



Propriedades de sistemas coloidais: efeito do pH, da
concentração e do tipo de sal

Livia Assumpção Moreira

Monografia em Engenharia Química

Orientador

Prof^o Frederico Wanderley Tavares, D.Sc.

Dezembro de 2005

PROPRIEDADES DE SISTEMAS COLOIDAIIS: EFEITO DO pH, DA CONCENTRAÇÃO E DO TIPO DE SAL

Livia Assumpção Moreira

Monografia em Engenharia Química submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

Affonso Carlos S. da Silva Telles, Ph.D.

Márcio José E. M. Cardoso, Ph.D.

Cristiano Piacsek Borges, D.Sc.

Orientado por:

Frederico Wanderley Tavares, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Dezembro de 2005

Moreira, Livia Assumpção.

Propriedades de sistemas coloidais: efeito do pH, da concentração e do tipo de sal/Livia Assumpção
Moreira. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2005.

ix, 70p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química. 2005.

Orientador: Frederico Wanderley Tavares.

1. Potencial de dispersão iônica. 2. Efeitos de Hofmeister. 3. Segundo coeficiente do virial. 4.
Monografia (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Frederico Wanderley Tavares. I. Título.

Aos meus pais.

Não serei o poeta de um mundo caduco.
Também não cantarei o mundo futuro.
Estou preso à vida e olho meus companheiros.
Estão taciturnos mas nutrem grandes esperanças.
Entre eles, considero a enorme realidade.
O presente é tão grande, não nos afastemos.
Não nos afastemos muito, vamos de mãos dadas.

...

O tempo é a minha matéria, o tempo presente, os homens presentes,
a vida presente.

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, da alegria e da paz.

À minha família pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao Prof^o Frederico Tavares pela amizade, paciência, apoio e dedicação.

Aos meus amigos pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Simulação Molecular pelo companheirismo e apoio.

Ao Mathias Boström pela ajuda e cooperação.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram nesta jornada.

Resumo da Monografia apresentada a Escola de Química como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

PROPRIEDADES DE SISTEMAS COLOIDAIIS: EFEITO DO pH, DA CONCENTRAÇÃO E DO TIPO DE SAL

Livia Assumpção Moreira

Dezembro, 2005

Orientador: Frederico Wanderley Tavares, D.Sc.

Embora o uso de colóides e sistemas coloidais seja milenar e sua identificação seja centenária, diversas teorias e abordagens quantitativas desses sistemas e de suas interações estão se desenvolvendo e evoluindo nos últimos tempos. A teoria clássica DLVO foi um grande avanço na época de sua formulação, uma vez que tratava as interações eletrostáticas e de dispersão entre macro-partículas como interações de mesma magnitude. Ressalta-se, porém, que tal teoria só considerava as interações eletrostáticas entre íons e macro-partículas. O objetivo do presente trabalho é avaliar como a consideração dos potenciais de dispersão entre os íons e as macro-partículas, além dos potenciais eletrostáticos clássicos, pode auxiliar na elucidação de resultados experimentais como as séries de Hofmeister.

Nesta monografia, diversas propriedades físico-químicas dos sistemas coloidais serão estudadas de modo a avaliar o impacto e as consequências da consideração das interações de dispersão entre íons e macro-partículas de forma auto-consistente com a equação de Poisson-Boltzmann não-linear, escrita segundo a abordagem de Stern-Gouy-Chapman.

Através da consideração das interações de dispersão originárias das polarizabilidades dos íons e das proteínas em solução e da regulação de cargas em uma superfície protéica, avaliou-se o comportamento do potencial de campo médio e seu efeito sobre as concentrações dos íons nas proximidades da superfície de uma dada proteína. E, considerando as interações de dispersão originárias das polarizabilidades dos íons em solução, em conjunto com a equação de Poisson-Boltzmann, é apresentada uma metodologia simplificada de cálculo do segundo coeficiente do virial para pares de proteínas. Os resultados são comparáveis com os dados experimentais da literatura e mostram que as Séries de Hofmeister dependem do pH da solução em relação ao pH do ponto isoelétrico da proteína.

Constatou-se que a inclusão das interações de dispersão entre íons e macro-partículas são relevantes em termos de propriedades físico-químicas, de modo que desempenham um papel fundamental na interpretação de propriedades de sistemas biológicos e coloidais e podem fornecer informações relevantes para o desenvolvimento de processos químicos e bioquímicos.

ÍNDICE

CAPÍTULO I – Introdução	1
CAPÍTULO II – Revisão Bibliográfica	8
II.1. As peculiaridades dos sistemas protéicos	9
II.2. A evolução dos modelos de dupla camada elétrica	11
II.3. Interações entre partículas coloidais	13
II.3.1. Especificidade iônica	18
II.3.2. Forças de hidratação, estruturais e de solvatação	20
II.3.3. Forças de flutuação e estéricas	20
II.4. A teoria de Poisson-Boltzmann impelida pela especificidade iônica	21
CAPÍTULO III – Os efeitos de Hofmeister: Por que a carga da proteína, a curva de titulação e a precipitação da proteína dependem da escolha do sal da solução - Hofmeister Effects: Why Protein Charge, pH Titration and Protein Precipitation Depend on the Choice of Background Salt Solution	25
III.1. Introduction	27
III.1.1. Biological stimulus	27
III.1.2. The Poisson-Boltzmann equation	28
III.2. Theory	30
III.3. Results and Discussion	33
III.3.1. Comparison between Monte Carlo simulations and Poisson-Boltzmann equation	33
III.3.2. Electrostatic potential and concentration profiles	34
III.3.3. Effect of ionic dispersion forces and ionic strength	34
III.3.4. Surface excess of the counterion	36
III.4. Conclusions	37
III.5. Acknowledgments	38
III.6. References	38
CAPÍTULO IV – Estimativa do segundo coeficiente osmótico de virial: Efeito da interação de dispersão íon-proteína	40
IV.1. Introdução	41

IV.2. Descrição do Modelo.....	42
IV.3. Resultados e Discussões.....	46
IV.3.1. Interação entre lisozima-lisozima.....	46
IV.3.1.1. Efeito da concentração salina e do pH.....	46
IV.3.1.2. Efeito de especificidade iônica agindo nas seqüências de Hofmeister.....	48
IV.3.2. Interação entre proteínas diferentes.....	50
IV.3.2.1. Interação entre lisozima e albumina de soro bovino.....	51
IV.3.2.2. Interação entre lisozima e ovalbumina.....	53
IV.4. Conclusões	55
CAPÍTULO V – Conclusões Gerais e Sugestões para trabalhos futuros.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
APÊNDICE A.....	65

Capítulo I

Introdução

Capítulo I – Introdução

Sistemas coloidais estão presentes em nosso cotidiano desde as primeiras horas do dia, na higiene pessoal, sabonete, xampu, pasta de dente, espuma, creme de barbear, maquiagem, cosméticos, no café da manhã, no leite, café, manteiga, cremes vegetais e geléias de frutas. No caminho para o trabalho podemos enfrentar neblina, poluição do ar ou ainda apreciar a cor azul do céu, parcialmente explicada pelo espalhamento Rayleigh da luz do Sol ao entrar na atmosfera contendo partículas de poeira cósmica atraídas pela Terra (Walker, 1989). No almoço, temperos, cremes e maionese para saladas. No entardecer, ao saborear cerveja, refrigerante ou sorvete estamos ingerindo colóides (Junior e Varanda, 1999). Os colóides também estão presentes em diversos processos de produção de bens de consumo, incluindo o da água potável, nos processos de separação nas indústrias de biotecnologia e no tratamento do meio ambiente. Os fenômenos coloidais são encontrados com frequência em processos industriais como de plásticos, borrachas, tintas, detergentes, papel, análise do solo, produtos alimentícios, tecidos, precipitação, cromatografia, troca iônica, flotação, catálise heterogênea. São também muito importantes os colóides biológicos, tais como o sangue, o humor vítreo e o cristalino (Licínio e Delaye, 1987). Em medicina terapêutica ortomolecular, conhecimentos de propriedades de sistemas coloidais podem auxiliar na elucidação de doenças, como o mal de Alzheimer (Lomakin et al., 1997), o mal de Parkinson (Conway et al., 2000) e o mal de Huntington (Heiser et al., 2000). Acredita-se que o processo de agregação de proteínas decorrente de alguma deformação em sua estrutura, quando ocorre na região cerebral, cause os sintomas dessas doenças degenerativas.

Os sistemas coloidais vêm sendo utilizados pelas civilizações desde os primórdios da humanidade. Os povos utilizaram géis de produtos naturais como alimento, as dispersões de argilas para a fabricação de utensílios de cerâmica e as dispersões coloidais de pigmentos para decorar as paredes das cavernas com motivos de animais e caças (Quagliano e Vallarino, 1979).

Em 1860, o químico britânico Thomas Graham descobriu que substâncias como o amido, a gelatina, a cola e a albumina do ovo difundiam-se muito lentamente quando colocadas em água, ao contrário de outras substâncias como o açúcar e o sal de cozinha. Além disso, aquelas substâncias eram muito diferentes destas no que se refere à difusão através de membranas delgadas: enquanto as moléculas de açúcar, por exemplo, difundiam-se com facilidade através de muitas membranas, as moléculas grandes que constituíam o amido, a gelatina, a cola e a albumina não se difundiam. Graham descobriu, também, que estas últimas substâncias não se cristalizavam enquanto era fácil cristalizar o açúcar, o sal de cozinha e outros materiais que formavam soluções verdadeiras (Kotz e Treichel, 1998). Sabe-se, hoje, que ainda que haja algumas dificuldades, certas substâncias coloidais podem ser cristalizadas, e que não há, na realidade, fronteira nítida entre as soluções

verdadeiras e os sistemas coloidais. Para denominar a nova classe que era identificada, Graham propôs o termo *colóide* (do grego *kolla*, cola).

A ciência dos colóides se ocupa com sistemas nos quais um ou mais componentes apresentam pelo menos uma de suas dimensões dentro do intervalo de 1nm a 1µm (Shaw, 1975), ou seja, ela se refere a sistemas contendo tanto moléculas grandes como partículas pequenas. Coloquialmente, diz-se que as dispersões coloidais são dispersões intermediárias entre as soluções verdadeiras e os sistemas heterogêneos, em casos onde as partículas dispersas são maiores do que as moléculas mas não suficientemente grandes para se depositar pela ação da gravidade. Embora o intervalo da escala coloidal seja pequeno em relação à escala total de interesse da indústria química (Fig. I.1), as idéias inerentes desenvolvidas para a teoria coloidal podem ser usadas em diferentes escalas.

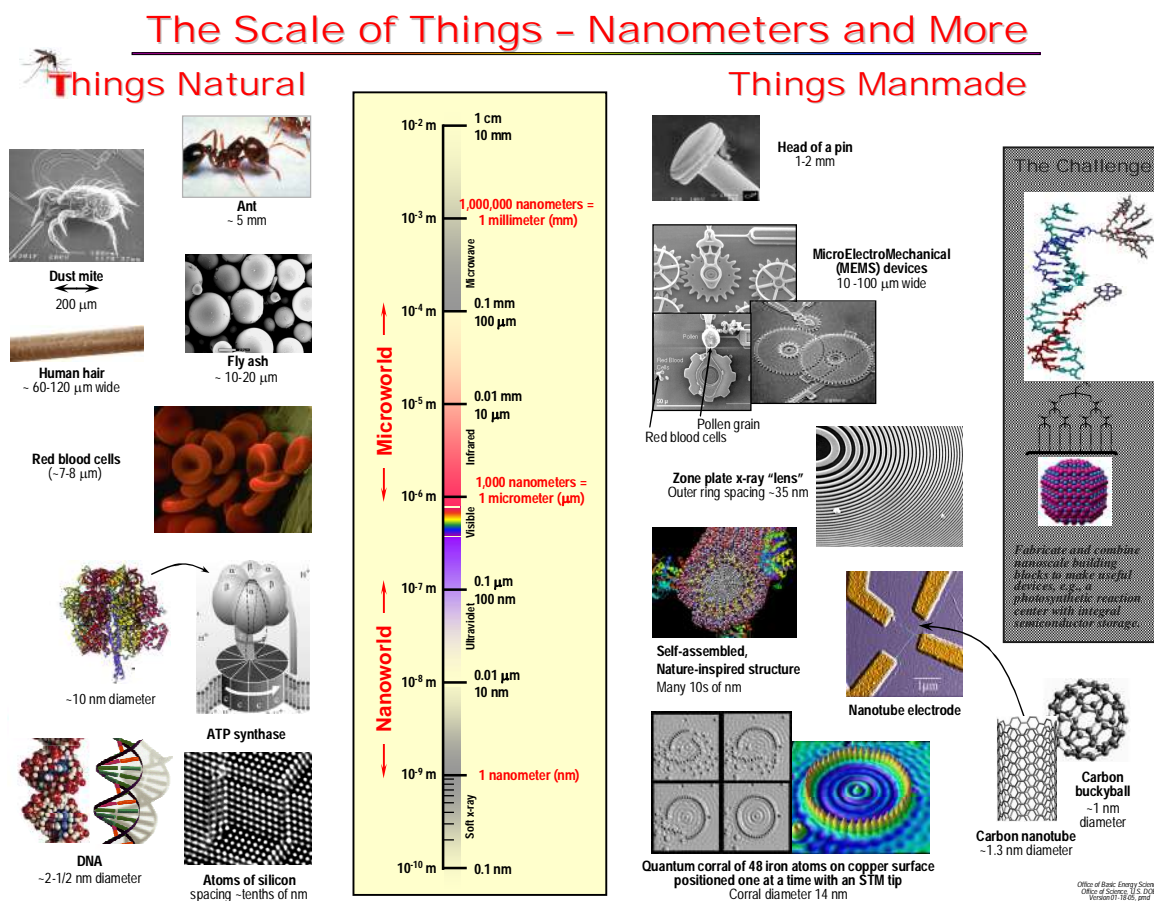


Figura I.1: Tamanhos característicos (escala) das coisas. Os fenômenos coloidais aparecem em sistemas com partículas em torno de 1nm a 1µm. *Fonte:* www.science.doe.gov/bes/scale_of_things.html

Os colóides têm, em geral, características específicas como possuir massa elevada, serem relativamente grandes e apresentarem elevada relação área/volume de partícula. Nas superfícies de separação (interfaces) entre fase dispersa e meio de dispersão, manifestam-se fenômenos de

superfície característicos, tais como efeitos de adsorção e dupla camada elétrica, fenômenos esses, de grande importância na determinação de propriedades físico-químicas do sistema como um todo.

A natureza interdependente dos fenômenos em escala coloidal integra conhecimentos de diversos ramos da ciência; tais conhecimentos têm o intuito de desenvolver a compreensão de sistemas coloidais e suas propriedades.

Os sistemas coloidais estão disseminados por vários setores da nossa economia, como na indústria de petróleo, química, farmacêutica, biotecnológica e de alimentos. A seguir, apresentam-se alguns exemplos de como o estudo das interações coloidais se inserem nos setores de atividade da Indústria Química.

No processo de produção e refino de petróleo há a manipulação de grandes volumes de água que tendem a aumentar à medida que se aproxima a fase madura do campo explorado. Logo, há a necessidade do desenvolvimento de procedimentos para gerenciamento adequado da injeção, tratamento, reinjeção e descarte de água produzida, por se tratar de atividades impactantes no custo, no fator de recuperação e no controle da poluição ambiental.

Geralmente, o petróleo e a água encontram-se no fundo do poço, ainda sob a forma de duas fases separadas. Ao escoarem através das tubulações de produção, essas fases são submetidas a agitação e cisalhamento, promovendo a dispersão de uma fase em outra, dando origem a diminutas gotas. A presença de surfactantes naturais no petróleo (asfaltenos, resinas, ácidos naftênicos etc), de caráter lipofílico dominante, propicia a formação de emulsões de petróleo do tipo água em óleo. Esses surfactantes migram para as interfaces óleo-água, formando filmes, uma espécie de barreira que impede a coalescência das gotas, dando origem a emulsões estáveis. O processamento primário do petróleo, realizado ainda nas plataformas, consiste na separação do óleo, do gás, da água e das impurezas em suspensão, condicionando o óleo a ser transferido para as refinarias. É necessário, também, o tratamento da água para reutilização ou descarte.

Sob o aspecto ambiental, é essencial que o tratamento tecnologicamente adequado para os efluentes gerados durante todo o processo de exploração e refino do petróleo, satisfaça não apenas às expectativas dos investidores e acionistas, mas também seja suficiente para responder as exigências ambientais impostas pela sociedade através dos órgãos reguladores. Pois, se por um lado a ação do homem proporciona e oferece efeitos de dinamização sócio-econômica de importância local, nacional e mundial, por outro lado possibilita perturbações à sua qualidade de vida, transformando os recursos naturais e os elementos contidos na biosfera, a fauna, a flora, a vida biológica, água, ar, solo, e etc., em escalas sempre crescentes.

Já a indústria química-biotecnológica se apropria dos conhecimentos dos sistemas coloidais aplicando-os em tecnologias industriais, como fermentação e purificação de proteínas, para a geração de produtos diversos como farmacêuticos, alimentícios, enzimáticos etc.

O entendimento de como as condições da solução influenciam as interações entre proteínas são informações fundamentais para projetos biotecnológicos, onde a aplicação de células e moléculas para solucionar problemas, conduzir pesquisas e criar produtos e serviços, inclui uma diversa coleção de tecnologias para manipular células, sub-células ou componentes moleculares em organismos vivos, para produção ou descoberta de novos conhecimentos sobre as bases moleculares e genéticas da vida ou para modificar plantas, animais e microorganismos, sendo que vários dos fenômenos importantes nesta área estão em escala coloidal.

