mesmo após 400 h.

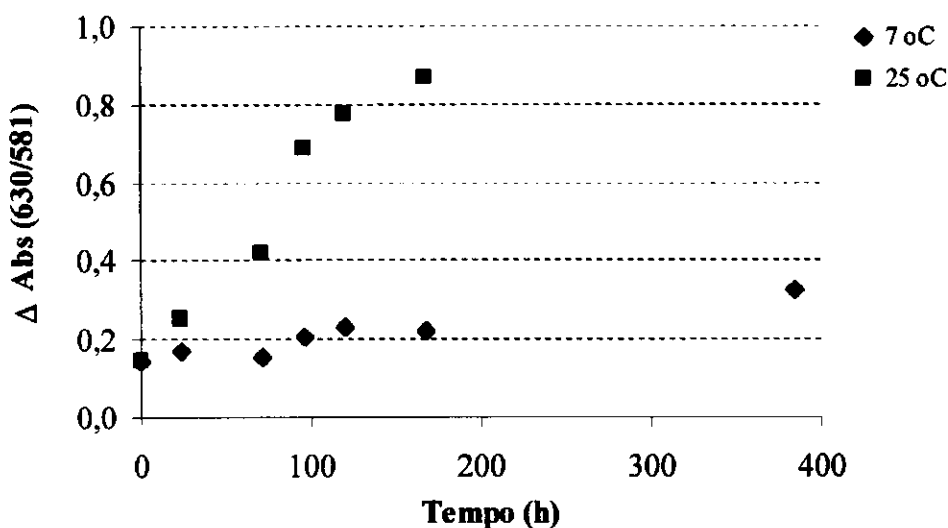


Figura 6.12: Efeito da temperatura na estabilidade da mioglobina quando immobilizada em uma membrana de PVA.

A Figura 6.13 mostra a mesma comparação do efeito da temperatura na estabilidade da mioglobina em solução. Neste caso, observou-se que, na temperatura de 7 °C, a mioglobina apresentou uma vida útil no mínimo 10 vezes maior.

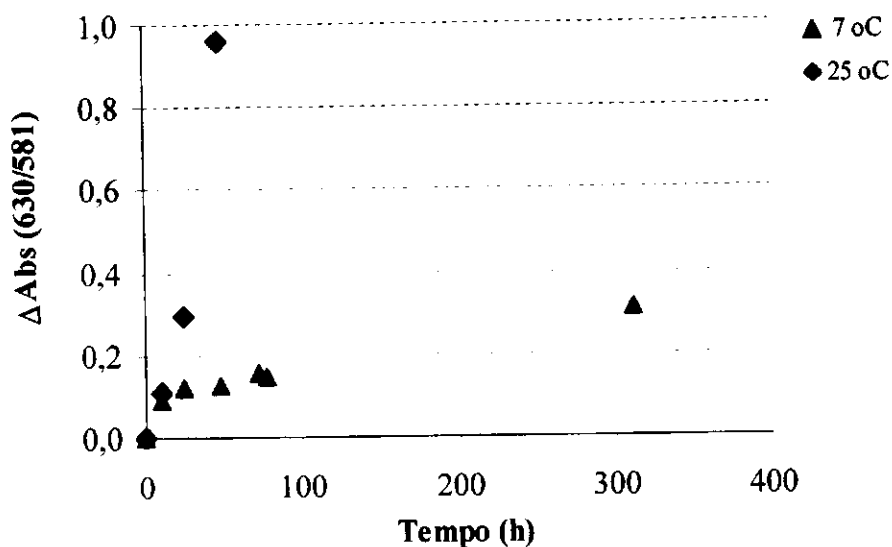


Figura 6.13: Efeito da temperatura na estabilidade da mioglobina em solução.

Fez-se, também, uma comparação entre a oxidação da mioglobina em solução e imobilizada na membrana, a 7 °C, como mostrado na Figura 6.14. Neste caso, o efeito benéfico da imobilização sobre a estabilidade da mioglobina não fica tão evidente, mas é possível observar que a proteína em solução sofre uma rápida oxidação inicial seguida de uma fase onde a taxa é mais lenta. No caso da mioglobina imobilizada, a taxa de oxidação parece ser mais lenta desde o início. No entanto, a concentração inicial de metamioglobina nesse caso já era elevada. Desta forma, novos experimentos contribuiriam para elucidar esse comportamento observado.