A flotação é um processo de separação de partículas coloidais (minerais ou células microbianas) de grande importância em tecnologia de separação, em minerais, processos químicos e também em biotecnologia, e de grande capacidade de separação seletiva da matéria. A separação dos microorganismos, realizada por flotação das células, é efetuada borbulhando-se ar no meio. As células de um tanque de tratamento de esgoto, por exemplo, são capturadas pelas bolhas de ar formando uma espuma que é retirada da superfície do esgoto e, por lavagem, as células flotadas são recuperadas. A flotação envolve conceitos de química de superfícies, e neste contexto, aplicações biotecnológicas em processos industriais de interesse de profissionais engenheiros, químicos, biólogos, entre outros.

O desenvolvimento de competências em bioprocessos considerando os aspectos de engenharia para projeto, operação e automação de biorreatores, de sistemas de separação e purificação de produtos, bem como de inativação e formulação de antígenos é crucial para o estabelecimento de uma bioindústria competitiva.

Embora o uso de colóides e sistemas coloidais seja milenar e sua identificação seja centenária, teorias e abordagens quantitativas desses sistemas e de suas interações estão se desenvolvendo e evoluindo nos últimos tempos. A teoria da dupla camada elétrica foi pioneira na tentativa do tratamento quantitativo baseado na equação de Poisson-Boltzmann, mas é a teoria DLVO que, a quase meio século, vem fundamentando grandes discussões e estruturando importantes progressos. A teoria clássica DLVO foi um grande avanço na época de sua formulação, uma vez que tratava as interações eletrostáticas e de dispersão entre macro-partículas como interações de mesma magnitude. Ressalta-se, porém, que tal teoria só considerava as interações eletrostáticas entre íons e macro-partículas. Estudos recentes indicam que as interações de dispersão entre íons e macro-partículas são relevantes às propriedades dos sistemas coloidais. Sendo assim, nesta monografia, diversas propriedades físico-químicas dos sistemas coloidais serão estudadas de modo a avaliar o impacto e as consequências da consideração das interações de dispersão entre íons e macro-partículas usando a equação de Poisson-Boltzmann não-linear segundo a abordagem de Stern-Gouy-Chapman.

Neste contexto, os objetivos desta monografia são:

- Calcular o potencial de campo médio através da resolução da equação de Poisson-Boltzmann usando condições de contorno apropriadas a cada sistema, como a regulação de carga em uma superfície protéica.

- Avaliar o efeito de íons específicos no potencial de campo médio entre partículas coloidais para superfícies carregadas com cargas especificadas.

- Verificar o efeito do pH sobre a distribuição de íons próximos à superfície e sobre o potencial de campo médio.

- Investigar os efeitos de inclusão do potencial de dispersão iônica entre os íons e superfícies carregadas (i.e. proteínas) avaliando o efeito da polarizabilidade de íons específicos na concentração destes íons na proximidade da superfície.

- Relacionar a dependência do potencial de campo médio com o tipo de sal usado e os efeitos de Hofmeister para precipitação e coagulação de proteínas, oferecendo uma explicação à série de Hofmeister relativa a especificidade iônica do sal da solução.

- Estimar o segundo coeficiente osmótico do virial através do potencial obtido pela equação de Poisson-Boltzmann através de hipóteses simplificadoras.

- Investigar a efetividade relativa de vários íons sobre propriedades de soluções protéicas que seguem a seqüência direta ou inversa de Hofmeister de acordo com sua posição relativa entre o pH do meio e o pH do ponto isoeletrico da proteína.

Após este capítulo de introdução que trata de aspectos gerais, o Capítulo II apresentará uma revisão bibliográfica sobre os principais temas desenvolvidos nesta monografia.

No Capítulo III será visto como a consideração das interações de dispersão originárias das polarizabilidades dos íons e proteínas em solução e da regulação de cargas em uma superfície protéica modifica o potencial de campo médio, afetando as concentrações dos íons nas proximidades da superfície da proteína. O Capítulo III foi desenvolvido em cooperação com Mathias Boström, Barry W. Ninham, Evaristo C. Biscaia e Frederico W. Tavares e foi aceito no periódico *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.

Levando em consideração as interações de dispersão originárias das polarizabilidades dos íons e proteínas em solução, no Capítulo IV, as interações de partículas coloidais em um campo eletrostático serão estudadas, a partir da proposição de um modelo de cálculo do segundo coeficiente do virial.

O Capítulo V apresenta as conclusões gerais do trabalho e as sugestões para trabalhos futuros nesta área.

É relevante destacar que este trabalho foi desenvolvido em parceria com o Dr. Mathias Boström da Universidade de Linköping na Suécia, que trouxe importantes contribuições para o desenvolvimento do trabalho, que contou ainda com as contribuições dos Professores Evaristo C.

Biscaia (COPPE/UFRJ, Brasil), Barry W. Ninham (Australian National University, Canberra, Australia) e John M. Prausnitz (University of California, Berkeley, USA), de grande relevância ao trabalho desenvolvido, principalmente no texto final dos artigos e nas sugestões dos temas de estudo.

Capítulo II

Revisão Bibliográfica

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

Nesta monografia os sistemas protéicos serão os sistemas coloidais majoritariamente estudados, uma vez que os sistemas biológicos apresentam a sensibilidade necessária aos efeitos, aos quais nos propõe-se analisar. Deste modo, começa-se a revisão bibliográfica com uma breve exposição das características relevantes no tratamento de sistemas protéicos. Em seguida, acompanha-se a evolução dos modelos de dupla camada elétrica que surgem na tentativa da descrição dos fenômenos coloidais sob a óptica quantitativa.

Recapitula-se as interações atuantes entre duas partículas coloidais considerando um meio de constante dielétrica uniforme e constante, abordando tanto a equação clássica DLVO como suas limitações e progressos. Então, vê-se como a teoria de Poisson-Boltzmann se ajusta à consideração dos efeitos de especificidade iônica e quais as condições físicas asseguradas no tratamento matemático.

II.1. As peculiaridades dos sistemas protéicos

Não é novidade que as pesquisas bioquímicas recentes estejam concentradas no estudo das proteínas. O termo proteína deriva do grego *proteíos*, ‘que tem prioridade’, ‘o mais importante’. As proteínas desempenham funções tão importantes às células, que seu papel central nos processos biológicos foi reconhecido desde os promórdios da bioquímica (Voet e Voet, 1995). As proteínas possuem muitas funções biológicas, entre elas, as enzimas, as proteínas transportadoras, de reserva, estruturais e de defesa.

Proteínas são biopolímeros compostos de aminoácidos interligados por ligações peptídicas. Os aminoácidos são as unidades estruturais básicas das proteínas. Um aminoácido é constituído de um grupamento amina, uma carboxila, um átomo de hidrogênio e um radical diferenciado, ligados a um átomo de carbono. Eles diferem uns dos outros através de suas cadeias laterais ou grupos radicais, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, e influenciam a solubilidade do aminoácido em água. As proteínas são compostos orgânicos de estrutura complexa e massa molecular elevada, entre 15.000 e 20.000.000 daltons. São moléculas empacotadas que adotam, em um grande número de casos, conformações globulares. As proteínas formam uma classe de macromoléculas biológicas caracterizadas por suas propriedades físico-químicas, onde o tamanho das macromoléculas protéicas, em ampla maioria dos casos, permite sua classificação como partículas coloidais.

O entendimento das interações entre proteínas passa pelo conhecimento de certas propriedades físico-químicas, como o pH. O pH é particularmente importante aos polímeros constituídos de aminoácidos, uma vez que os aminoácidos são grupos químicos passíveis de

ionização. A concentração de íons hidrônios nas proximidades da superfície protéica regula o equilíbrio ácido-base dos grupos ionizáveis das proteínas, determinando, por fim, o número total de grupos ionizados.

A proteína pode ser descrita como um simples modelo de reação química que segue a Lei de Ação das Massas, estabelecida em 1879 por Guldberg e Waage, que afirma que “a velocidade de reação é proporcional a massa de reagentes”. Essa lei estabelece que quando uma reação reversível atinge um estágio de equilíbrio, a certa temperatura, o quociente de reação é constante. Em sistemas iônicos que envolvem a dissociação de eletrólitos fracos, a constante de proporcionalidade do equilíbrio é nomeada de constante de ionização e a fração do número total de moles do eletrólito que se ioniza ou dissocia é a extensão da ionização, também conhecida como grau de dissociação. Com a dissociação do eletrólito estabelece-se um equilíbrio reversível entre as espécies não dissociadas e os seus íons (Ayres, 1970). A aplicação da Lei de Ação das Massas a sistemas protéicos, viabiliza a determinação da condição de equilíbrio com base nas respectivas constantes de ionização e, deste modo, tornando factível a determinação da magnitude de cargas de cada proteína (Fig. II.1).

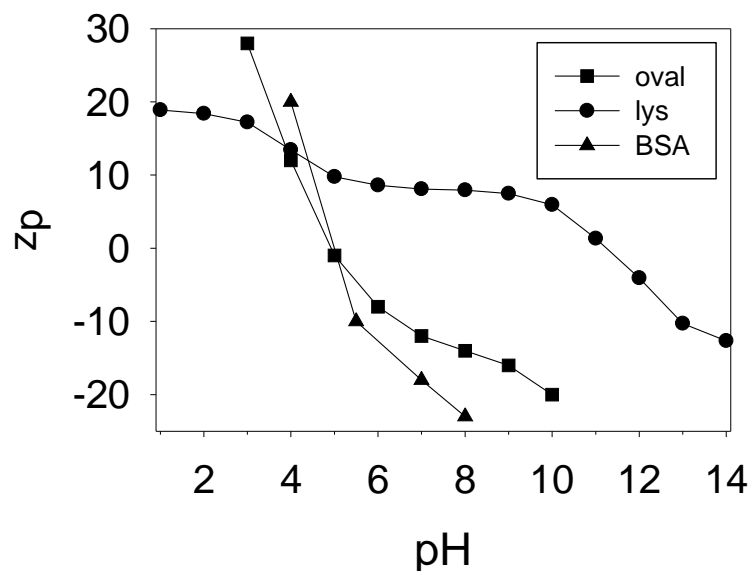


Figura II.1: Variação da carga da proteína com o pH da solução da lisozima (lys) (Grant, 2001), ovalbumina (oval) e albumina de soro bovino (BSA) (Teske et al., 2004).

As propriedades da água são altamente significantes para os sistemas biológicos. A vida como conhecemos, ocorre em ambiente aquoso. Devido a sua natureza peculiar e ocorrência generalizada, a água é frequentemente considerada um líquido inerte e inócuo, um simples preenchedor de espaço nos organismos vivos. Na realidade, a água é uma substância altamente reativa e com propriedades inusitadas que a distingue de modo marcante da maioria dos outros líquidos. Atualmente, é

largamente reconhecido que a água e seus produtos de ionização, hidrônios e hidroxilas, são fatores importantes na determinação da estrutura e das propriedades biológicas das proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, membranas e muitos outros componentes celulares.

As estruturas das moléculas fundamentais dos sistemas biológicos, resultam, diretamente ou indiretamente, das suas interações com seu ambiente aquoso. A água é um solvente que possui uma alta constante dielétrica. Sua natureza altamente polar faz com que qualquer tipo de molécula, polar ou não-polar, sofra a sua influência. As interações intermoleculares e seu entendimento ganham sua expressão máxima em sistemas biológicos onde a especificidade das interações é decorrente da complexidade estrutural das moléculas que interagem. As moléculas da vida (DNA, RNA, proteínas etc) são mantidas em suas estruturas tridimensionais através de interações intra e intermoleculares. Uma vez que a estrutura tridimensional molecular é responsável pela atividade biológica específica destas moléculas, percebe-se então, a importância do entendimento de tais interações. Um fato interessante, que até hoje não é bem entendido, o porquê ou como estas moléculas biológicas adquirem suas estruturas tridimensionais. Como exemplo, uma proteína é sintetizada em uma seqüência linear de aminoácidos que se enovela no espaço dando origem à sua estrutura tridimensional única, que irá ditar se esta proteína terá características estruturais ou enzimáticas. Um outro fato interessante a ser mencionado consiste em que a grande maioria dos processos orgânicos vitais estão relacionados com o reconhecimento molecular específico inter e intramolecular. Estes processos podem ser definidos como sendo interações fracas, usualmente reversíveis e altamente seletivas entre duas moléculas (intermolecular) ou dentro da macromolécula biológica (intramolecular). Não obstante a especial importância da estrutura peculiar da água e das interações intramoleculares entre as proteínas, nesta monografia, a água será tratada de forma simplificada, sendo considerada como um contínuo e a proteína como uma partícula coloidal homogênea e esférica.

II.2. A evolução dos modelos de dupla camada elétrica

Em meios polares ou iônicos, partículas eletricamente carregadas possuem um potencial elétrico associado. Essa propriedade afeta a distribuição espacial de íons e partículas, as propriedades reológicas e a estabilidade cinética do meio. Sendo assim, apresenta-se uma revisão dos modelos que descrevem as características elétricas, especialmente de variação do potencial e densidade de cargas (distribuição de íons) próximo a uma superfície carregada em um meio contínuo.

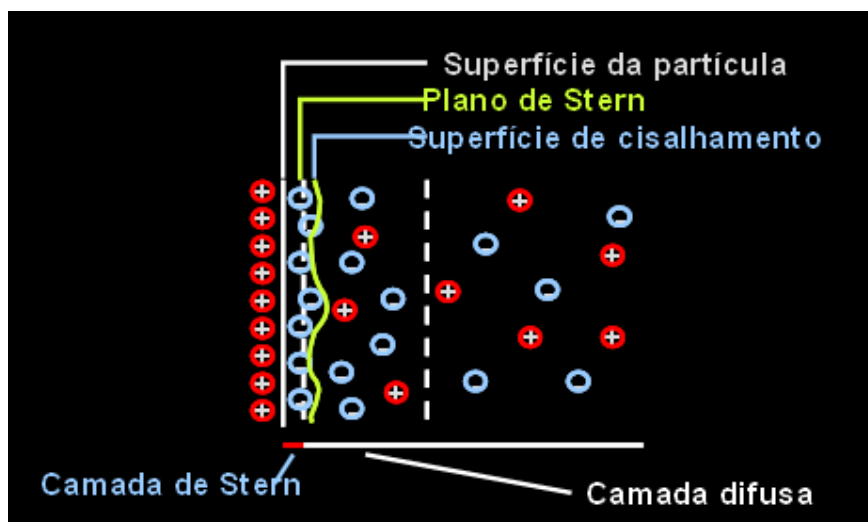


Figura II.2: Esquema da dupla camada elétrica que envolve a superfície da partícula.

Uma grande variedade de substâncias adquire cargas elétricas superficiais quando postas em contato em um meio polar por diversos mecanismos, como ionização de moléculas da superfície, dissolução de íons, adsorção iônica e defeitos da estrutura de superfície (Shaw, 1975). Essas novas cargas superficiais influenciam a distribuição das cargas iônicas em solução. Porém, o sistema como um todo continua eletricamente neutro, ou seja, há igualdade do número de cargas positivas e negativas. Para cada carga sobre a superfície ou partícula, há uma carga de sinal oposta em solução. Íons de carga oposta, os contra-íons, são atraídos pela superfície e íons de carga de mesmo sinal, os co-íons, são repelidos para mais longe da superfície. Este fato, somado à tendência à mistura provocada pela agitação térmica, leva à formação de uma dupla camada elétrica, constituída por duas partes, uma superfície carregada e um meio polar onde se distribuem co-íons e contra-íons, estes em excesso para manter a neutralidade elétrica (Fig. II.2).

Embora a natureza elétrica dos sistemas coloidais a muito fosse conhecida, a teoria da dupla camada foi a primeira abordagem quantitativa do fenômeno. De um modo geral, as teorias estruturais da dupla camada diferem entre si, principalmente, na interpretação da estrutura da camada de contra-íon e aproximam-se entre si em alguns pré-requisitos, como a consideração do meio disperso ser sempre uma fase contínua caracterizada pela constante dielétrica do meio.

A primeira abordagem de dupla camada foi a teoria de Helmholtz-Perrin (Voyutsky, 1978). De acordo com esta teoria, as cargas positivas e negativas estão ordenadas de um modo rígido nos dois lados da interface, o que deu origem à designação de camada compacta. Neste modelo, a diferença de potencial da dupla camada corresponde ao salto do potencial entre a superfície carregada e a solução. Porém, esta teoria da dupla camada compacta é insuficiente para explicar diversos fenômenos, como a dependência do potencial com a concentração e a adsorção iônica.

Um significativo avanço neste campo foi a teoria da dupla camada difusa desenvolvida independentemente por Gouy e Chapman (Shaw, 1975). Neste modelo, os contra-íons não poderiam se concentrar apenas na interface formando uma monocamada iônica, mas estariam dispersos na fase líquida. A estrutura da dupla camada difusa é determinada, por um lado, pelo campo elétrico gerado pela superfície carregada que atrai uma quantidade equivalente de contra-íons tão próximo quanto possível da superfície, e por outro, pelo movimento térmico que resulta no espalhamento dos contra-íons em todo volume líquido.

De acordo com o tratamento de Gouy-Chapman, a interação eletrostática entre as cargas do sistema é expressa através da Equação de Poisson, que relaciona o potencial elétrico com a densidade de cargas em solução considerando a constante dielétrica do meio. E a densidade de cargas é obtida pelo somatório das cargas iônicas por volume. A distribuição dos íons em solução é governada pela relação de Boltzmann. A combinação destas equações resulta em uma equação diferencial de segunda ordem que possui soluções analíticas apenas mediante hipóteses simplificadoras.

Em 1924, Stern propôs um arranjo para a estrutura da dupla camada elétrica combinando as disposições de Helmholtz-Perrin e Gouy-Chapman (Voyutsky, 1978). Na elaboração da dupla camada, Stern usou dois importantes pré-requisitos (Fig. II.2). Primeiramente, a dimensão finita dos íons na primeira camada adjacente à superfície que, conseqüentemente, impediria uma maior aproximação dos centros iônicos que um raio iônico. E, em segundo, a consideração da possibilidade de adsorção específica de íons e a localização destes íons em um plano a certa distância da superfície. Esta camada de íons adsorvidos é chamada de camada de Stern. Os íons adsorvidos especificamente são aqueles ligados a uma superfície, mesmo que temporariamente, por forças eletrostáticas ou de van de Waals suficientemente fortes para se sobreporem à agitação térmica. Estes íons adsorvidos à superfície podem estar menos hidratados devido às interações que estabelece com a superfície. Os centros de quaisquer íons adsorvidos especificamente se localizam na camada de Stern, ou seja, entre a superfície e o plano de Stern. Íons que se localizam além do plano de Stern constituem a parte difusa da dupla camada, para a qual se considera válido o tratamento de Gouy-Chapman.

II.3. Interações entre partículas coloidais

Quando moléculas, átomos ou íons aproximam-se uns dos outros, dois fenômenos podem ocorrer: (i) eles podem reagir ou (ii) eles podem interagir. Uma reação química, por definição, requer que ligações químicas sejam quebradas ou formadas. Uma interação física significa que as moléculas se atraem ou se repelem entre si, sem que ocorra a quebra ou formação de novas ligações

químicas. Estas interações são freqüentemente chamadas de interações não covalentes ou interações intermoleculares. As energias envolvidas em tais tipos de interações são muito menores que aquelas envolvidas em processos reativos.

A caracterização dos sistemas coloidais passa pela descrição das forças intermoleculares entre as macro-partículas em solução. As forças entre duas partículas em solução podem ser relacionadas a um potencial conhecido como potencial de campo médio. O potencial de campo médio é assim denominado por indicar que para quaisquer duas partículas presentes no meio, o potencial de campo médio é a energia livre média do par com respeito a todas as configurações possíveis das moléculas de solvente.

O estudo das interações entre as partículas não é um tópico recente. Desde o início do século XIX, as forças entre partículas têm sido alvo de estudos e teorias. Em 1831, Poisson afirmou que nas proximidades de uma interface em um meio líquido deveria haver um perfil não uniforme (i.e. densidade, orientação) induzido pelas interações das moléculas do líquido com a interface (Ninham, 1999). Após um longo caminho de estudos e teorias, muitas vezes conflitantes e polêmicos, a teoria DLVO de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek forneceu à ciência dos colóides e de superfície os fundamentos de um modelo quantitativo para as interações entre macro-partículas onde dois tipos de forças de natureza eletromagnéticas, as forças eletrostáticas da dupla camada e as forças atrativas de van der Waals, agem entre as partículas em função da distância entre elas.

As interações coulombianas da dupla camada têm origem nas interações elétricas das partículas carregadas. A carga elétrica, assim como a massa, é uma qualidade intrínseca da matéria e apresenta a particularidade de existir em duas variedades, convencionalmente denominada positiva e negativa. Duas cargas elétricas de mesmo sinal se repelem, e quando de sinais contrários se atraem (Fig. II.3). A força destas interações é diretamente proporcional a sua quantidade de carga e inversamente proporcional ao quadrado da distância que as separa. Para explicar a existência dessas forças adotou-se a noção de campo elétrico criado em torno de uma carga, de modo que a força elétrica que vai atuar sobre outra carga distanciada da primeira corresponde ao produto da quantidade de carga desta primeira por uma grandeza chamada intensidade de campo elétrico. A energia que este campo transmite à unidade de carga chama-se potencial elétrico e, geralmente, é medido em volts.

Assim como as interações coulombianas da dupla camada, as forças de dispersão têm origem nas interações elétricas das partículas. Porém, enquanto a natureza das interações coulombianas da dupla camada é eletrostática e atua apenas em partículas formalmente carregadas, as forças de atração de van der Waals são de natureza eletrodinâmica e atuam em todas as partículas, estejam elas carregadas ou não.

Para dois corpos eletricamente neutros e não magnéticos, mantidos a distâncias entre uma e algumas dezenas de nanômetros, predominam estas forças de atração a "grandes" distâncias. Em 1873, van der Waals postulou a existência das forças intermoleculares, que ficaram conhecidas pelo seu nome. Fritz London (Israelachvili, 1995) descreveu a natureza delas e as atribuiu ao movimento (flutuações) dos elétrons dentro das moléculas. As interações das forças de van der Waals derivadas especificamente das flutuações dos elétrons em moléculas ficaram conhecidas com o nome de London, de flutuação de cargas, eletrodinâmicas, ou de dispersão. Elas estão presentes tanto em moléculas apolares como em polares. As forças de van der Waals desempenham um papel importante em todos os fenômenos intermoleculares, embora não seja tão forte quanto as interações coulombianas ou ligações de hidrogênio, elas estão sempre presentes.

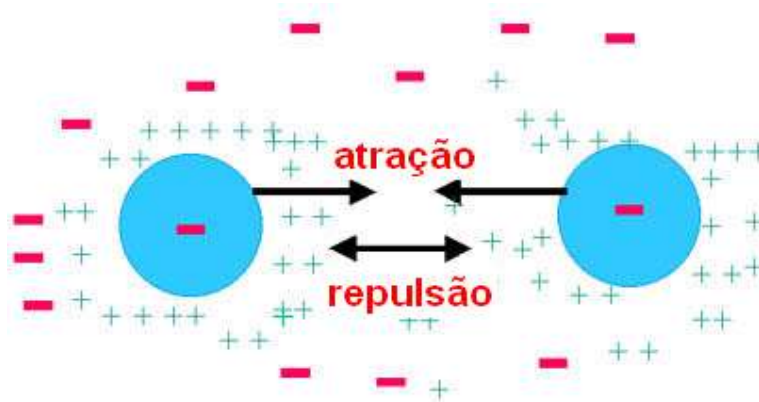


Figura II.3: Esquema das interações DLVO entre macro-partículas. Neste modelo, os íons em solução contribuem apenas para as interações eletrostáticas.

Esses dois tipos de forças são peças chaves da teoria DLVO que, há mais de meio século, vem sendo utilizada na descrição quantitativa do comportamento de dispersões coloidais. Nesta teoria, a estabilidade é tratada em termos do potencial de campo médio entre duas partículas coloidais. A teoria envolve estimativas da energia de atração (forças de van der Waals) e da energia de repulsão (superposição da dupla camada elétrica), ambas em termos da distância interpartículas macroscópicas (Fig. II.4).

O potencial de interação entre duas partículas quaisquer pode ser obtido através da soma dos potenciais de atração e repulsão.

$$W(x) = W_{el}(x) + W_{disp}(x) + W_{hs}(x) \quad (II.1)$$

onde $W_{hs}(x)$ é o potencial de esfera rígida (exclusão de volume), $W_{el}(x)$ é o potencial de repulsão (ou atração coulombiana) da dupla camada elétrica, $W_{disp}(x)$ é o potencial atrativo de dispersão de van der Waals entre duas partículas.

O potencial de esfera rígida $W_{hs}(x)$:

$$W_{hs}(x_{ij}) = \begin{cases} \infty & \text{para } x_{ij} < \frac{(\sigma_i + \sigma_j)}{2} \\ 0 & \text{para } x_{ij} \geq \frac{(\sigma_i + \sigma_j)}{2} \end{cases} \quad (\text{II.2})$$

onde x_{ij} é a distancia centro-a-centro entre as partícula i e j . O potencial de interação eletrostática:

$$W_{el}(x_{ij}) = \frac{q_i q_j}{\epsilon_o \epsilon_w x_{ij}} \text{ para } x_{ij} \geq \frac{(\sigma_i + \sigma_j)}{2} \quad (\text{II.3})$$

onde q e σ são, respectivamente, a carga e o diâmetro da partícula. O potencial de dispersão entre as partículas esféricas i e j da teoria de Hamaker (Israelachvili, 1995):

$$W_{disp}(x_{ij}) = -\frac{H_{ij}}{6} \frac{\sigma_i \sigma_j}{(\sigma_i + \sigma_j)} \frac{1}{(2x_{ij} - (\sigma_i + \sigma_j))} \text{ para } x_{ij} \geq \frac{(\sigma_i + \sigma_j)}{2} \quad (\text{II.4})$$

onde H_{ij} é o coeficiente de dispersão entre as duas partículas.

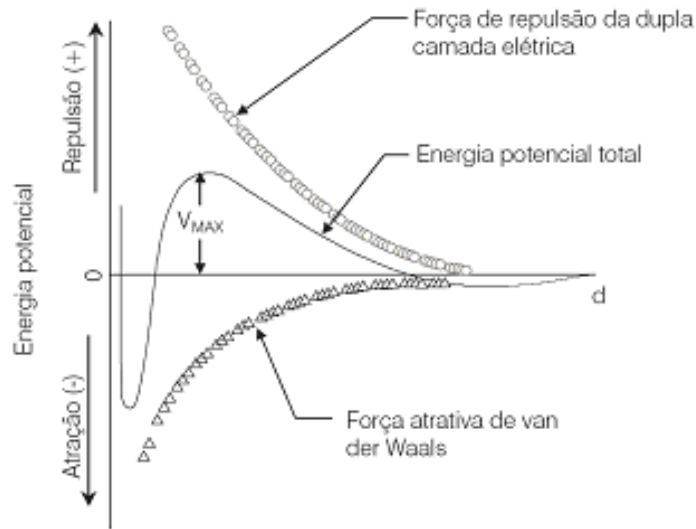


Figura II.4: Teoria de interação DLVO partícula-partícula em função da distância de separação entre duas partículas coloidais.

Não obstante, a teoria DLVO não é uma panacéia¹. Há limitações inerentes ao modelo tanto por hipóteses simplificadoras, por limitações intrínsecas quanto por negligência de outras forças, normalmente chamadas de não-DLVO. Quando duas partículas ou superfícies se aproximam a distâncias menores que poucos nanômetros, as teorias contínuas como a de superposição das duplas

¹ o remédio para todos os males

camadas elétricas e a atrativa de van der Waals normalmente falham na descrição das interações interpartículas. Esse fato pode decorrer da falha de uma ou de ambas as teorias contínuas a pequenas distâncias ou devido da atuação de outras forças como forças derivadas da correlação entre ions, forças de solvatação, estéricas ou de hidratação. Essas forças adicionais podem ser mononicamente repulsivas, monotonicamente atrativas ou oscilatórias, podendo ser mais fortes que as outras duas forças DLVO a pequenas distâncias, especialmente em sistemas coloidais complexos e sistemas biológicos. As interações mais importantes a serem consideradas de longo alcance entre partículas e superfícies macroscópicas em líquidos são as interações Coulombianas, de van der Waals e polímero-estérica e as interações mais importantes a serem consideradas de curto alcance são a solvatação e outras forças estéricas (Israelachvili, 1995).

Duas grandes simplificações das interações de van der Waals é assumir que as interações são não-retardadas e aditivas. A suposição de interações aditivas aos pares inerente às fórmulas e definições das interações não-retardadas de van der Waals e da constante de Hamaker ignoram a influência das partículas da vizinhança sobre a interação entre qualquer par de partículas em evidência. A polarizabilidade efetiva de uma partícula é alterada quando cercada por outras partículas. Em meios rarefeitos como em gases, esses efeitos são pequenos e a suposição de aditividade pode ser válida, mas isso não é o caso dos meios condensados. Sendo assim, a abordagem de aditividade não pode ser prontamente estendida para corpos interagindo em um meio.

Este problema da aditividade foi alvo da teoria de Lifshitz que ignora a estrutura atômica e considera que as forças entre macro-partículas sejam tratadas em um meio contínuo onde as propriedades como a constante dielétrica e o índice de refração dos corpos são definidos e não dependem da solução nem do meio.

Embora esta teoria seja conveniente para tratar a aproximação da aditividade das interações de van der Waals, ela possui limitações. Cargas superficiais suficientemente grandes geram grandes campos elétricos e altas concentrações de contra-ions próximo à superfície. Ambos estes fatores levam à diminuição da constante dielétrica próximo à superfície ou interface (Manciu e Ruckenstein, 2003).

Note-se, então, que a teoria de Lifshitz considera cada meio (partículas e meios) como contínuos e homogêneos, sendo seu uso mais adequado quando as superfícies interagentes estão mais afastadas que dimensões moleculares. A teoria de Lifshitz será utilizada neste trabalho para calcular as constantes de Hamaker, constantes essas, características das interações de van der Waals entre diferentes partículas no meio aquoso.

II.3.1. Especificidade iônica

Na teoria DLVO, considera-se apenas o efeito de dispersão entre macro-partículas, desprezando o efeito de dispersão entre íons e macro-partículas. Deste modo, a teoria não pode explicar porque dois sais de mesma valência (por exemplo, NaCl e NaI) afetam os sistemas coloidais de forma diferente. Ainda que os íons sejam de mesma valência, seu raios podem ser de diferentes tamanhos. Íons de maior volume apresentam maiores polarizabilidades e são capazes de interagir (via forças de dispersão) mais efetivamente com outros íons e superfícies. Por outro lado, íons maiores são menos hidratados, ou seja, quanto maior o raio do íon, menor a hidratação para íons de mesma valência.

Os efeitos de especificidade iônica são disseminados por diversos campos da ciência como biologia, bioquímica, química e engenharia química. O primeiro pesquisador a estudar, sistematicamente, este efeito foi Hofmeister que, observando a habilidade de interação dos íons com o meio, formulou uma série de íons conhecida como série liotrópica ou série de Hofmeister (Tabela II.1), que classifica, qualitativamente, o efeito dos íons sobre a precipitação de proteínas (Kunz et al., 2004). Depois de um século de estudos e diversas pesquisas sobre especificidade iônica, investigando a efetividade relativa de vários íons sobre a solubilidade da lisozima à pH 4,5, Ries-Kautt e Ducruix (1989) revelaram que os ânions eram os principais responsáveis pelos efeitos observados, e ainda, que estes seguiam ordem inversa da série de Hofmeister. Este estudo foi relevante uma vez que a lisozima corresponde a proteína originalmente estudada por Hofmeister. Certo tempo depois, o mesmo grupo demonstrou que a ordem direta para a lisozima se dá em estudos em pH maiores que o ponto isoelétrico da proteína (Carbonnaux, 1995). Desde então, vários pesquisadores têm investigado o efeito relativo sobre diferentes proteínas e diversas condições de pH por metodologias experimentais (Tardieu et al., 2002). Boström et al. (2005) demonstrou que o fenômeno pode ser entendido quando as forças de dispersão iônica entre íons e proteína são tratadas ao mesmo nível das interações da dupla camada elétrica, principalmente porque, enquanto as forças eletrostáticas normalmente dominam à baixas concentrações salinas, as forças de dispersão se tornam importantes à altas concentrações.

Tabela II.1: Sequência de íons segundo a série de Hofmeister

cátions monovalentes	$\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+$
cátions divalentes	$\text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$
ânions monovalentes	$\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^- < \text{NCS}^-$

Hofmeister atesta que as interações entre proteínas são mais afetadas por alguns sais do que por outros. A presença de solutos dissolvidos causa uma mudança distinta na estrutura e nas

propriedades da água líquida. Na Figura II.5 pode-se observar como a solubilidade de uma proteína em meio aquoso é afetada em função da concentração e do tipo de sal em solução.

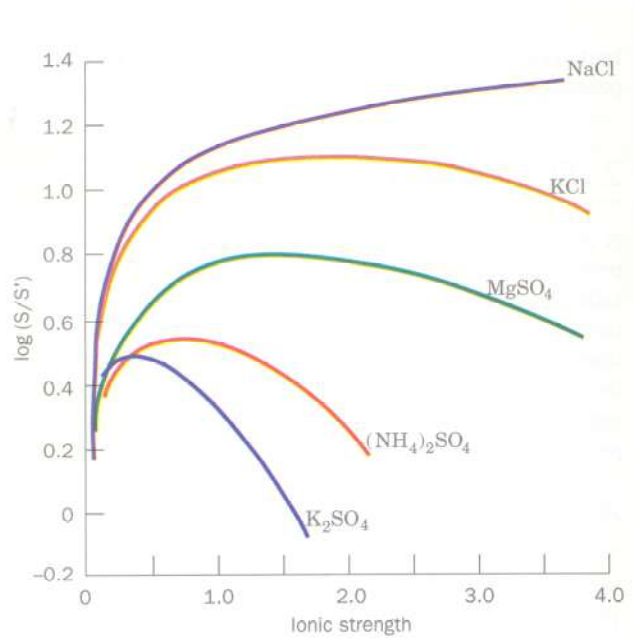


Figura II.5: Representação da solubilidade da carboxi-hemoglobina em seu ponto isoelétrico em função da força iônica e do tipo iônico, onde S e S' são, respectivamente, a solubilidade da proteína em solução salina e em água (Vold e Vold, 1983).

Estudos recentes (Boström et al., 2002, 2003, 2004) indicam que a inclusão das forças de dispersão atuantes entre as interações íon-íon e íon-macro-partículas e dos efeitos íon-específicos de solvatação explicam grande parte dos efeitos de especificidade iônica e corroboram a série proposta por Hofmeister.