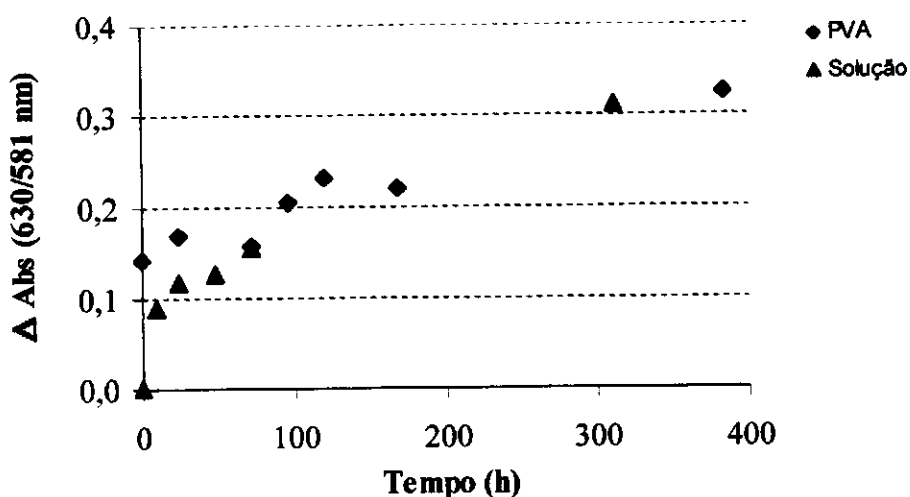


Figura 6.14: Comparação entre a estabilidade da mioglobina em solução e imobilizada na membrana de PVA, a 7 °C.

A Figura 6.15 mostra o efeito do tratamento de uma membrana oxidada com o agente redutor ditonito de sódio. Foi estabelecido um procedimento que envolve o contato da membrana com uma solução de ditonito de sódio em glicerol contendo uma quantidade mínima de água, até que se note a mudança na coloração da proteína (de marrom para vermelho), seguido da lavagem da membrana para retirar o excesso de ditonito.

Como o PVA é um polímero hidrossolúvel, a lavagem foi feita com glicerol, mas tal procedimento dificulta a etapa posterior de secagem e, por isso esse procedimento deve ser aperfeiçoado. No entanto, ficou comprovado que mesmo após oxidação total é possível regenerar a membrana, recuperando capacidade de complexar o O_2 .

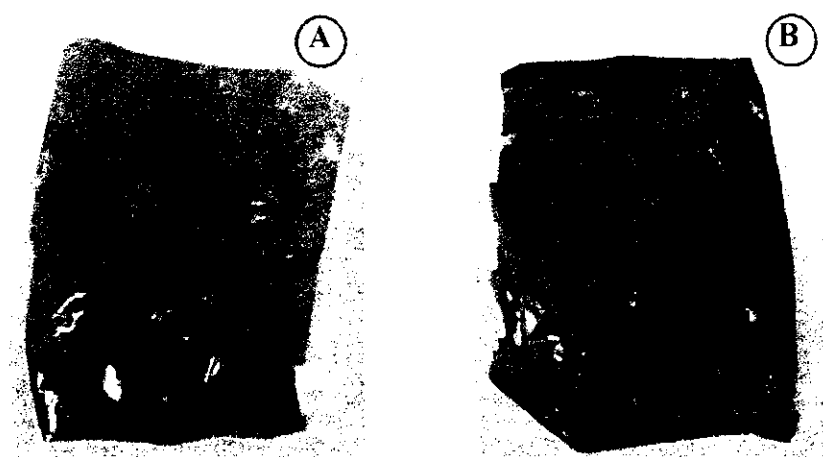


Figura 6.15: Membrana de PVA contendo mioglobina totalmente oxidada após 1 semana em temperatura ambiente (A) e regenerada após tratamento com ditonito de sódio (B).

As propriedades de transporte da membrana de PVA contendo mioglobina foram avaliadas no experimento representado pela Figura 6.16. Observou-se um aumento da permeabilidade do ar com a diminuição da pressão de operação, característico do transporte facilitado. No entanto, novos testes devem ser realizados visando caracterizar melhor esse efeito.