Para calcular a interação de dispersão entre íons e partículas U_i , considera-se que o íon é muito menor que a partícula. Assim, a interação de van der Waals, entre íons e partículas, é aproximada pelo potencial entre uma pequena partícula esférica e uma macropartícula esférica (Israelachvili, 1995):

$$U_i = -\frac{H_i}{(x - r_p)^3 \left[1 + \frac{(x - r_p)^3}{2r_p^3} \right]} \text{ para } x \geq r_i + r_p \quad (\text{II.5})$$

onde r_i e r_p são os raios, respectivamente, do íons e da partícula coloidal e x a distância perpendicular do centro do íon ao centro da partícula coloidal. Ou pelo potencial entre uma pequena partícula esférica e uma macropartícula planar:

$$U_i = -\frac{H_i}{x^3} \text{ para } x \geq \frac{\sigma_i}{2} \quad (\text{II.6})$$

onde x é a distância perpendicular do centro do íon e uma superfície plana. O parâmetro de interação de dispersão H_i pode ser estimado pela teoria de Lifshitz como proposto por Tavares et al. (2004).

II.3.2. Forças de hidratação, estruturais e de solvatação

As forças estruturais, também referidas na literatura como forças de solvatação ou forças de hidratação para meios aquosos, surgem do estruturamento ou ordenamento das moléculas do líquido quando estas estão confinadas entre duas superfícies mutuamente próximas e podem ser atrativas ou repulsivas. A origem das forças estruturais ainda não está bem estabelecida. A explicação corrente baseia-se na suposição de que a presença de uma superfície deve alterar a natureza do fluido na região próxima a essa superfície.

Em meio aquoso, a interação por forças estruturais entre superfícies hidrofílicas é repulsiva, e sua intensidade depende do grau de hidratação das superfícies ou grupos superficiais. A aproximação de duas partículas com superfícies hidratadas é geralmente impedida por uma interação repulsiva extra, distinta da repulsão eletrostática. Esta repulsão por hidratação surge essencialmente da necessidade das superfícies se desidratarem para que o contato entre elas ocorra.

Entre superfícies hidrofóbicas, a interação é atrativa e sua intensidade, neste caso, depende da hidrofobicidade da superfície ou dos grupos superficiais. Superfícies altamente hidrofóbicas são inertes à água, *i.e.*, são incapazes de se ligar à água por interação eletrostática ou por pontes de hidrogênio. As forças eletrostáticas são de longo alcance, e podem superar as forças da teoria DLVO, mesmo a distâncias relativamente grandes. Estudos envolvendo simulação de Monte Carlo e dinâmica molecular indicam diferentes estruturas das camadas de água próximas a superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas.

No primeiro caso, os dipolos da água estão predominantemente orientados perpendicularmente à superfície e reduz a mobilidade tangencial das moléculas de água. No segundo caso, os dipolos estão orientados paralelamente à superfície, causando um aumento na mobilidade tangencial, o que se manifestaria, macroscopicamente, no "deslizamento" das moléculas de água sobre uma superfície hidrofóbica.

II.3.3. Forças de flutuação e estéricas

Na teoria DLVO, assume-se que todas as superfícies que interagem são regulares e rígidas, possuindo fronteiras de formas bem definidas. Há muitos casos onde essas hipóteses falham, quando as interfaces são espacialmente difusas ou quando as forças entre as superfícies dependem

de como as suas fronteiras difusas se sobrepõem. A superfície ou interface difusa não é apenas aquela irregular, mais também aquela com grupos termicamente móveis na superfície, ou seja, tanto as superfícies estaticamente irregulares quanto aquelas dinamicamente irregulares. Há dois tipos comuns de tal interface difusa.

Primeiro, há interfaces inerentemente móveis ou fluidas como ocorre com interfaces líquido-líquido, líquido-vapor e algumas anfifílico-água. Em superfícies líquido-vapor, as flutuações ou protusões térmicas são de escala molecular. Embora a escala dessas flutuações não seja superior a alguns angstroms, elas são suficientes ativas de modo a afetar significativamente a estrutura molecular das superfícies. Diferentes tipos de flutuações podem ser relevantes dependendo da forma das moléculas e das suas interações específicas com a superfície. Em alguns casos os resultados de protusões podem ter grandes amplitudes. Quando duas dessas interfaces ou superfícies se aproximam, suas protuberâncias ficam confinadas em uma pequena região de espaço e, na ausência de outras forças de interação, uma força repulsiva cresce associada à entropia desfavorável deste confinamento. Algumas forças são essencialmente entrópicas ou osmóticas por origem e são referidas como ‘flutuação térmica’, ‘entropicamente empulsionada’ ou ‘forças de protusão’.

Um segundo tipo de interface termicamente difusa ocorre quando cadeias moleculares ligadas a algum ponto da superfície possuem um ramo termicamente móvel na solução. Com a aproximação de outra superfície, a entropia de confinamento das cadeias pendentes novamente resulta em uma força entrópica repulsiva pela sobreposição das moléculas poliméricas e são conhecidas como repulsão ‘estérica’ ou ‘de superposição’.

Para ambos os exemplos acima, reorganizações moleculares complexas e outras interações podem levar a potenciais de interações bem mais complexos. Por exemplo, a força pode ser a princípio atrativa e tornar-se repulsiva posteriormente.

II.4. A Teoria de Poisson-Boltzmann impelida pela especificidade iônica

Na teoria DLVO, a interação da dupla camada elétrica está baseada na teoria não-linear de Poisson-Boltzmann. Nos últimos tempos tem havido significantes avanços na aplicação de dinâmica molecular e simulações de Monte Carlo para descrição das interações eletrostáticas na química dos colóides e de superfície, entretanto a solução da equação de Poisson-Boltzmann ainda é uma importante ferramenta para cálculo dessas interações. Embora as limitações da abordagem de Poisson-Boltzmann sejam bem conhecidas, por exemplo, a aproximação de campo médio e a consideração de cargas pontuais, muitos estudos têm demonstrado concordância da solução da equação de Poisson-Boltzmann tanto com sofisticadas simulações computacionais quanto com resultados experimentais (Sthålberg et al., 1995). Normalmente, os desvios dos resultados de

Poisson-Boltzmann ocorrem a altas concentrações iônicas, altas densidades de carga na superfície ou íons altamente carregados.

Para a construção do equacionamento da abordagem de Poisson-Boltzmann, tem-se, primeiramente, as equações básicas da eletrostática:

$$\text{rot}\vec{E} = 0 \quad (\text{II.7})$$

que significa que a força eletrostática é conservativa, e nas regiões onde não há cargas,

$$\text{div}\vec{E} = 0 \quad (\text{II.8})$$

A primeira dessas equações é equivalente a

$$\vec{E} = -\text{grad } \phi \quad (\text{II.9})$$

onde ϕ é o potencial escalar. Usando a Equação II.9 na Equação II.8, tem-se:

$$\text{div grad } \phi = 0 \text{ ou} \quad (\text{II.10})$$

$$\bar{\nabla}^2 \phi = 0 \quad (\text{II.11})$$

onde $\bar{\nabla}^2$ é o operador Laplaceano.

A Equação II.11 é a equação de Laplace, conhecida devido ao teorema da existência e unicidade.

Numa região onde há cargas, não vale a equação de Laplace, que é substituída pela equação de Poisson em um meio de constante dielétrica ϵ ,

$$\nabla \cdot (\epsilon \nabla \phi(\mathbf{x})) + \rho(\mathbf{x}) = 0 \quad (\text{II.12})$$

A equação de Poisson relaciona o divergente do campo (ou o laplaciano do potencial) à densidade volumétrica de carga ρ , ou seja, a variação espacial do potencial elétrico na posição \mathbf{x} com a distribuição da densidade de cargas ρ , dado a constante dielétrica do meio.

A densidade de carga em um elemento de volume é igual à concentração iônica total, c_i (número total de íons por unidade de volume) vezes a carga desses íons, ez_i ,

$$\rho = e \sum z_i c_i \quad (\text{II.13})$$

A lei de distribuição de Boltzmann de mecânica estatística fornece a distribuição de equilíbrio de íons, c_i em um campo de força,

$$c_i = c_{io} \exp \left[-\frac{E_i - E_{io}}{k_B T} \right] \quad (\text{II.14})$$

onde c_{io} é o número de íons i numa distância grande da superfície da partícula, E_i é a energia potencial, E_{io} é a energia potencial da solução. O sub-índice "o" é usado para identificar os valores de quantidades diferentes no estado de referência, i.e., numa distância infinita da superfície carregada.

Considerando o potencial total de interação é obtido através da soma dos potenciais de atração e repulsão, a energia potencial de um íon em um elemento de volume é dada por:

$$E_i = z_i e \phi(\mathbf{x}) + U_i(\mathbf{x}) \quad (\text{II.15})$$

onde z_i é valência iônica, e é a carga eletrônica e $U_i(\mathbf{x})$ é o potencial de interação entre o íon i e a superfície, dada uma posição \mathbf{x} .

Considerando que no seio da solução ($\mathbf{x} \rightarrow \infty$) tanto o potencial elétrico da dupla camada como o potencial de dispersão de van der Waals entre os íons e a macro partícula em solução aquosa tendem a zero, pode-se substituir o potencial total pela soma destes potenciais, de forma que a equação de Boltzmann (Eq. II.16), assume a seguinte forma:

$$c_i = c_{i0} \exp\left[-\frac{z_i e \phi(\mathbf{x}) + U_i(\mathbf{x})}{k_B T}\right] \quad (\text{II.16})$$

Introduzindo-se a Equação II.16 na Equação II.13, a seguinte equação é obtida:

$$\rho(\mathbf{x}) = e \sum z_i c_{i0} \exp\left[-\frac{z_i e \phi(\mathbf{x}) + U_i(\mathbf{x})}{k_B T}\right] \quad (\text{II.17})$$

A equação diferencial modificada de segunda ordem não-linear de Poisson-Boltzmann é obtida substituindo-se a Equação II.17 na equação de Poisson.

$$\nabla \cdot (\epsilon \nabla \phi(\mathbf{x})) + e \sum z_i c_{i0} \exp\left[-\frac{z_i e \phi(\mathbf{x}) + U_i(\mathbf{x})}{k_B T}\right] = 0 \quad (\text{II.18})$$

A equação de Poisson-Boltzmann para ser resolvida necessita de duas condições de contorno, uma vez que a equação diferencial é de segunda ordem. As condições de contorno decorrem da neutralidade total de cargas. A primeira condição de contorno assume que o campo elétrico se extingue no infinito mais rápido que o inverso do quadrado da distância, ou seja, o campo elétrico é nulo no seio da solução. E a segunda condição de contorno sucede do campo elétrico gerado pela densidade de carga superficial.

A equação diferencial de Poisson-Boltzmann é uma equação não-linear de segunda ordem que possui solução analítica apenas para um número limitado de casos particulares ou mediante hipóteses simplificadoras. Sistemas em coordenadas cartesianas com eletrólitos simétricos e sistemas com baixos potenciais de superfície, onde o termo exponencial da equação pode ser linearizado, resultando em uma equação diferencial linear de segunda ordem, possuem uma expressão exata para solução. Em ambos os casos citados de sistemas com soluções analíticas, apenas as interações eletrostáticas podem ser consideradas, ou seja, mesmo para os sistemas mais simples não são suscetíveis soluções analíticas quando o potencial de dispersão iônica é considerado.

Com o intuito de realizar um estudo preliminar da solução da equação de Poisson-Boltzmann, apresenta-se no Apêndice A uma solução analítica da equação de Poisson-Boltzmann na abordagem clássica de Gouy-Chapman, sem incluir o potencial referente às forças de dispersão, para geometria simplificada, placa plana infinita, configurando um problema unidimensional, para uma superfície sem mecanismo regulatório de carga (com carga especificada), no caso positiva, e para eletrólitos simétricos. Apenas nestas condições, a equação de Poisson-Boltzmann apresenta solução analítica, em forma fechada, adequada para um estudo comparativo. A solução da equação está detalhada no Apêndice A.

Uma abordagem alternativa para problemas os quais métodos analíticos não se aplicam ou são muito complicados, é a utilização de métodos numéricos aproximados para se obter uma aproximação da solução de problemas de valor de contorno.

Com a inclusão do termo referente a dispersão iônica relativa às interações entre íons e macroíons, a necessidade de recorrer à soluções numéricas é uma realidade, uma vez que não há soluções analíticas. Sendo assim, utilizou-se soluções numéricas baseadas em diferenças finitas para resolução da equação diferencial não-linear de segunda ordem. Considerando a simetria do sistema, pode-se tratar o problema como um problema unidirecional, seja no caso da placa plana infinita, resolvido em coordenadas cartesianas ou entre partículas esféricas, resolvido em coordenadas esféricas.

O objetivo do método das diferenças finitas é transformar um problema composto por equações diferenciais em um problema formado por equações algébricas e é baseado na discretização do domínio da variável independente da equação diferencial. Tanto nos sistemas cartesianos como nos esféricos, a variável independente será a distância em relação à superfície da parede ou da partícula. E considerando a simetria desses sistemas, os problemas poderão ser tratados como problemas unidimensionais.

Deste modo, nesta monografia, usa-se a abordagem de Poisson-Boltzmann para cálculo do potencial de força média entre as partículas e a equação diferencial de segunda não-linear de Poisson-Boltzmann terá uma solução numérica por diferenças finitas.

Capitulo III

**Os efeitos de Hofmeister:
Por que a carga da
proteína, a curva de
titulação e a precipitação da
proteína dependem da
escolha do sal da solução**

Capítulo III – Os efeitos de Hofmeister: Por que a carga da proteína, a curva de titulação e a precipitação da proteína dependem da escolha do sal da solução

O entendimento de como o pH da solução, as concentrações de sais, e outras variáveis influenciam as interações entre proteínas são informações fundamentais para projetos de processos biotecnológicos, onde a aplicação de células e moléculas para solucionar problemas, conduzir pesquisas e criar produtos e serviços, inclui uma diversa coleção de tecnologias para manipular células, sub-células ou componentes moleculares.

A proteína e suas propriedades físico-químicas afetam e são afetadas pelo seu meio externo. Hofmeister, em seus estudos de precipitação de misturas de proteínas da clara do ovo, propôs uma escala de classificação de íons em relação à eficácia de precipitação de proteínas. As series de Hofmeister mostram que várias propriedades em sistemas coloidais, como a precipitação de proteínas, dependem do tipo de sal utilizado (Grigsby et al., 2001), fenômeno não explicado pelas teorias clássicas.

Sendo assim, neste capítulo, o objetivo é estudar as interações de partículas coloidais em um campo eletrostático a partir da resolução da equação não-linear de Poisson-Boltzmann, seguindo os trabalhos de Boström et al. (2003a, 2003b, 2004), levando em consideração as interações de dispersão originárias das polarizabilidades dos íons e proteínas em solução (Tavares et al., 2004).

A seguir apresenta-se o trabalho em sua íntegra.

Hofmeister Effects: Why Protein Charge, pH Titration and Protein Precipitation Depend on the Choice of Background Salt Solution

L.A. Moreira^a, M. Boström^b, B.W. Ninham^{c,*}, E.C. Biscaia^d, F.W. Tavares^a

^aEscola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CEP 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, ^bDepartment of Physics and Measurement Technology, Linköping University, SE-581 83 Linköping, Sweden,

^cResearch School of Physical Sciences and Engineering, Australian National University Canberra, Australia, 0200.

^dPrograma de Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21945-970, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Abstract - Protein solubility, protein charge and acid-base titration in protein solutions depend strongly on the choice of background salt solution. Hofmeister effects, or sequences, refer to the relative effectiveness of anions or cations on a wide range of phenomena. Understanding this ion specificity is vital for biology, biotechnology, and colloid chemistry but the reason has, until very recently, not been clear. We present calculations using the Poisson-Boltzmann equation that includes not only electrostatic interactions but also many-body ion-protein dispersion potentials, originated from polarizabilities of ions and proteins. These calculations reveal that it is possible to qualitatively predict different Hofmeister effects observed in protein solutions. Our results enable us to give an explanation for the Hofmeister series observed in the measured pH in protein and buffer solutions, protein charge and ion adsorption on protein surface.

Keywords: Hofmeister Effect, Polarizability, Ionic Dispersion Potentials, Cytochrome C, Poisson-Boltzmann Equation

1. Introduction

1.1. Biological stimulus

The coupling of electron and proton transfer is central to many biological reactions. Among these are the processes occurring in the protein cytochrome C, a component of the mitochondrial electron transport chain. There is a vast literature on the use of electrostatic models for computing protonation equilibria in proteins. The importance of surface potentials in cell membranes is widely recognized, and it is well known that phenomena in membrane biology can often be described surprisingly well using electrostatic mean-field double-layer theory [1]. However, no current theory has been able to explain why a large number of vital biological processes depend on the choice of the background salt ion pair, following a Hofmeister series.

What is clear is that some extra ion-specific forces are needed to accommodate phenomena associated with almost all biological systems. These forces cannot be only electrostatic. Electrostatic forces depend just on the ionic charge. They do not change for instance if a sodium ion

*Corresponding author:

Permanent address: Department of Applied Mathematics, Research School of Physical Sciences, Australian National University, Canberra ACT 0200, Australia

Telephone number: +61-6-249-2847

Fax number: +61-6-249-0732

E-mail address: barry.ninham@anu.edu.au (B.W. Ninham)

is replaced by a potassium ion. Hydration of course changes, depending on ionic size, but seems not to be the whole story. The dispersion forces are the candidate for these ion-specific forces, which act between ions and their environment. These forces arise from electrodynamic fluctuations and depend on the polarizability of each ion and hence ion-specific. We emphasize that by dispersion forces we mean the totality of electromagnetic fluctuation forces at all frequencies. In the salt concentration of most biological systems, the electrostatic forces are highly screened and the dispersion forces can dominate [2]. In the totality of electromagnetic fluctuation forces we also include changes in solvation energy when ions enter the air-water interfacial region with its varying water density [3] or when ions permeate across a membrane [4].

Recent advances in nanotechnology enabled the fabrication of structures dimensionally commensurate with characteristic scales of both biological and molecular systems [5]. A first step in this direction is the understanding of the interactions between charged surfaces and molecules in electrolyte solutions. Such interactions control the rate of various physical processes as coagulation and adsorption. Monte Carlo simulations in which the components interact through Coulombic and van der Waals forces require a large number of particles. Such simulations, even for today's supercomputers, are very costly. An alternative approach uses a continuum model for the electrolyte, but preserves the individuality of macromolecule. This leads to the Poisson-Boltzmann equation which has been used to model colloids and polarizable surfaces interacting with each other with acceptable results.

Our purpose here is, by using the Poisson-Boltzmann equation, demonstrate the effects of including previously ignored ionic dispersion potentials between the ions and the interface and, by this approach, offer an explanation for the Hofmeister effects (i.e. the ion specificity of background salt). So, we do not aspire to give an exhausted explanation for the Hofmeister effects nor ionic effects.

1.2. The Poisson-Boltzmann equation

The distribution of ions at a charged surface is fundamental problem of colloid and interface science. Gouy [6] and Chapman [7] were the first who tread this problem in a quantitative fashion. Their theory considered that the ions are point charges embedded in a continuum of a constant dielectric. The limitations of a theory with such drastic approximations were obvious from the beginning. Since then, the theory was corrected in many ways to account for image forces, finite sizes of the hydrated ions, ion correlations, dependence of dielectric constant on the field and electrolyte concentration and many other effects [8-13]. The Poisson-Boltzmann approach has the advantage of simplicity and is accurate, at least for univalent ions in a certain range of electrolyte concentrations and not too close to the interface. The Gouy-Chapman model of colloidal electric

double layers based on the Poisson-Boltzmann equation breaks down under certain conditions like high salt concentrations [14], multivalent electrolytes [15], ions with large diameter, elevated surface charges, solvents with lower dielectric coefficient, etc. In addition, other effects such as the asymmetries in the ion diameters and charges [16], the discreteness of the solvent and the surface charge [8] are not taken into account in the Gouy-Chapman model. We are currently improving the investigation of ion specific effects by using primitive model simulations that include realistic ion sizes. An increased polarizability is often accompanied by a larger ionic radius and this may give an effect in the opposite direction.

The electrochemical potential, μ_i , of the ion ‘ i ’ with charge, ev_i , is given by:

$$\mu_i = \mu_{0i} + k_B T \ln(c_i) + ev_i \phi, \quad (1)$$

where, μ_{0i} represents the standard chemical potential of the ion of species ‘ i ’, k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature, c_i stands for the ion concentration, e is the elementary charge, v_i is the ion valence and ϕ a ‘mean electric potential’. In thermal equilibrium, μ_i remains constant throughout the system. Consequently, each sort of ion ‘ i ’ obeys a Boltzmann distribution in the solution.

$$c_i = c_{0i} \exp\left(-\frac{v_i e \phi}{k_B T}\right) \quad (2)$$

where, c_{0i} is the ion concentration at the bulk reservoir.

The classical theory accounts only for electrostatics and thermal motion and neglects several important effects such as dispersion forces, fluctuation, hydration, ion size effects and the water structure at interface. Several extensions of the theory are aiming to include these in the framework of mean-field Poisson-Boltzmann theory.

The fundamental Poisson equation is used [8] to self-consistently relate the electric potential ϕ to the net excess charge density at a position \mathbf{x} :

$$\nabla(\varepsilon_0 \varepsilon_w \nabla \phi(\mathbf{x})) + 4\pi \rho(\mathbf{x}) = 0 \quad (3)$$

where, $\varepsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12} \text{ C}^2 / (\text{Jm})$ is the dielectric permittivity of vacuum, ε_w is the dielectric constant of the solvent and $\rho(\mathbf{x})$ is the net charge density at a given position, defined as

$$\rho(\mathbf{x}) = e \sum_i v_i c_i(\mathbf{x}) \quad (4)$$

The interaction between an ion and a protein surface is not only electrostatic, each ion experiences a further additive term that come from dispersion forces U_i . Then, we have a modified Boltzmann distribution of ions in the solution [8].

$$c_i = c_{oi} \exp\left(-\frac{v_i e \phi + U_i}{k_B T}\right) \quad (5)$$

The combination of the Boltzmann distribution with the Poisson equation for net excess charge density leads to a nonlinear second order differential equation for the electric potential ϕ , the Poisson-Boltzmann equation.

$$\nabla \cdot (\epsilon_o \epsilon_w \nabla \phi(x)) + 4\pi e \sum_i v_i c_{oi} \exp\left(-\frac{v_i e \phi + U_i}{k_B T}\right) = 0 \quad (6)$$

The specific ion interactions from dispersion forces become more and more important at high salt concentration. In contrast to electrostatic interaction, the van der Waals interaction is not screened by the electrolyte and may play a decisive role in several phenomena. This is because the high frequency electromagnetic oscillations of the polarizable ions that give rise the van der Waals interaction are too rapid to be screened out by the much slower ionic motion.

2. Theory

We consider an aqueous solution of negatively charged anions, c_- , and positively charged cations, c_+ , each with bulk concentration, c_{0-} and c_{0+} , respectively, and a charged globular protein. The protein (yeast iso-1-ferricytochrome C) is modeled as a dielectric, uniformly charged, sphere of radius r_p with ionizable surface groups. We can calculate the average protein radius based on estimates of the volume of yeast iso-1-ferricytochrome C [17]. This volume is around 14610 \AA^3 and therefore the radius is $r_p \cong 15.16 \text{ \AA}$. The pH is here defined as $-\log_{10}(c_H \gamma_H)$, where c_H is the hydronium concentration and γ_H is the activity coefficient. Following Parsegian [18], we neglect any changes in the hydronium ion bulk activity coefficient (i.e., to evaluate the local surface pH, we take $H_s^+ \approx H_b^+ \exp(-\frac{e\phi_s}{k_B T})$ and $pH_s \approx -\log_{10}([H^+]_s)$).

The surface concentration of hydronium ions regulates the protonation equilibria of yeast iso-1-ferricytochrome C. Further, the protonation equilibria describe precisely the number of ionizable charge groups. Results of calculations (particularly isoelectric point and total charge) contain several errors because of the difference between real and theoretical dissociation constants. Some facts cause this difference. First of all the charge of protein molecule affects the dissociation/protonization processes (it can both reduce and increase constants). Secondly the protein molecule 3-D structure can not be taken into account. Protein molecule is folded, and the charge is not distributed constantly because of the shielding of some functional groups.

So obtained results should be used only as an estimation of real values. For demonstration, we use an estimation of the intrinsic pK_a 's of the ionizable groups experimentally relevant for the

system. These are derived from the conformational average result of molecular dynamics calculations presented in Table 3 of Zhou and Vijakumar [19]. The proton titration curve of a protein represents the number of hydrogen ions bound or released in response to changes in the local surface pH.

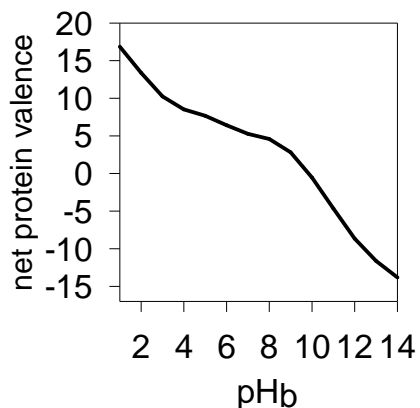


Fig.1. Titration curve for the model protein (ferricytochrome C) is shown as a function of bulk pH.

The protein can be described as simple chemical reaction model that follow the law of mass action, namely, when a reversible reaction has attained equilibrium at a given temperature, the reaction quotient remains constant. This constant is called reaction constant, K , which has a numerical value that depends on the temperature and pressure. As we are looking at a system involving a weak acid, K is usually referred to as K_a , in deference to the fact that we are dealing with an acid.

The degree of electrolytic dissociation determines, therefore, the strength of acids, and a similar consideration leads to the same result for bases. Degree of dissociation is a fraction of the total number of moles of an acid or base or electrolyte that dissociates into ions in an aqueous solution when equilibrium is reached. It is represented by z .

The net charge of a protein is a result of acid-base equilibria, which occur in water solution. There are two types of this equilibrium which can take place. The basic groups, as for example lysine ($pK_a = 10.9$) or arginine ($pK_a = 12.5$), bring positive contributions to the total charge of the protein. The contribution is equal to the part of charged groups from the total number of the groups [1]. The average charge of a basic group is given by:

$$ez_+ = e[H^+]_s / ([H^+]_s + K_a) \quad (7)$$

For the other hand, the dissociation of uncharged groups, as for example glutamic acid ($pK_a = 4.3$) and aspartic acid ($pK_a = 3.9$), contribute to negative charges. The average charge of an acid group is:

$$ez_- = -eK_a / ([H^+]_s + K_a) \quad (8)$$

The net charge of the protein is the sum of all acid- and basic-group charges (Fig.1):

$$Q_p = \left(\sum ez_+ + \sum ez_- \right). \quad (9)$$

The net protein charge and the surface concentration of hydronium ions ($[H^+]_s$) must be determined self-consistently with the non-linear Poisson-Boltzmann equation. Boström et al. [3] have recently shown that changes in dielectric properties due to a varying water concentration can give rise to substantial changes in dispersion self-energy when ions move into the air-water interfacial region. Ignoring possible dielectric discontinuities in the solution near the protein surface, i.e., using a uniform dielectric constant $\epsilon_w = 78.5$ (characteristic of water at 298K), the Poisson-Boltzmann equation, written here in spherical coordinates, is:

$$\frac{\epsilon_w \epsilon_o}{r^2} \frac{d\phi}{dr} \left(r^2 \frac{d\phi}{dr} \right) = -e [v_+ c_+ + v_- c_-]. \quad (10)$$

Taking into account the dispersion interactions between ions and protein, the ion concentration is given by [2]:

$$c_{\pm} = c_{0\pm} \exp \left(- \frac{[v_{\pm} e \phi + U_{\pm}]}{k_B T} \right). \quad (11)$$

where, ϕ is the self-consistent electrostatic potential experienced by the ions, and U_{\pm} are the dispersion interaction potentials experienced by cations and anions near the protein surface.

Here we included the dispersion potential that acts between an ion and the spherical interface. The boundary conditions follow from global charge neutrality. The first boundary condition is that the electric field vanishes at infinity faster than $1/r^2$. The second is that:

$$(r_p + r_{ion})^2 \left. \frac{d\phi}{dr} \right|_{r=r_p+r_{ion}} = -Q_p / 4\pi\epsilon_o\epsilon_w. \quad (12)$$

We have made the assumption that ions cannot get any closer to the effective protein surface than one ion radius (r_{ion}). Usually, the difference in ion size for similar ions is quite small, and to highlight the effects of dispersion potentials we take it to be the same for all ions (2 Å). The nonretarded dispersion interaction between a point particle and a sphere can within the pair summation approximation (the Hamaker approach) be written:

$$U_{\pm} = \frac{B_{\pm}}{(r - r_p)^3 \left[1 + (r - r_p)^3 / 2r_p^3 \right]}. \quad (13)$$

where the dispersion coefficient (B_{\pm}) will be different for different combinations of ion and spherical protein membrane. We have used the dispersion coefficient presented in Table 4 of Tavares et al. [20].

The surface adsorption excess per head group is found to be highly counterion specific and less extent co-ion specific [21]. The fraction of “bound charge”, which we take to be equal to excess surface adsorption near a spherical protein, is:

$$q = \frac{4\pi e}{Q_p} \int_{r_p+r_{ion}}^{\infty} r^2 [(c_+ - c_{0+}) + (c_- - c_{0-})] dr. \quad (14)$$

3. Results and Discussion

3.1. Comparison between Monte Carlo simulations and Poisson-Boltzmann equation

In order to test the accuracy of the nonlinear Poisson-Boltzmann equation, we performed canonical Monte Carlo simulations to calculate ion-concentration profiles near a protein in electrolyte solutions. Here in our simulations, dispersion interactions of anion-protein and cation-protein pairs are taken into account.

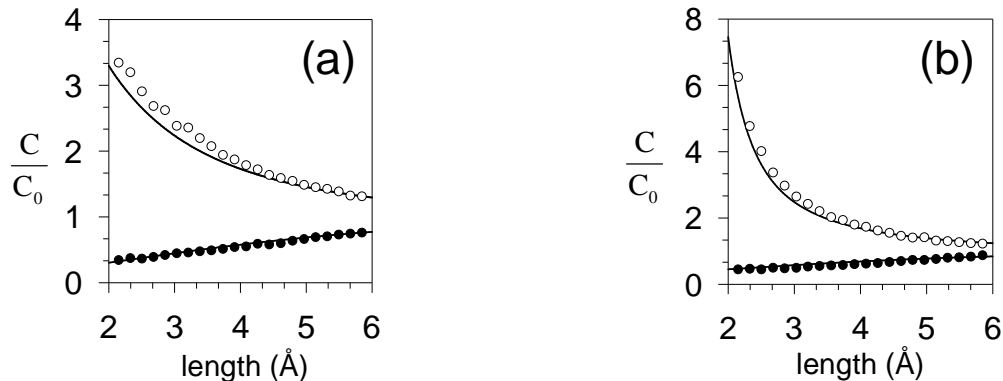


Fig. 2. Concentration profiles near a globular protein obtained from Monte Carlo simulations (symbols) and from nonlinear Poisson-Boltzmann equation (lines) for 1M salt-concentration solutions containing (a) nonpolarizable ions (nnpn) and (b) NaCl. Open circles are for counterions and dark circles are for coions.

Monte-Carlo-simulation details are reported elsewhere [20, 22]. In summary, the cubic simulation box contains a centered protein and 300 small ions that satisfy overall charge neutrality. The volume of the box is adjusted to give ionic strength 1M. The box length is about one order of magnitude larger than the Debye screening length. Standard canonical Monte Carlo simulation is applied to calculate the average ion concentrations near the protein. During each run, the protein particle is fixed at the center while the small ions are free to move throughout the box. The Ewald-sum method is applied to account for long-range electrostatic interactions. For each simulation, 5×10^6 configurations are used for equilibration. To calculate the average concentrations, 10^8 configurations are used. The Fig. 2 shows a comparison of the concentration profiles for anions and cations near a fixed protein obtained from Monte Carlo simulation with those from Poisson-Boltzmann equation. Very good agreement is observed for both nonpolarizable ions, as nnpn (i.e., ions without dispersion forces) and polarizable ions, as NaCl. Due to the attraction between the

couterion and the protein, the concentration of counterion near to the surface arises more for the polarizable ions than for the nonpolarizable ions. Further, this behavior was foreseen adequately by the both methods.

3.2. Electrostatic potential and concentration profiles

We consider a charged protein under the conditions described in the introduction. The electrostatic potential and charge distribution outside the protein for a 1M salt solution at the bulk reservoir pH 12. It is common that the potential depends to a large extent on the dispersion interaction between the ions and the protein. However, the cations are expected to experience smaller ionic dispersion forces since they are less polarizables than the anions.

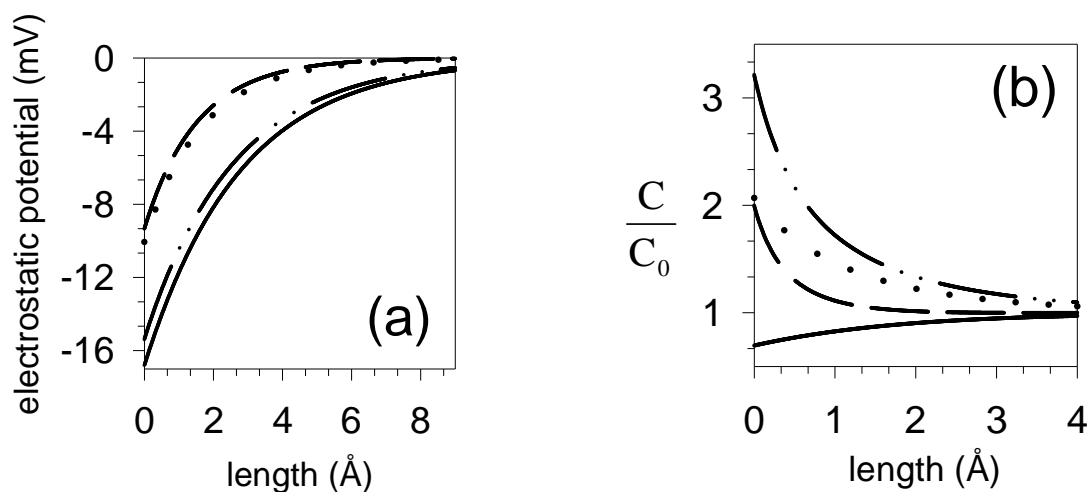


Fig. 3(a). Theoretical electrostatic potential outside a charged protein (pH =12, 1M salt bulk concentration). The effect of ion's valence is higher than the dispersion potentials acting on cations. We consider four different cases: NaCl (solid line), no polarizable 1:1 electrolyte (dash-dot-dot line), CaCl₂ (dotted line), no polarizable 2:1 electrolyte (dashed line).

Fig. 3(b) is the concentration profiles as a function of distance from the protein surface. (pH =12, 1M) The ions are: Ca²⁺ (dash-dot-dot line), Cl⁻ (dash line), no polarizable divalent cation (dotted line), and no polarizable monovalent anion (solid line).

However, the presence of divalent cations has a dramatic effect on the potential profile and counterion distribution at a negatively charged surface. Fig. 3(a) shows the electrostatic potential outside a charged protein at pH =12 and 1M salt concentration. At such high surface concentrations divalent ions often bind “chemically” to negative surfaces sites [23,24]. As can be seen from the ion distributions, presented in Fig 3(b), the high anion dispersion forces can give a co-ion adsorption.