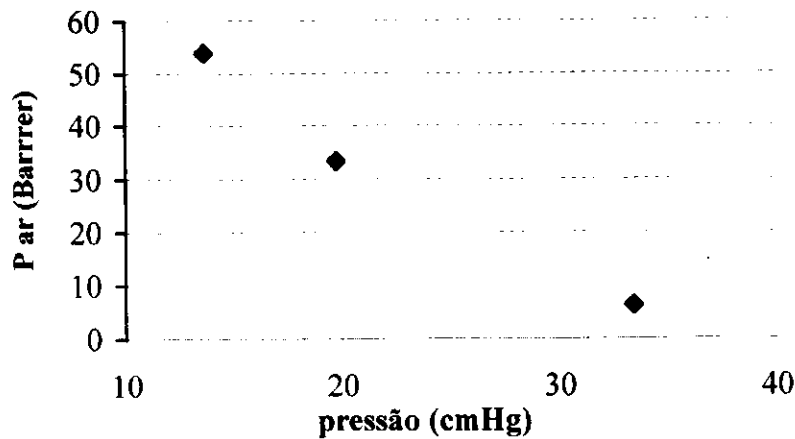


Figura 6.16: Membrana de PVA contendo mioglobina imobilizada. Proporção inicial PVA/mioglobina ~1/1.

Em todos os experimentos anteriores apresentados, foi utilizada mioglobina nativa de baleia (Sigma). Para realizar os teste de permeação com a mioglobina recombinante seria necessária uma elevada quantidade da mesma. Tendo em vista os baixos rendimentos obtidos nas fermentações, optou-se por realizar os estudos apenas com a proteína comercial, deixando testes com as mutantes como sugestão para estudos posteriores.

No entanto, cabe ressaltar que os resultados obtidos em termos de permeabilidade e seletividade das membranas bem como na estabilização da mioglobina foram bastante promissores e satisfatórios para os objetivos desse trabalho, apontando os rumos que devem ser seguidos em estudos posteriores. Uma otimização de tais propriedades demandaria tempo e foge ao escopo do mesmo.

6.3. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com as membranas líquidas contendo mioglobina representam um avanço nesta área. Na pressão de 3 cmHg, obteve-se uma permeabilidade ao O_2 de 1600 Barrer e uma seletividade de 21, superior às relatadas na literatura para esse tipo de sistema. A grande limitação ao uso de membranas líquidas é a falta de estabilidade operacional, ocasionada, principalmente, pela evaporação do solvente com o tempo. Neste sentido, as membranas imobilizadas são mais adequadas.

As membranas de PVA produzidas exibiram uma permeabilidade ao O₂ de aproximadamente 237 Barrer, para uma pressão parcial de aproximadamente 2,8 cmHg. Nesta mesma pressão, a permeabilidade da membrana líquida foi de 319 Barrer por área de permeação.

Com relação à estabilidade da proteína, observou-se uma redução significativa na oxidação da mesma quando imobilizada na membrana. Comparando-se a mioglobina em solução a 25 °C e a mioglobina imobilizada na membrana a 7 °C, esta última apresenta uma vida útil no mínimo 14 vezes maior.

Os resultados obtidos com as membranas utilizando-se a mioglobina nativa podem ser significativamente melhorados empregando-se as proteínas recombinantes contendo cobalto. Como apresentando no Capítulo 4, proteínas com uma grande variação na afinidade pelo oxigênio (P_{50} variando na faixa de 0,02 a 600 μM) foram preparadas. A taxa de oxidação, que pode ser considerada o principal fator influenciando a viabilidade de utilização dessa tecnologia, também foi sensivelmente reduzida nas mutantes contendo cobalto.

Assim, este trabalho representa uma nova linha de pesquisa do laboratório, onde muitos parâmetros podem ainda ser explorados, como boas perspectivas futuras na obtenção de membranas adequadas à separação do oxigênio a partir do ar.

NOMENCLATURA E ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS TRANSPORTADORES

Nomenclatura:

CoS: [N,N'-Disalicilidenoetilenodiamina]Co(II)

CoP: [$\alpha, \alpha', \alpha'', \alpha'''$ -meso-tetraquis(o-pivalamidofenil)porfirinato]Co(II)

CoS3: [N,N'-etilenobis(3-metil-7-fenilsalicilidenoiminato)]Co(II)

CoB4P: [meso- $\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -tetraquis(o-pivalamidofenil)porfirinato]Co(II)

CoM3P: [meso- β -(o-acetamidofenil)- α, α, α -tris(o-acetamidofenil)porfirinato]Co(II)

CoE3P: [meso- β -(o-acrilamidofenil)- α, α, α -tris(o-acrilamidofenil)porfirinato]Co(II)

CoB3P: [meso- β -(o-pivalamidofenil)- α, α, α -tris(o-pivalamidofenil)porfirinato]Co(II)

CoSb: [N,N'-disalicilideno-1,2-fenilenodiamina]Co(II)

Co(SalPr): [di-(salicilal)-3,3'-diimino-di-n-propilamina]Co(II)

CoST: di-(3-metoxisalicilal-tertbutilamina)Co(II)

CoMP: [$\alpha, \alpha', \alpha'', \alpha'''$ -meso-tetraquis(o-metacrilamidafenil)porfirinato]Co(II)

Co(3-MeoSaltmen): [N,N'-bis(3-metoxisalicilideno)-tetrametiletilenediamina]Co(II)

PBMA: Poli(butilmetacrilato)

PHAM: Poli(hidroxietilacrilato-co-hidroxietilmetracilato)

POMPpy: Poli[(octilmetacrilato)-co-4-vinilpiridina]

POMIm: Poli[(octilmetacrilato)-co-1-vinilimidazola]

ESBS: estireno-butadieno-estireno epoxidizado

PDMS: Polidimetilsiloxana

EC: Etil celulose

PTFE: Politetrafluoretileno

PP: polipropileno

PE: polietileno

PVDF: fluoreto de polivinilideno

DMF: N,N'-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

TMSO: tetrametilenosulfóxido

BLO: γ -butirolactona

NMP: N-metilpirrolidona

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

DMAC: dimetilacetamida

HM: hexametacrilado

MMA: metilmetacrilato

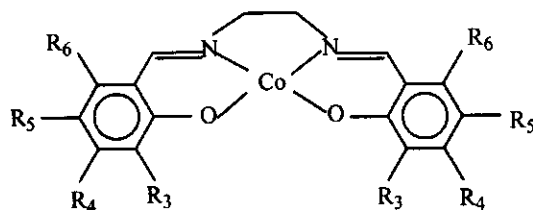
BA: butilacrilato

CDB: cloreto de divinilbenzeno.

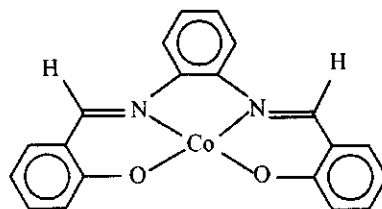
Estruturas

CoS: R=H

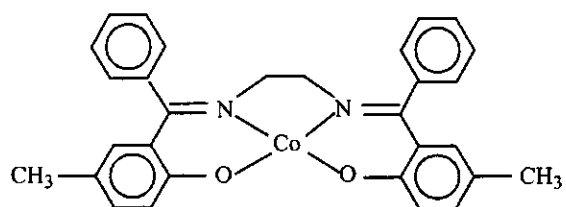
Co(3-MeoSaltmen): R₃=CH₃OH, R₄=R₅=R₆=H



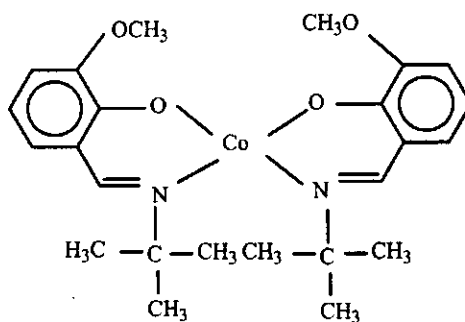
CoSb



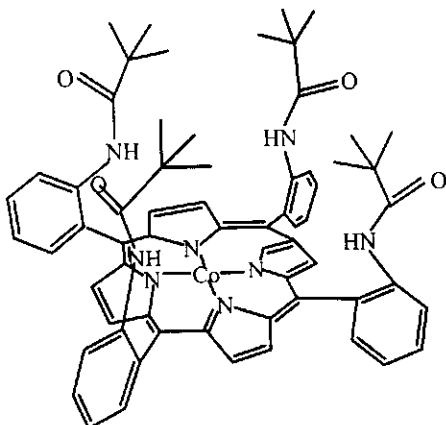
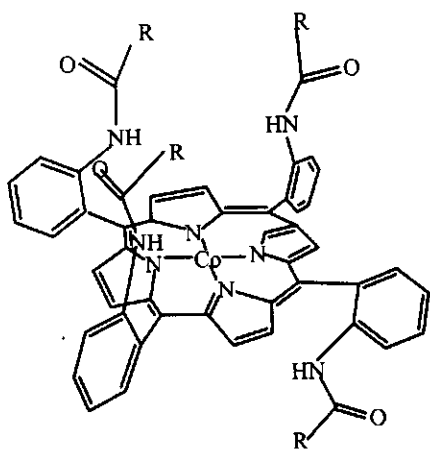
CoS3