3.3. Effect of ionic dispersion forces and ionic strength

Proteins are amphoteric molecules containing a large number of acid and basic groups, mainly situated on their surface. The charges on these groups will vary, according to their acid dissociation constants, with the pH of their local environment. This will affect the total net charge of the proteins and the distribution of charges on their exterior surfaces. The charge of proteins depends on pH,

ionic valence, salt concentration and ion specificity (salt type). Taken together, the changes in charges with pH may affect the biological activity, structural stability and solubility of the protein [25].

While pH is constant in the entire solution the electrochemical potential can be quite different near a protein surface, or near any interface, compared to in bulk solution. We define surface pH to mean minus the logarithm of the electrochemical potential. This is the quantity that influences the different charge groups on the protein surface [26]. It produces different net protein charge to distinct salt type and salt concentration. In the same conditions of pH and salt concentration, the net protein charge to NaCl is different to CaCl₂, seeing that the ionic strength is one to NaCl and three to CaCl₂. Ionic strength basically reflects how many charges there are in certain volume for other substances to interact with, and as such, not only is the concentration important, but so is the valence. The ionic strength and the ionic dispersion act on the ions and the cytochrome C then the pH and the net protein charge of biological system is affected and defined.

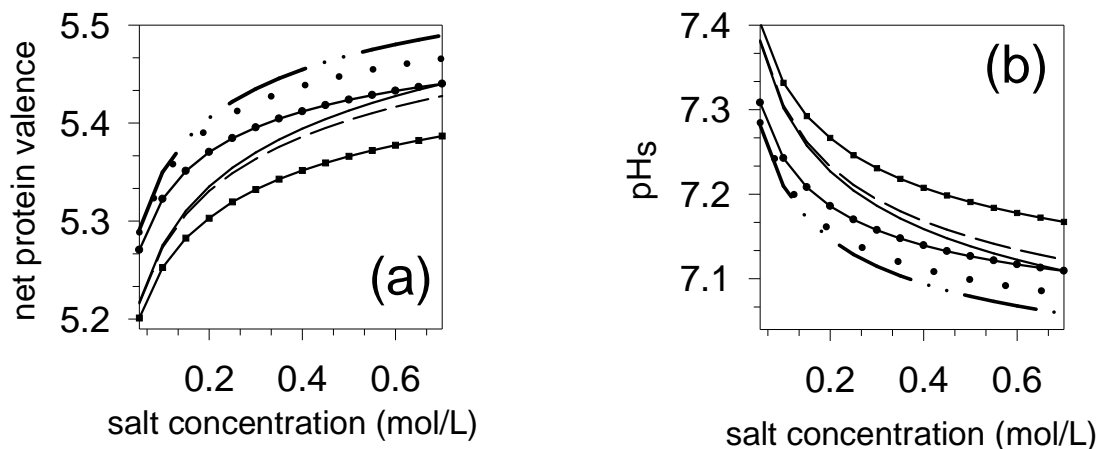


Fig. 4. (a) Net protein valence and (b) surface pH as a function of salt concentration. We consider six different cases: NaCl (solid line), KCl (dash line), no polarizable 1:1 electrolyte (square sign), CaCl₂ (dash-dot-dot line), BaCl₂ (dotted line), no polarizable 2:1 electrolyte (circle sign).

For all these salts the surface pH are higher than the pH of the bulk reservoir. The decrease concentration of cations near a positively charged surface competes with and effectively increases the attraction of hydronium ions toward the surface. Adding more salt the protein can suffer an important effect of screening that means that the local surface pH goes towards the pH of the bulk reservoir.

Throughout this work we consequently consider a single protein. However, this of course is only an approximation valid for low protein concentrations. In a solution with finite protein concentration interactions between ions and the protein also tend to influence the total number of hydronium ions in solution, and hence pH of the solution. Each protein will on the average have a specific volume which it occupies and in which it regulates how many hydronium ions that are

bound to the protein and how many that are in solution. The fact that the protein becomes more positively charged in all the curves in the Fig. 4(a) correspond to inciting hydronium ions from the protein to the solution shown in the Fig. 4(b). This means that the bulk pH of the solution increases. This also means that a protein act as a buffer against changes in pH. Whenever, an acid or base are added to change pH of a protein solution some of these changes will be opposed by the protein when it adsorbs or gives away hydronium ions. However, as we have shown elsewhere there are still highly ion specific changes in the pH that can be understood if both bulk and surface effects are taken into account.

3.4. Surface excess of the counterion

As discussed recently by Boström and Ninham [4], ionic dispersion potentials acting between ions in salt solution and a membrane surface can give rise to a substantial and highly ion-specific membrane potentials at physiological concentrations (around 0.1 M). This leads to an ion-specific electric field inside the membrane and an ion-specific membrane potential, and consequently ion-specific diffusion. Other important and related aspect is the ion concentration near a membrane surface (adsorption).

Studies investigating the driving forces for protein adsorption have demonstrated the importance of enthalpic contributions, such as van der Waals, electrical double layer, and hydrophobic interactions [9]. At the same time, entropic-based mechanisms entail the release of counterions and/or solvation water, and the reduction of ordered structure due to adsorption-induced conformational changes.

The adsorption of cations on the protein surface are investigated for conditions of biological interest, the salt concentrations from 0.1 to 0.5M and the pH chosen in order the protein to be negatively charged. In this case, the cation is counterion. In Fig. 5 we show q versus salt concentration and pH for various salts. At low concentrations electrostatic force dominates, but there are still influences of ionic dispersion interactions. At high salt concentrations the q values are very sensitive to changes in the dispersion potential that acts on the counterions. We see that q may even increase with added salt (Fig. 5a). Although we have here neglected differences in ion size and other sources of ion specificity, it is clear that there is a large degree of ion specificity due to ionic dispersion forces.

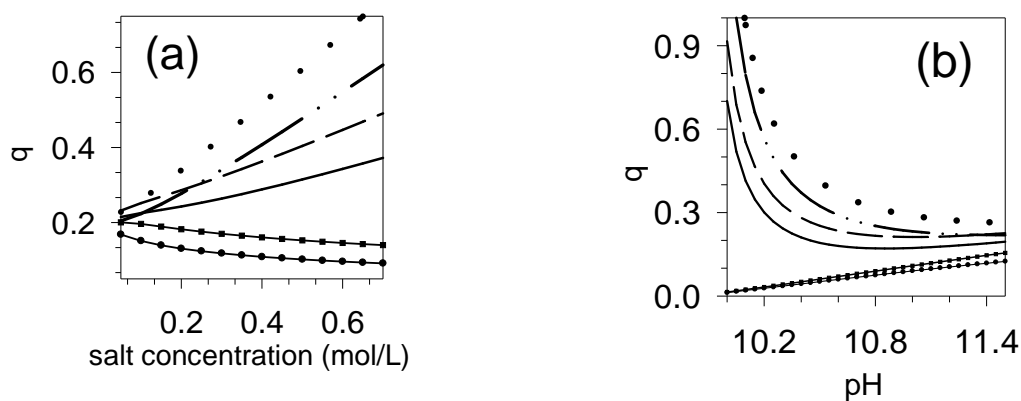


Fig. 5. Ion specific surface adsorption excess/head group (q) on the protein surface as a function of (a) salt concentration at pH 12 and (b) pH at 0.1M. We consider six different cases: NaCl (solid line), KCl (dash line), no polarizable 1:1 electrolyte (square sign), CaCl_2 (dash-dot-dot line), BaCl_2 (dotted line), no polarizable 2:1 electrolyte (circle sign).

The excess surface adsorption is given by a discontinuous equation in the isoelectric point according to Equation 14. The isoelectric point is around pH 10 (Fig. 1). Then, close to the isoelectric pH the relative adsorption tends to infinite. It is important to note that when the electrostatic potential goes to zero near the isoelectric point the ionic dispersion potential dominates the interactions. This leads to large ion specificity near the isoelectric point.

In a similar manner to the effect on proteins, the charge and charge distribution on the electrolytes will also be affected by pH changes. Increasing hydrogen ion concentration will, additionally, increase the successful competition of hydrogen ions for any metal cationic binding sites on the protein, reducing the bound metal cation concentration. Decreasing hydrogen ion concentration, on the other hand, leads to increasing hydroxyl ion concentration which competes against protein's binds for divalent and trivalent cations causing their conversion to hydroxides and, at high hydroxyl concentrations, their complete removal from the protein.

4. Conclusions

The main conclusion of this work is that ionic dispersion forces acting between ion and protein play a very important role in interpreting properties of biological and colloidal systems, especially at high salt concentrations. We have showed that even for physiologic concentrations (around 0.1M) the salt specificity may be important, especially close to the isoelectric pH. The surface adsorption per head group is highly affected by the ion specificity of the counterion at a negatively charged surface.

5. Acknowledgments

LAM, FWT and ECB thank Capes, CNPq and FAPERJ, the Brazilian agencies for scholarship and for supporting part of this project. M. B. thanks the Swedish Research Council for financial support and FWT for kind hospitality at UFRJ where this work was carried out.

6. References

- [1] M. Boström, D.R.M Williams, B.W. Ninham, Specific Ion Effects: Why the Properties of Lysozyme in Salt Solutions Follow a Hofmeister Series, *Biophys. J.* 85 (2003) 686-694.
- [2] M. Boström, D.R.M. Williams, B.W. Ninham, Specific ion effects: Role of salt and buffer in protonation of cytochrome c, *Eur. Phys. J. E* 13 (2004) 239-245.
- [3] M. Boström, W. Kunz, B.W. Ninham, Hofmeister Effects in Surface Tension of Aqueous Electrolyte Solutions, *Langmuir* 21 (2005) 2619-2623.
- [4] M. Boström, B.W. Ninham, Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: the role of dispersion self-free energy, *Biophysical Chemistry* 114 (2005) 95-101.
- [5] A.I. Shestakov, J.L. Milovich, A. Noy, Solution of the Nonlinear Poisson-Boltzmann Equation Using Pseudo-transient Continuation and the Finite Element Method, *J. Colloid Interface Sci* 247 (2002) 62-79.
- [6] G. Gouy, Sur la constitution de la charge électrique a la surface d'un électrolyte, *J. Phys. Theor. Appl.* 9 (1910) 455-468.
- [7] D.L. Chapman, A contribution to the theory of electrocapillarity, *Philos. Mag.* 25 (1913) 475-481.
- [8] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, second ed., Academic Press Inc., San Diego, 1992.
- [9] B.W. Ninham, On progress in forces since the DLVO theory, *Adv. Colloid Interface Sci.* 83 (1999) 1-17.
- [10] M. Manciu, E. Ruckenstein, Specific ion effects via ion hydration: I. Surface tension, *Adv. Colloid Interface Sci.* 105 (2003) 63-101.
- [11] M. Quesada-Pérez, A. Martín-Molina, R. Hidalgo-Álvarez, Simulation of electric double layers with multivalent counterions: Ion size effect, *J. Chem. Phys.* 121 (2004) 8618-8626.
- [12] G.M. Torrie, J.P. Vallea, *Electrical Double Layers. 4. Limitations of the Gouy-Chapman Theory*, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 3251-3257.
- [13] L. Mier-y-Teran, S.H. Suh, H.S. White, H.T. Davis, A nonlocal free-energy density-functional approximation for the electrical double layer, *J. Chem. Phys.* 92 (1990) 5087-5098.

- [14] T. Åkesson, B. Jönsson, Monte Carlo simulations of colloidal stability-beyond the Poisson-Boltzmann approximation, *Electrochimica Acta* 36 (1991) 1719-1721
- [15] H. Wennerström, B. Jönsson, P. Linse, The cell model for polyelectrolyte systems. Exact statistical mechanical relations, Monte Carlo simulations and the Poisson-Boltzmann approximation, *J. Chem. Phys.* 76 (1982) 4665-4670.
- [16] V. Vlachy, Ionic effects beyond Poisson-Boltzmann theory, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 50 (1999) 145-165.
- [17] G.V. Lowie, G.D. Brayer, High-resolution Refinement of yeast Iso-1-Cytochrome C and comparisons with other Eukaryotic Cytochromes C, *J. Mol. Biol.* 214 (1990) 527-555.
- [18] V.A. Parsegian, Possible modulation of reactions on the cell surface by changes in electrostatic potential that accompany cell contact, *Ann. NY Acad. Sci.* 238 (1974) 362-371.
- [19] H. Zhou, M. Vijayakumar, Modeling of Protein Conformational Fluctuations in pK_a Predictions, *J. Mol. Biol.* 267 (1997) 1002-1011.
- [20] F.W. Tavares, D. Bratko, H.W., Blanch, J.M. Prausnitz, Ion-Specific Effects in the Colloid-Colloid or Protein-Protein Potential of Mean Force: Role of Salt-Macroion van der Waals Interactions, *J. Phys. Chem. B*, 108 (2004) 9228-9235.
- [21] M. Boström, D.R.M. Williams, B.W. Ninham, Ion Specificity of Micelles Explained by Ionic Dispersion Forces, *Langmuir* 18 (2002) 6010-6014.
- [22] J.Z. Wu, D. Bratko, H.W. Blanch, J.M. Prausnitz, Monte Carlo simulation for the potential of mean force between ionic colloids in solutions of asymmetric salts, *J. Chem. Phys.* 111 (1999) 7084-7094.
- [23] S. Marcelja, Electrostatics of membrane adhesion, *Biophys. J.* 61 (1992) 1117-1121.
- [24] R.A., Böckmann, H. Grubmüller, Multistep binding of divalent cations to phospholipid bilayers: a molecular dynamics study, *Angew. Chem. Int. Ed* 43 (2004) 1021-1024.
- [25] T.A. Soares, R. Ferreira, Aplicação da equação de Poisson-Boltzmann ao cálculo de propriedades dependentes do pH em proteínas, *Quím. Nova* 27 (2004) 640-647.
- [26] B.W. Ninham, V.A. Parsegian, Electrostatic potential between surfaces bearing ionizable groups in ionic equilibrium with physiologic saline solution, *J. Theor. Biol.* 31 (1971) 405-428.

Capitulo IV

**Estimativa do segundo
coeficiente osmótico do
virial: Efeito da interação de
dispersão íon-proteína**

Capítulo IV – Estimativa do segundo coeficiente osmótico do virial: Efeito da interação de dispersão íon-proteína

IV.1. Introdução

O entendimento de como o pH, a concentração salina e o tipo de sal influenciam as interações proteína-proteína são informações importantes para projeto e otimização de processos de separação e purificação de proteína como os processos de purificação de proteína por indução salina, cristalização de proteínas e cromatografia de afinidade (Chiew et al., 1995; Piazza, 2000; Tardieu et al., 2002). É comum caracterizar as interações entre proteínas em termos do segundo coeficiente osmótico do virial, principalmente porque este pode ser medido por técnicas tradicionais de caracterização de sistemas colóides como espalhamento estático e dinâmico de luz (George and Wilson, 1994; Velez, 1998; Muschol et al., 1995), osmometria de membrana (Haynes et al., 1992; Schaink and Smit, 2000), sedimentação (Behlke and Ristau, 1999) e diversos métodos cromatográficos (Tessier et al., 2002; Teske et al., 2004). Porém, estes métodos usuais de medição do segundo coeficiente do virial apresentam dois problemas principais para a determinação de parâmetros de sistemas protéicos, dispendem grande quantidade de tempo e altos custos com proteína. Sendo assim, seria grande a contribuição de um modelo que fornecesse estimativas de parâmetros para sistemas desta natureza.

Sendo assim, neste capítulo, o objetivo consiste no estudo das interações de partículas coloidais em um campo eletrostático a partir da estimativa do segundo coeficiente do virial, levando em consideração as interações de dispersão originárias das polarizabilidades dos íons e proteínas em solução (Tavares et al., 2004c) e a verificação da influência do pH, da concentração e do tipo salino sobre os sistemas protéicos.

A importância das interações proteína-proteína na cristalização de proteínas foi experimentalmente demonstrada por George e Wilson em 1994. Esses pesquisadores mostraram que o sucesso da cristalização está relacionado ao segundo coeficiente osmótico do virial da solução protéica. Eles descobriram uma “janela de cristalização”, faixa do segundo coeficiente do virial onde a cristalização é favorecida. Na região externa a esta janela, a cristalização não ocorre, seja por nucleação insuficiente, como por precipitação amorfa. Para altos valores do segundo coeficiente do virial, a cristalização não ocorre por insuficiência de nucleação e para baixos valores do segundo coeficiente do virial, valores negativos, há agregação ao invés de cristalização.

Ten Wolde e Frenkel (1999) mostraram que a janela de cristalização corresponde a um ponto crítico líquido-líquido metaestável na vizinhança do equilíbrio sólido-líquido. Na proximidade deste ponto crítico, a barreira de energia livre de nucleação do cristal é fortemente reduzida e a taxa de

nucleação do cristal aumenta em muitas ordens de magnitude. Sendo assim, essa região metaestável é muito importante na cristalização de proteínas, uma vez que a escala de tempo despreendido para cristalização de proteínas pode ser severamente reduzida.

Propõe-se, então, a estimativa do segundo coeficiente osmótico do virial através do potencial obtido a partir da resolução da equação de Poisson-Boltzmann. Este modelo proposto possui uma abordagem simplificada e apresenta certas limitações, entretando, pretende-se através deste modelo, descrever comportamentos experimentais e demonstrar que o efeito de inclusão dos potenciais de dispersão de van der Waals proteína-proteína e íon-proteína podem oferecer uma explicação para os resultados experimentais descritos na literatura.

IV.2. Descrição do Modelo

A pressão osmótica Π de uma solução protéica pode ser relacionada à concentração de proteína de acordo com a série do virial.

$$\frac{\Pi}{c_2 RT} = \frac{1}{M_2} + B_{22}c_2 + \dots \text{ termos de ordens elevadas} \quad (\text{IV.1})$$

onde R é a constante universal dos gases, T a temperatura absoluta, M_2 a massa molecular da proteína e c_2 a concentração molar da proteína na solução.