CoST



CoP

CoB3: R= C(CH₃)₃CoE3: R= CHCH₂CoM3: R= CH₃

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoki, T., Shin, K., Oikawa, E. (1996), *Highly Oxygen Permselective Membrane of Cobalt-Complexed Polyazomethine Containing Tridentate Ligand and Oligosiloxane in the Repeating Pairs of the Main Chain*, Polymer J., 28(2), 106-112.
- Baker, R. W., Roman, I. C., Lonsdale, H. (1987), *Liquid Membranes for the Production of Oxygen-Enriched Air-I. Introduction and Passive Liquid Membranes*, J. memb. Sci, 31, 15-29.
- Baker, R. W. (2002), *Future Directions of Membrane Gas Separation Technology*, Ind. Eng. Chem. Res., 41, 1393-1411.
- Barnes, M. J., Drago, R. S., Balkus, K. J. Jr (1988), *Cobalt(II)-Facilitated Transport of Dioxygen in a Polystyrene Membrane*, J. Am. Chem. Soc., 110, 6870-6785.
- Chen, S. H., Lai, J. Y. (1996), *Polycarbonate/(N,N'-dialicylidene ethylene diamine) Cobalt(II) Complex Membrane for Gas Separation*, J. Appl. Polym. Sci., 59, 1129-1135.
- Chen, X-S, Nishide, H., Oyaizy, K., Tsuchida, E. (1997), *Highly Selective Oxygen Transport through a Cobalt Porphyrin Liquid Membrane*, J. Phys. Chem. B, 101, 5725-5729.
- Chen, S-H, Ruaan, R-C, Lai, J-Y (1997), *Effect of Nonsolvent/Oxygen Carrier Additives on Gas Separation Performance of Polycarbonate Membranes*, Sep. Sci. Technol., 32, 925-937.
- Chen, S-H. et al. (2000), *Gas Transport Properties of HTPB Based Polyurethane/Cosalen Membrane*, J. Memb. Sci., 173, 99-106.
- Delaney, M., Reddy, D., Wessling, R. (1990), *Oxygen/Nitrogen Transport in Glassy Polymers with Oxygen-Binding Pendent Groups*, J. Memb. Sci., 49, 15-35.
- He, Y., Yang, J., Li, H., Huang, P. (1998), *The Effect of Oxygen Carriers on Gas Transport through Polysiloxane and Ethylcellulose Membranes*, Polymer, 39, 3393-3397.

- Hsiue, G-H, Yang, J-S (1996), Polymeric Complex Membranes Bases on Styrene-Diene-Styrene Triblock Copolymers for Oxygen Enrichment, *Pol. Adv. Technol.*, 7, 686-692.
- Johnson, B.M. et al., (1987), *Liquid Membranes for the Production of Oxygen-Enriched Air-II. Facilitated-Transport Membranes*, *J. Memb. Sci*, 31, 31-67.
- Kaim, W., Schwederski, B., *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life: An Introduction and Guide*, John Wiley & Sons, England, 1994.
- Kawakami, M., Iwanaga, H., Iwamoto, M., Kagawa, S. (1982), *The Transport of Oxygen Facilitated by a Cu'-Tetraethylenepentamine System*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1396-1398.
- Kemperman, A. (1995), *Stabilization of Supported Liquid Membranes*, Tese de doutorado, Univ. Twente, Holanda.
- Leung, R., Poncelet, D., Neufeld, R. J. (1997), *Enhancement of Oxygen Transfer Rate Using Microencapsulated Silicone Oils as Oxygen Carriers*, *J. Chem Tech. Biotechnol.*, 68, 37-46.
- Majundar, S., Guha, A. K., Sirkar, K. K. (1988), *A New Liquid Technique for Gas Separation*, *AIChE J.*, 34 (7), 1135-1145.
- Matson, S. L. et al. (1986), *Membrane Oxygen Enrichment-II. Economic Assessment*, *J. Membr. Sci*, 29, 79-96.
- Matson, S. L., Lonsdale, H. (1987), *Liquid Membranes for the Production of Oxygen-Enriched Air-III. Process Design and Economics*, *J. Memb. Sci*, 31, 69-87.
- Nakano, M., Takahashi, K., Takeuchi, H. (1987), *A Method for Continuous Operation of Supported Liquid Membranes*, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 20(3), 1987.
- Niederhoffer, E. C., Timmons, J. H., Martell, A E.,(1984) *Thermodynamics of Oxygen Binding in Natural and Synthetic Dioxygen Complexes*, *Chem. Rev.*, 84, 137-203.
- Nishide, H. et al. (1986), *Highly Selective Transport of Molecular Oxygen in a Polymer Containing a Cobalt Porphyrin Complex as a Fixed Carrier*, *Macromolecules*, 19(2), 494-496.

- Nishide, H. et al. (1987) *Oxygen Transport Behavior through the Membrane Containing a Fixed Carrier and Adhered to a Second Polymer*, *Macromolecules*, 20, 2312-2313.
- Nishide, H. et al. (1988) *Oxygen Binding and Transport in the Membrane of Poly[[tetrakis(methacrylamidophenyl)porphinato]Cobalt-co-hexylmethacrylate]*, *Macromolecules*, 21, 2910-2913.
- Nishide et al., (1990), *Enhanced Stability and Facilitation in the Oxygen Transport through Cobalt Porphyrin Polymer Membranes*, *Macromolecules*, 23, 3714-3716.
- Noble, R. D. (1990), *Analysis of Facilitated Transport with Fixed Site Carrier Membranes*, *J. Memb. Sci.*, 50, 207-214.
- Park, S., Mathur, V. K., Planalp, R. (1998), *Syntheses, Solubilities and Oxygen Absorption Properties of New Cobalt(II) Schiff-base Complexes*, *Polyhedron*, 17(2-3), 325-330.
- Rodwell, V. W. (1996), *Proteins: Myoglobin and Hemoglobin* in: *Harrper's Biochemistry*, Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, D. K., Rodwell, V. W. (ed.), 24th ed., Connecticut, USA.
- Ruaan, R-C, Chen, S-H, Lai, J-Y (1997), *Oxygen/Nitrogen Separation by Polycarbonate/Co(SalPr) Complex Membranes*, *J. Memb. Sci.*, 135, 9-18.
- Scholander, P. F. (1960), *Oxygen Transport through Hemoglobinn Solution*, *Science*, 131, 585-590.
- Suzuki, T. et al. (1994), *Effect of Carrier Concentration on the Facilitated Oxygen Transport in a Polymer Membrane*, *Polym. Adv. Tecnh.*, 55, 253-256.
- Suzuki, T., Soejima, Y., Nishide, H., Tsuchida, E. (1995), *Effect of an Oxygen-Binding Reaction at the Cobalt Porphyrin Site Fixed in a Polymer Membrane on Facilitated Oxygen Transport*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 68, 1036-1041.
- Suzuki, T et al. (1996), *Electrochemical Measurement of Facilitated Oxygen Transport through a Polymer Membrane Containing Cobaltporphyrin as a Fixed Carrier*, *J. Memb. Sci.*, 112, 155-160.
- Takeuchi, H., Takahashi, K., Goto, W. (1987), *Some Observations on the Stability of Supported Liquid Membranes*, *J. Memb. Sci.*, 34, 19-31.

- Tsuchida, E. et al. (1987), *Facilitated Transport of Molecular Oxygen in the Membranes of Polymer-Coordinated Cobalt Schiff Base Complexes*, *Macromolecules*, 20, 1907-1912.
- Ward, b., Ching-Bore, W., Chang, C. K. (1981), *Nonbonding Steric Effect on CO and CO₂ Binding to Hemes. Kinetics of Ligand Binding in Iron-Copper Cofacial Diporphyrins and Strapped Hemes*, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 5236-5238.
- Wang, C-C et al. (2000), *Permeation of Oxygen/Nitrogen in Cobalt-Chelated Copoly(EDTA-MMA-BA) Membranes*, *J. Memb. Sci.*, 177, 189-199.
- Way, J. D, Noble, R. D., *Facilitated Transport* in: *Membrane Handbook*, Ho, W. W. S., Sirkar, K. K., Rhinhold, v. N. (ed.), N.Y., 1992.
- Wittenberg, J. (1966), *The Molecular Mechanism of Hemoglobin-facilitated Oxygen Transport*, *J. Biol. Chem.*, 241, 104-114.
- Zha, F. F., Fane, A. G., Fell, C. J. D., Schofield, R. W. (1992), *Critical Displacement Pressure of a Supported Liquid Membrane*, *J. Memb. Sci.*, 75, 69-80.
- Zolandz , R. R, Fleming, G, *Facilitated Transport* in: *Membrane Handbook*, Ho, W. W. S., Sirkar, K. K., Rhinhold, v. N. (ed.), N.Y., 1992.