Em baixas concentrações, o desvio do comportamento de uma solução não ideal pode ser suficientemente pequeno, de modo que a série truncada no segundo termo descreva o sistema apropriadamente, reduzindo-a à equação de van't Hoff (Neal et al., 1998).

Da teoria de soluções de McMillan-Mayer (Neal et al., 1998), a relação quantitativa do segundo coeficiente osmótico do virial, B_{22} , para interações moleculares é apresentada em termos do potencial de força média, W_{22} , onde x é a distância intermolecular centro-a-centro entre duas proteínas (Stigter e Hill, 1959):

$$B_{22} = -\frac{N_A}{2M_2^2} \int_0^\infty [e^{-W_{22}/k_B T} - 1] 4\pi x^2 dx \quad (\text{IV.2})$$

onde N_A é o número de Avogrado e k_B a constante de Boltzmann. Em nível molecular, B_{22} reflete a natureza da interação proteína-proteína, levando em consideração as interações diretas e indiretas entre elas (campo médio).

O segundo coeficiente cruzado osmótico do virial, B_{23} , pode ser calculado a partir da equação do virial truncada aplicada para misturas, considerando que as concentrações das duas proteínas em solução, c_2 e c_3 , sejam suficientemente baixas (Kurata, 1982):

$$\frac{\Pi}{RT} = \frac{c_2}{M_2} + \frac{c_3}{M_3} + B_{22}c_2^2 + B_{33}c_3^2 + 2B_{23}c_2c_3 + \dots \text{ termos de ordens elevadas} \quad (\text{IV.3})$$

Deste modo, B_{23} é dado por:

$$B_{23} = -\frac{N_A}{2M_2M_3} \int_0^\infty [e^{-W_{23}/k_B T} - 1] 4\pi x^2 dx \quad (\text{IV.4})$$

onde W_{23} é o potencial de força média entre as proteínas 2 e 3.

Como vimos, há um grande conjunto de técnicas que geram informações sobre interações entre proteínas e os resultados destas técnicas são geralmente expressos em termos do segundo coeficiente osmótico do virial. Uma das técnicas utilizadas para determinação do segundo coeficiente do virial são as técnicas cromatográficas (Teske et al., 2004). Nesta técnica, pretende-se medir as interações entre as proteínas solubilizadas em uma solução salina e as proteínas imobilizadas em um suporte inerte, de acordo com a Figura IV.1. A concentração de proteína solúvel e a fração de suporte inerte aleatoriamente ocupada são baixas de modo que, em cada fase, as proteínas não interajam entre si. Ou seja, proteínas imobilizadas interajam com as proteínas em solução e não interajam entre si e, da mesma forma, proteínas em solução interajam com as proteínas imobilizadas e não interajam entre si. Deste modo, pretende-se evitar a agregação de proteínas e a formação de flocos protéicos.

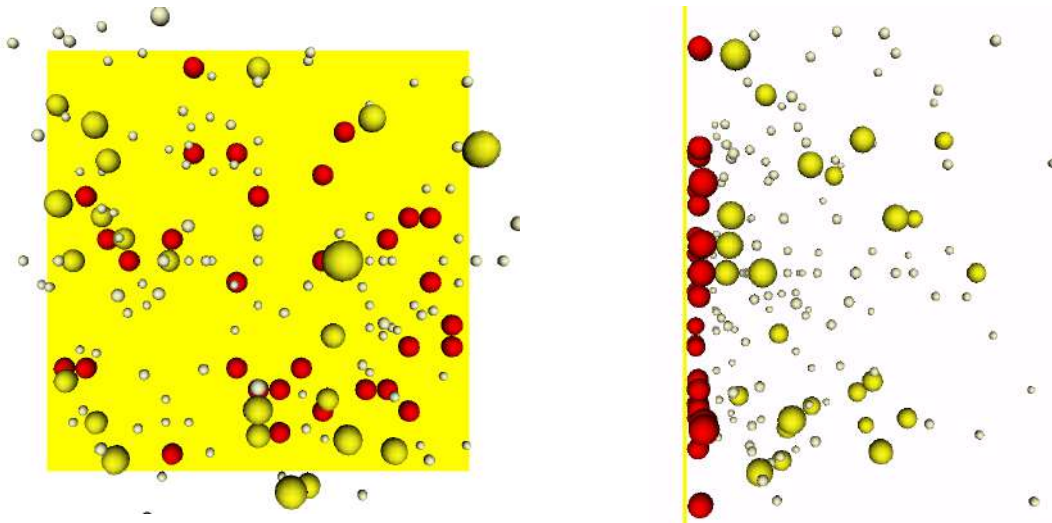


Figura IV.1: Vista superior e lateral esquemáticas, onde as proteínas vermelhas estão imobilizadas no suporte inerte e as proteínas amarelas estão em solução salina, sendo os íons representados pelas esferas menores e brancas.

Para estimar o segundo coeficiente do virial, foi utilizado um modelo onde as proteínas em solução são consideradas como macro-íons dispersos na solução salina e as proteínas fixas são modeladas como uma parede uniformemente carregada, onde a densidade de carga superficial é equivalente à densidade de carga na superfície das proteínas que estariam imobilizadas. A equação não-linear de Poisson-Boltzmann é, então, resolvida numericamente em coordenadas cartesianas (Eq. IV.5), onde os íons não podem estar mais próximo da superfície carregada do que um raio

iónico (r_{ion}) e o macro-ión (proteína) não pode se aproximar mais da superfície do que seu macro-raio (r_p) de acordo com a Figura IV.2.

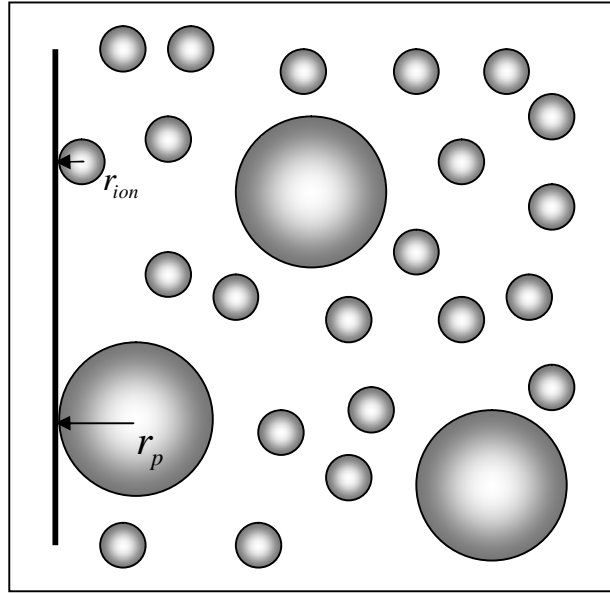


Figura IV.2: Esquema gráfico do modelo proposto para estimativa do segundo coeficiente do virial, onde as proteínas e íons em solução interagem com a superfície carregada através de interações eletrostáticas e de van der Waals, e são distribuídos próximos à superfície de acordo com a equação de Poisson-Boltzmann.

A equação de Poisson-Boltzmann em coordenadas cartesianas pode ser escrita da seguinte forma:

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = \frac{4\pi e}{\epsilon_0 \epsilon_w} \sum_i v_i c_{oi} \exp\left(-\frac{v_i e \phi + U_i}{k_B T}\right) \quad (IV.5)$$

onde $\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12} \text{ C}^2 / (\text{Jm})$ é a permissividade do vácuo, ϵ_w a constante dielétrica do solvente, ϕ o potencial elétrico auto-consistente e U_i o potencial das interações de dispersão.

As duas condições de contorno necessárias para a resolução da equação diferencial de segunda ordem derivam da neutralidade global de cargas. A primeira condição é que o potencial tende à zero no seio da solução. E a segunda condição de contorno é dada pela seguinte equação:

$$\left. \frac{d\phi}{dx} \right|_{x=r_{ion}} = -\frac{e v_{pst} \theta}{\pi r_{pst}^2 \epsilon_0 \epsilon_w} \quad (IV.6)$$

onde θ é a fração da área superficial da fase estacionária ocupada por proteínas imobilizadas, r_{pst} e v_{pst} são, respectivamente, o raio e a valência da proteína na fase estacionária (st). A fração da área superficial da fase estacionária ocupada, adotada neste trabalho, foi determinada de acordo com informações de resultados experimentais determinados e utilizados por Teske et al. (2004) em suas

análises cromatográficas. Fazendo a aproximação que as proteínas estudadas são globulares, o raio de cada proteína foi determinado a partir do volume da proteína reportado na literatura. A valência das proteínas, também foram obtidas da literatura para diversos pHs. As proteínas utilizadas neste estudo foram a lisozima, ovalbumina e albumina de soro bovino (BSA). As informações destas proteínas referente à variação de carga em relação ao pH encontra-se reportadas na Figura II.1 e as informações referentes ao raio, massa molecular, concentração em solução e fração de área superficial ocupada estão disponíveis na Tabela IV.1.

Tabela IV.1: Características físico-químicas das proteínas e da solução protéica (valores obtidos de Teske et al., 2004; Flecha e Levi, 2003; Wyss et al., 1999)

	r_p (Å)	M_w (Da)	θ	c_p (g/L)
Lisozima	17,2	14,0	0,36	0,12
Ovalbumi na	25,0	45,0	-	0,5
BSA	31,3	71,7	0,32	0,5

Normalmente, a diferença de tamanho do raio iônico é pequena e, a fim de destacar o efeito do potencial de dispersão, considerou-se que todos os íons são do mesmo tamanho (2Å de raio). Cada proteína foi modelada como um dielétrico uniformemente carregado e esférico de raio r_p e de concentração c_p em solução. A esfericidade é uma aproximação mais apropriada para a lisozima do que para a ovalbumina e a BSA (Teske et al., 2004).

Já a superfície foi considerada plana e uniformemente carregada. Para determinar a densidade de carga da superfície, considerou-se que na fase estacionária haveria certa quantidade de proteínas aderidas que ocupariam uma fração da área total disponível. Considerando que cada proteína possui πr_{ps}^2 de área e está carregada com a carga v_{ps} , pode-se determinar a densidade de carga superficial (Eq. IV.6).

O modelo proposto apresenta diversas simplificações e limitações no que se referem a uma abordagem quantitativa, entretanto podem ser realizadas avaliações de comportamentos qualitativos. Devem ser destacadas e analisadas as origens e os impactos dessas limitações e simplificações e, principalmente, seus impactos sobre o modelo e sobre os resultados.

A equação de Poisson-Boltzmann não contabiliza os efeitos de exclusão de volume devido ao tamanho finito dos íons em solução. Devido ao aumento de concentração, esse efeito é mais relevante próximo à parede. Assim, a equação de Poisson-Boltzmann apresenta excelentes

resultados para partículas pequenas e univalentes. Por outro lado, a aproximação de que a proteína será considerada um macro-íon que possui carga pode acarretar em erros quantitativos (ver os raios das proteínas na Tabela IV.1), ainda que as tendências e comportamentos dos resultados experimentais possam ser descritos pelas simulações.

Outra simplificação do modelo é considerar que as proteínas “esmagadas” na superfície não apresentam volume. Esta simplificação terá consequências diretas na estimativa do segundo coeficiente do virial, uma vez que este não apresentará valores positivos, ou seja, ainda que em baixas concentrações salinas, as forças repulsivas sejam mais intensas, o segundo coeficiente do virial estimado não irá prever o comportamento repulsivo, mas sim, um coeficiente pouco atrativo.

De acordo com a Equação IV.2, a estimativa do segundo coeficiente do virial requer a determinação do potencial de campo médio. Nesta monografia, o potencial de campo médio foi calculado de modo simplificado, da seguinte forma:

$$W_{32} = v_2 e \phi(x) + \frac{H_{32}}{x^3} \quad (\text{IV.7})$$

onde a proteína 3 está imobilizada (parede) e a proteína 2 está móvel (considerada como um macro-íon em solução). Na Equação IV.7, o campo elétrico é obtido a partir da solução da equação de Poisson-Boltzmann, descrito no item anterior, e H_{32} é o coeficiente de dispersão (van der Waals) entre a proteína móvel (2) e a parede (proteína 3). Notar que neste procedimento, o campo elétrico obtido pela equação de Poisson-Boltzmann depende indiretamente de vários fatores, notadamente, das interações de van der Waals entre íons e proteínas imobilizadas.

IV.3. Resultados e Discussões

IV.3.1. Interação entre lisozima-lisozima

IV.3.1.1. Efeito da concentração salina e do pH

Quando se trata do estudo do segundo coeficiente do virial, a lisozima, de longe, tem sido a proteína mais utilizada. Deste modo, há uma vasta literatura que documenta o comportamento de soluções protéicas de lisozima em um diverso número de condições físico-químicas. Sendo assim, há o interesse em avaliar as tendências do segundo coeficiente osmótico do virial nas seguintes situações: (i) variação da concentração, (ii) variação do pH e (iii) variação do tipo de sal. Nas simulações a respeito das interações lisozima-lisozima, a constante de Hamaker foi utilizada equivalente a $H_{22} = 6k_B T$.

Primeiramente, foi estimado B_{22} para interações de lisozima-lisozima em pH 4,5 em função da concentração de NaCl à 25°C (Fig IV.3) e comparado com resultados experimentais de

espalhamento de luz (Curtis et al., 2002) e cromatografia (Teske et al., 2004). Também, foi estimado B_{22} para interações de lisozima-lisozima à 1M de NaCl em função do pH da solução (Fig IV.4).

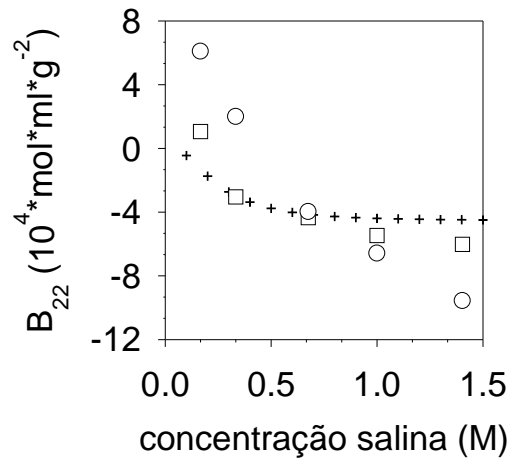


Figura IV.3: Comparação do B_{22} para interações de lisozima-lisozima em NaCl a pH 4,5. Quadrado: SLS (Curtis et al., 2002), círculo: cromatografia (Teske et al., 2004), cruz: calculado.

A adição de eletrólito tanto suprime a força como reduz a escala das interações eletrostáticas, deste modo o aumento da concentração do sal promoveu a diminuição do segundo coeficiente do virial. O comportamento em baixas concentrações iônicas é governado pelas interações eletrostáticas de longo alcance (Fig. IV.3). Neste conjunto de cálculos, as proteínas têm a mesma carga líquida, assim, são eletrostaticamente repelidas entre si. Porém com o aumento da concentração de sal, as proteínas sofrem blindagem pelos íons, reduzindo a intensidade das forças eletrostáticas, de tal maneira que as forças atrativas de van der Waals se tornam evidentes, deixando o segundo coeficiente do virial mais negativo. Porém, o efeito da concentração de sal é observado até um limite, quando o aumento da concentração de sal não tem mais efeito no segundo coeficiente do virial. Os resultados mostram que os cálculos estão em acordo quantitativo com segundo coeficiente do virial obtidos a partir de medidas de espalhamento de luz (SLS) e em acordo qualitativo com segundo coeficiente do virial do método cromatográfico.

A interação das forças intermoleculares pode explicar a tendência qualitativa do segundo coeficiente do virial derivada das mudanças do pH das soluções, como observadas na Figura IV.4. Em baixos pHs (longe do pI), a proteína possui uma alta carga positiva, de modo que o alto valor do segundo coeficiente do virial é resultado da dominação das interações repulsivas da dupla camada elétrica (Retailleau et al., 1997). Com o aumento do pH até o ponto isoelétrico (pI) da proteína, há uma diminuição da magnitude da carga, aumentando, deste modo, a importância da interação atrativa de van der Waals. O novo afastamento do pH em relação ao ponto isoelétrico gera novo aumento das forças eletrostáticas repulsivas que se tornam mais relevantes do que as forças atrativas

de van der Waals, deixando o coeficiente do virial maior. Assim, espera-se que o formato desta curva seja altamente dependente de como a carga superficial da proteína varia com o pH do meio.

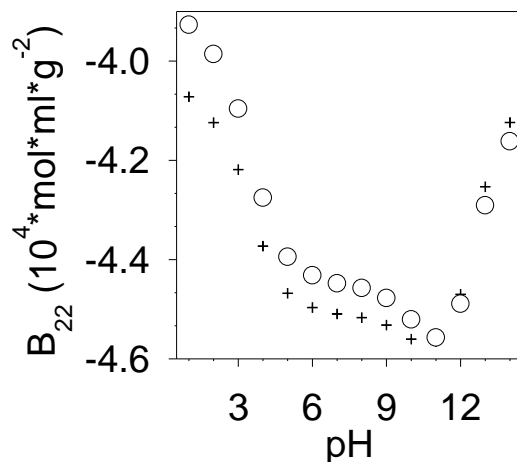


Figura IV.4: Dependência de B_{22} com o pH para interações de lisozima-lisozima à força iônica de 1M. Cruz: NaCl, círculo: íons não polarizáveis monovalentes (npnp).