C ONCLUSÕES E SUGESTÕES

Processos com membranas têm sido aplicados na separação de uma variedade de misturas gasosas, concentrando muitos esforços no desenvolvimento de membranas com boas características de permeabilidade e seletividade. Dentre as aplicações nessa área, o fracionamento do ar para obtenção de oxigênio em elevadas concentrações é de especial interesse, considerando-se seu enorme mercado e as vantagens apresentadas em relação aos processos convencionais.

A separação O_2/N_2 utilizando membranas já é empregada na obtenção de oxigênio com baixo grau de pureza (inferior a 85 %), o qual encontra aplicação principalmente na área clínica e em alguns tipos de indústrias. As membranas de transporte facilitado constituem uma real possibilidade de aumento simultâneo da permeabilidade e seletividade e, por isso, têm sido amplamente investigadas. Muitos tipos de transportadores de oxigênio têm sido estudados, a maiorias deles são variações de complexos do tipo base de Schiff ou porfirina contendo cobalto como metal de ligação.

No entanto, as reações de obtenção desses complexos em geral são trabalhosas, envolvendo muitas etapas de separação e purificação. Além disto, as moléculas resultantes apresentam problemas de falta de estabilidade nas condições de operação, limitando seu uso, muitas vezes, a temperaturas bem reduzidas. Ainda assim, o transportador exibe um número limitado de ciclos reversíveis de oxigenação/desoxigenação, decorrente da oxidação irreversível do metal de ligação do O_2 .

Por outro lado, a hemoglobina é um abundante e eficiente transportador de oxigênio a temperatura ambiente e foi o primeiro testado em membranas de transporte facilitado ainda na década de 60. Neste trabalho, investigou-se o uso de mioglobinas e hemoglobinas como transportadores de oxigênio em membranas de transporte facilitado. Essas proteínas também sofrem oxidação e a forma férrica da proteína não transporta O₂. As estratégias investigadas visando obter uma maior estabilidade contra a oxidação foram a construção de proteínas recombinantes e a substituição do metal por cobalto.

As principais conclusões observada na etapa de estabilização da mioglobina foram:

- Os resultados obtidos em termos de rendimento em massa celular (4 g/L) e de proteína (1 mg/L) são fatores limitantes ao desenvolvimento do processo proposto. Tendo em vista a aplicação pretendida neste trabalho, que é a produção em larga escala da mioglobina, uma elevação do nível de expressão não é apenas desejável como também determinante da viabilidade técnica e econômica desse processo.
- A substituição por cobalto resultou em um grande avanço na estabilização da mioglobina. Enquanto o tempo de meia-vida para uma FeMb selvagem foi de apenas 13 h, na correspondente CoMb o mesmo foi superior a 96 h.
- Com relação às mutantes, a mioglobina 29F68F apresentou uma redução significativa na taxa de autooxidação, que foi 3,5 vezes menor que no caso da MbWT. No caso da mioglobina 29F, apenas uma pequena melhoria na taxa de autooxidação foi observada a 37 °C com relação à proteína selvagem ($k_{OX_{29F}} = 2/3 k_{OX_{WT}}$). No entanto, sabe-se que a estabilização dessa mutação na temperatura de 25 °C pode ser muito superior ($k_{OX_{29F}} = 1/10 k_{OX_{WT}}$), como discutido anteriormente.
- No teste comparando a estabilidade da mioglobina em solução a 25 °C e a 7 °C, observou-se que, na menor temperatura, a mioglobina apresentou uma vida útil no mínimo 10 vezes maior. Além disso, analisando-se a estabilidade da proteína imobilizada, observou-se uma redução na taxa de oxidação de cerca de 3 vezes.
- Assim, utilizando conjuntamente todas as medidas que promoveram a estabilização da mioglobina (mutante + cobalto + temperatura + imobilização) é possível reduzir a taxa de oxidação da proteína em cerca de 2400 vezes. Isto significa que o tempo de meia-

vida da mioglobina poderia ser aumentado de algumas horas para uma incrível marca de aproximadamente 35000 horas, ou, equivalentemente, 4 anos.

Com relação á produção das membranas, as principais conclusões foram: .

- Os resultados obtidos com as membranas líquidas contendo mioglobina foram bastante expressivos. Para a pressão de 3 cmHg, obteve-se uma permeabilidade ao O₂ de 1600 Barrer e uma seletividade de 21, superior às relatadas na literatura nas mesmas condições.

- As membranas de PVA contendo mioglobina exibiram uma permeabilidade ao O₂ de aproximadamente 237 Barrer, para uma pressão parcial de aproximadamente 2,8 cmHg. Nesta mesma pressão, a permeabilidade efetiva da membrana líquida (permeabilidade observada dividida pela área de permeação) foi de 319 Barrer, ligeiramente superior. No entanto, deve-se considerar que a espessura das membranas produzidas pode ser consideravelmente reduzida. Com isso, fluxos muito maiores podem ser obtidos.

- Assim, a imobilização da mioglobina trouxe os seguintes benefícios:

- ✓ membranas com maior estabilidade operacional
- ✓ membranas regeneráveis
- ✓ propriedades de transporte comparáveis à membrana líquida
- ✓ melhoria na estabilidade da mioglobina

Deve-se notar que, nos testes de permeação com membranas, utilizou-se mioglobina nativa com bons resultados, os quais podem ser significativamente melhorados empregando-se as proteínas recombinantes contendo cobalto. No entanto, cabe ressaltar que os resultados obtidos nesse trabalho trazem uma grande contribuição à melhoria na permeabilidade e seletividade de membranas para separação de oxigênio. Um grande avanço foi também obtido em direção à estabilização da mioglobina.

Assim, com base nos resultados obtidos, podem-se destacar as seguintes sugestões para estudos futuros:

Desenvolvimento de novos métodos de expressão

O custo de produção da mioglobina está diretamente relacionado ao nível de expressão da mesma pela célula bacteriana, que, por sua vez, é determinado por vários fatores

como eficiência do promotor, seleção dos códons, taxa de síntese do hemin, estabilidade intrínseca da apoproteína, entre outros. Como sugestão, inclui-se a investigação de outras células como *Pichia pastoris*, conhecida pelo elevado nível de expressão para algumas proteínas, inclusive a mioglobina, em substituição a *Escherichia coli*, bem como diferentes vetores e sistemas de clonagem.

Novas mutantes

Das proteínas estudadas, a Mb29F exibiu a menor taxa de oxidação. No entanto, sua apoproteína não apresenta boa estabilidade. Por outro lado, a mutação na posição 68 (Mb68F) resulta em elevada expressão e melhoria na estabilidade contra oxidação. Sabe-se, também, que uma globina bastante estável pode ser obtida diminuindo-se a polaridade da cavidade distal e preenchendo as cavidades internas com substituições aromáticas, como discutido no Capítulo 4. Assim, novas mutantes poderiam ser construídas e investigadas, dentre as quais pode-se citar a Mb29F68F88A, uma mioglobina mais estável em todos os aspectos.

Estabelecimento de melhores métodos de cultivo em biorreatores

Neste trabalho, as proteínas recombinantes foram produzidas por cultivo das células em batelada. Em testes preliminares realizados com o modo contínuo, observou-se uma reversão da mutação com o tempo, resultando no crescimento preferencial da cepa selvagem da bactéria. Tal fato foi atribuído a uma perda da capacidade seletiva ocasionada, possivelmente, por uma concentração insuficiente de antibiótico no meio de cultivo. Desta forma, a produção em larga escala deve ser precedida de uma investigação minuciosa do efeito do escalonamento do equipamento e do modo contínuo de operação na produtividade das células em termos de proteína recombinante.

Preparo de membranas contendo mioglobina recombinante

A possibilidade de regeneração das membranas de PVA deve ser melhor caracterizada.

Além disto, um melhor desempenho dessas membranas em termos de fluxo pode ser esperado diminuindo-se a espessura de espalhamento da mesma. As membranas densas utilizadas devem ser substituídas por membranas anisotrópicas com pele densa contendo a proteína imobilizada. Estas podem ser preparadas pelo processo convencional de cobrimento, em duas etapas, ou pela técnica de espalhamento simultâneo de duas

soluções poliméricas. Por exemplo, diminuindo-se a espessura da membrana de PVA, de 40 μm - tipicamente obtidos - para um pele de 0,5 μm , o fluxo total é aumentado em 80 vezes.

Nessas membranas, a influência da concentração de mioglobina na permeabilidade e seletividade ao O_2 , bem como o efeito do agente plastificante (glicerol) na estabilidade das mesmas com relação à oxidação, não foram aprofundados nesse trabalho e devem ser melhor caracterizados.