Ainda na Figura IV.4, pode-se observar o impacto da consideração das forças de dispersão entre íons e superfície carregada sobre o segundo coeficiente do virial. Para pH abaixo do ponto isoelétrico da proteína, a estimativa do segundo coeficiente do virial para íons monovalentes não polarizáveis (npnp) é maior do que a estimativa para íons polarizáveis de NaCl. Já em pH maiores que o ponto isoelétrico da proteína, observa-se o comportamento inverso. É importante perceber que estimativas do segundo coeficiente do virial que não considerem as interações de dispersão dos íons em relação à superfície carregada têm associadas a si o erro equivalente ao desprezo dessas interações, o que em determinados sistemas sensíveis, como os sistemas biológicos, pode ser determinante para o sucesso ou o fracasso da operação ou do processo.

IV.3.1.2. Efeito de especificidade iônica agindo nas seqüências de Hofmeister

Neste ponto, há o interesse em investigar se os segundos coeficientes do virial predizem a série de Hofmeister para o pH abaixo e acima do pI, uma vez que este coeficiente está relacionado ao potencial da força média que pode ser usado em modelos termodinâmicos moleculares para prever equilíbrio de fases (Prausnitz, 2003). Executaram-se cálculos para estudar a influência da dispersão iônica dos ânions e dos cátions sobre os segundos coeficientes do virial. Calculou-se o segundo coeficiente para as interações de lisozima-lisozima em uma variedade de condições de pH e tipo salino à 25°C.

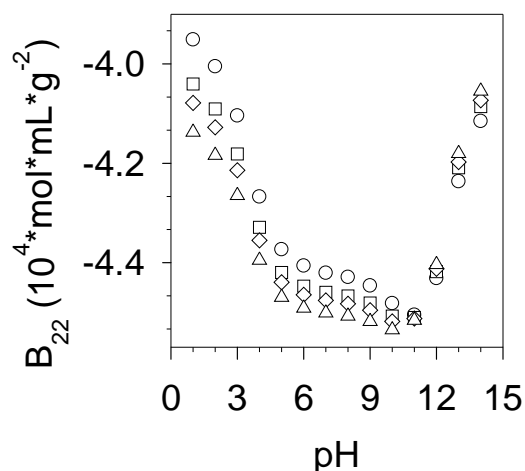


Figura IV.5: Dependência do B_{22} com a identidade do sal em diferentes pH para interações de lisozima-lisozima à força iônica de 1M. Círculo: NaF, quadrado: NaCl, diamante: NaBr, triângulo: NaI.

Os cálculos ilustrados nas Figuras IV.5 e IV.6 demonstram muito claramente que a força iônica sozinha não pode caracterizar e descrever adequadamente a extensão das interações das proteínas, uma vez que a informação do tipo de sal tem um impacto relevante sobre o segundo coeficiente do virial. Sendo assim, escolheu-se uma força iônica elevada que viabilize as investigações em condições em que as interações eletrostáticas de longo alcance entre as proteínas estejam minimizadas devido ao “screening” iônico. Na Figura IV.5, observa-se o efeito da especificidade aniônica para diferentes sais de sódio.

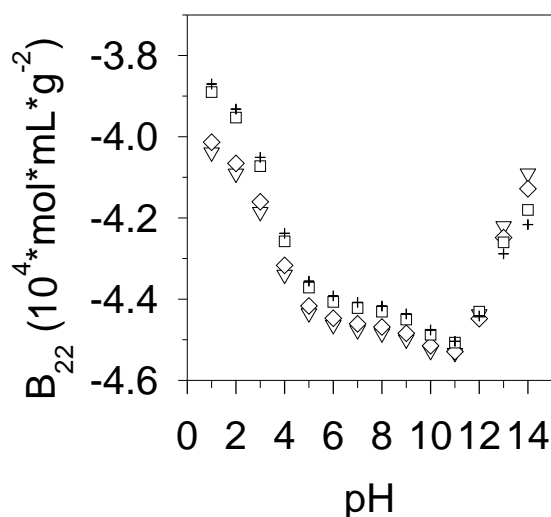


Figura IV.6: Dependência do B_{22} com a identidade do sal e o pH para interações de lisozima-lisozima à força iônica de 1M. Triângulo: NaCl, diamante: KCl, quadrado: CaCl_2 , cruz: BaCl_2 .

Considerando, primeiramente, um exemplo onde o pH esteja abaixo do ponto isoelétrico. Sabe-se que os íons de brometo são mais polarizáveis do que os íons cloreto, conseqüentemente,

espera-se que as interações da proteína-proteína na solução de NaCl sejam mais repulsivas do que em solução de NaBr. Tal comportamento foi verificado experimentalmente no trabalho de Taratuta et al. (1990) e os resultados satisfazem tal expectativa. Supõe-se, geralmente, que os efeitos do contra-íon sejam maiores do que efeitos dos co-íons; entretanto pode ser visto nas Figuras IV.5 e IV.6 que os efeitos da variação dos co-íons são visíveis.

Observa-se que para a variação de ânions (Fig. IV.5) em $\text{pH} < \text{pI}$ (onde os ânions são contra-íons), as forças da dupla camada repulsiva aumentam na ordem reversa da série de Hofmeister ($\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$), enquanto que em $\text{pH} > \text{pI}$ (onde os ânions são co-íons), forças aumentam na ordem direta da série de Hofmeister ($\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$). E para a variação de cátions (Fig. IV.6), em $\text{pH} < \text{pI}$ (onde os cátions são co-íons) as forças da dupla camada repulsiva aumentam na ordem direta da série de Hofmeister ($\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+$), enquanto que em $\text{pH} > \text{pI}$ (onde os cátions são contra-íons), as forças aumentam na ordem reversa da série de Hofmeister ($\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$). Ou seja, para ânions ou cátions são observadas seqüências de Hofmeister diferentes quando o pH da solução é maior ou menor do que o ponto isoelétrico da solução. Existem evidências teóricas e experimentais que indicam esse comportamento (Boström et al., 2005).

IV.3.2. Interação entre proteínas diferentes

O foco da maioria dos estudos experimentais na literatura é dado, principalmente, à sistemas de apenas uma proteína. Entretanto, em processos de separação de proteínas, há a necessidade da extensão de informações para sistemas onde duas ou mais proteínas diferentes estão em solução. A modelagem de sistemas multi-protéticos requer não somente informação de interações entre proteínas semelhantes, mas, também, de interações entre proteínas diferentes.

Medidas do segundo coeficiente do virial cruzado, B_{23} , para um par proteína(2)-proteína(3) fornecem dados úteis na determinação de circunstâncias ótimas de precipitação ou cristalização de uma proteína alvo contida em uma mistura de proteínas. Os dados de interações proteína(2)-proteína(3) são escassos, uma vez que tais medidas são de difícil determinação através de métodos comuns. O segundo coeficiente do virial cruzado para pares desiguais de proteína não pode ser medido diretamente usando osmometria de membrana ou espalhamento de luz. Através destas técnicas, para se obter o B_{23} deve-se, primeiramente, determinar B_{22} e B_{33} , e então, calcular o B_{23} .

A cromatografia quantitativa de afinidade, a princípio, pode determinar as interações cruzadas diretamente, asseguradas algumas suposições (Teske et al., 2004). Diversos autores descreveram o uso da cromatografia na medição de interações proteína-proteína. Neste procedimento, há uma proteína imobilizada em uma fase estacionária porosa inerte e outra proteína que percola através da coluna na fase móvel. A fim de se obter um número que equivalha à interação entre proteínas usando o método cromatográfico, se faz necessário o uso de diversas considerações e

simplificações. Baseado no método cromatográfico quantitativo de determinação do segundo coeficiente do virial, neste trabalho, propõe-se estimar o segundo coeficiente cruzado do virial através da consideração da proteína imobilizada como a própria superfície uniformemente carregada e a proteína móvel em solução como macro-íons.

IV.3.2.1. Interação entre lisozima e albumina de soro bovino

Nesta etapa, estudou-se as interações entre albumina de soro bovino e lisozima em função da concentração de NaCl e do pH usando-se a constante de Hamaker equivalente a $5k_B T$.

Tabela IV.2: Tabela comparativa de resultados.

pH	C _{NaCl}	$B_{ij} (10^4 \cdot \text{ml} \cdot \text{mol} / \text{g}^2)$			
		Lisozima imobilizada		BSA imobilizada	
		cromatografia [§]	calculado	cromatografia [§]	calculado
4	0,1	0,6	-0,984	3,1	-1,009
	0,2	-0,1	-1,948	1,5	-2,831
	0,3	-0,3	-2,263	-0,1	-3,750
	0,5	-0,7	-2,425	-1,2	-4,475
	1	-1,2	-2,495	-2,9	-4,806
5.5	0,1	-1,7	-4,078	-2,3	-12,841
	0,2	-0,8	-2,746	-0,5	-6,754
	0,3	-0,6	-2,584	-1,7	-5,667
	0,5	-0,4	-2,540	-1,1	-5,115
	1	-0,2	-2,545	-0,4	-4,898
7	0,1	-2,4	-4,691	-4,1	-20,644
	0,2	-0,8	-2,734	-3,5	-7,999
	0,3	-0,7	-2,518	-1,9	-6,119
	0,5	-0,3	-2,475	-0,7	-5,235
	1	-0,3	-2,501	0,1	-4,914
8	0,1	-4,0	-4,684	-13,2	-25,033
	0,2	-0,9	-2,670	-4,4	-8,643
	0,3	-0,5	-2,450	-2,2	-6,345
	0,5	-0,5	-2,419	-0,7	-5,295
	1	-0,4	-2,465	0,5	-4,922

[§] Teske et al., 2004

Dois conjuntos de cálculos foram realizados: primeiramente com a proteína *i* imobilizada enquanto a proteína *j* estava móvel e, posteriormente, os papéis das proteínas se inverteram e a proteína *j* estava imobilizada enquanto a proteína *i* estava móvel. Deste modo, pode-se avaliar como os resultados dependem da identidade da proteína em cada papel desempenhado. A princípio, B_{ij} e B_{ji} seriam equivalentes, entretanto, como se observa na Tabela IV.2, tanto o valor do segundo coeficiente cruzado do virial calculado como o experimentalmente, determinado pelo método cromatográfico, dependem da identidade de cada proteína em cada papel.

Em pH 4,0, ambas as proteínas estão positivamente carregadas, deste modo, o potencial eletrostático entre elas é repulsivo. O valor do potencial eletrostático é altamente dependente da concentração iônica. Enquanto a concentração iônica aumenta, as cargas nas moléculas da proteína sofrem “screening” e a força de interação eletrostática declina (Fig. IV.7), aumentando a atração devido às forças de dispersão mais evidentes.

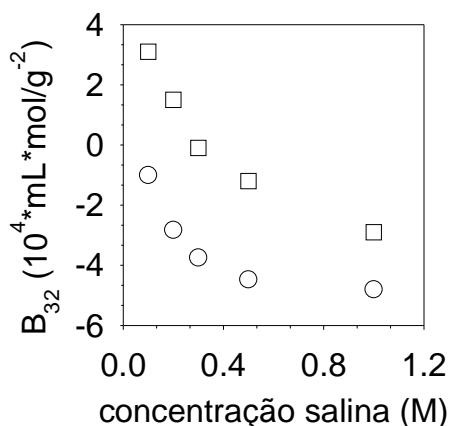


Figura VI.7: Comparação do B_{32} para interações BSA-lisozima com BSA imobilizada em NaCl a pH 4. Quadrado: cromatografia (Teske et al, 2004), círculo: calculado.

Em pH 8,0, as proteínas possuem cargas opostas, assim elas se atraem mutuamente. Com o aumento da concentração de sal, as proteínas sofrem “screening” pelos íons, reduzindo a intensidade da força eletrostática, deixando o segundo coeficiente do virial mais positivo. Quando isto acontece, as forças atrativas de van der Waals tornam-se mais importantes (Fig. IV.8). Entretanto, o efeito da concentração de sal é observado até um limite, quando o aumento da concentração de sal não tem mais efeito sobre o segundo coeficiente do virial.

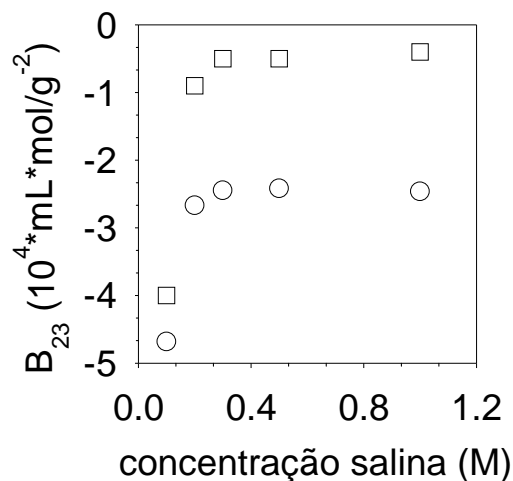


Figura IV.8: Comparação do B_{23} para interações lisozima-BSA com lisozima imobilizada em NaCl a pH 8. Quadrado: cromatografia (Teske et al., 2004), círculo: calculado.

A Tabela IV.2 apresenta uma comparação entre os valores de B_{ij} e B_{ji} calculados e determinados experimentalmente por um método cromatográfico quantitativo. Pode ser observado que há uma concordância de tendências qualitativas (Figuras IV.7, IV.8 e IV.9) entre os segundos coeficientes do virial calculados com os determinados pelo método cromatográfico (Teske et al., 2004).

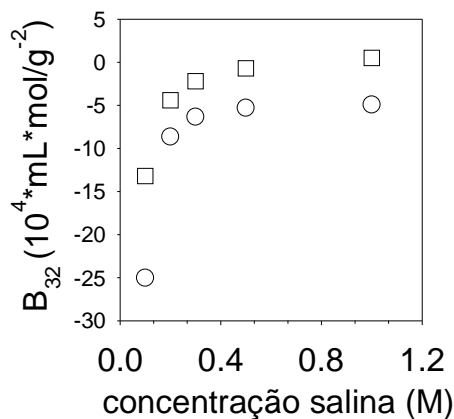


Figura 8: Comparação do B_{32} para interações BSA-lisozima com BSA imobilizada em NaCl a pH 8. Quadrado: cromatografia (Teske et al., 2004), círculo: calculado.

IV.3.2.2. Interação entre lisozima e ovalbumina

Interações entre ovalbumina e lisozima em função do pH e do tipo de sal foram avaliadas para sistemas de força iônica equivalente a 0,1M. Os conjuntos de cálculos foram realizados com a

lisozima sendo a proteína imobilizada e a ovalbumina sendo a proteína em solução, com a constante de Hamaker equivalente a $H_{32} = 4k_B T$.

Neste sistema, a proteína imobilizada é a lisozima, uma vez que, experimentalmente, a ovalbumina apresenta dificuldades técnicas para ser fixada ao suporte inerte. Deste modo, no estudo de sistemas de ovalbumina e lisozima, apenas sistemas com ovalbumina em solução foram analisados, uma vez que apenas este caso apresenta resultados experimentais que viabilizem comparações entre valores estimados e resultados experimentais.

Na zona de pH estudada, a lisozima é positivamente carregada, já a ovalbumina cruza seu ponto isoelétrico ($pI \cong 5$) mudando de positivamente carregada à negativamente carregada com o aumento do pH. Para estudar o efeito de especificidade iônica no sistema, foi realizado uma comparação entre NaCl e CaCl₂, mantendo constante a força iônica do meio igual a 0,1M.

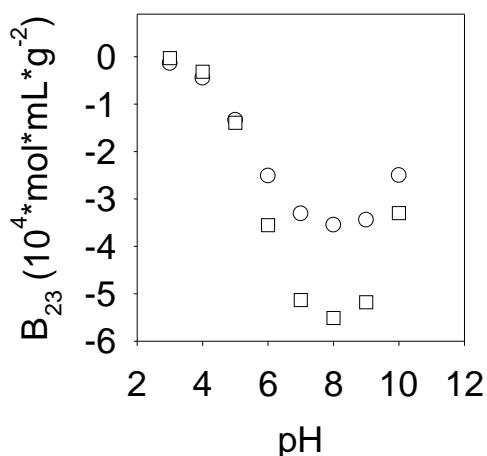


Figura IV.10: Efeito do tipo de sal sobre o B_{23} calculado para as interações entre lisozima-ovalbumina com lisozima imobilizada em função do pH e do tipo de sal para força iônica 0,1M à 25°C. Círculo: NaCl, quadrado: CaCl₂.

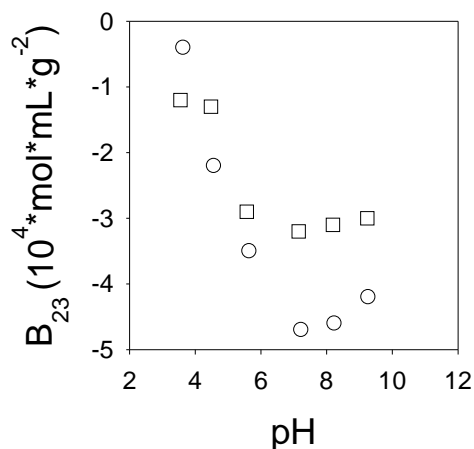


Figura IV.11: Efeito do tipo de sal sobre o B_{23} do método cromatográfico (Teske et al, 2004) para as interações entre lisozima-ovalbumina com lisozima imobilizada em função do pH e do tipo de sal para força iônica 0,1M à 25°C. Círculo: NaCl, quadrado: CaCl₂.

Considerando que os efeitos dos contra-íons são, geralmente, mais impactantes aos sistemas do que os efeitos dos co-íons e que a superfície é positivamente carregada, é esperado que o íon cloreto tenha um papel importante neste sistema. Pode-se observar, de acordo com Figura IV.10, que as interações no meio com CaCl₂ são mais atrativas do que as interações no meio com NaCl. Nesse caso, o contra-íon cloreto responsável pelo “screening” da proteína imobilizada está em menor concentração no meio com CaCl₂ em solução (0,06M, o que significa força iônica de 0,1M) do que no meio com NaCl (0,1M), de modo que as interações elétricas deixem as interações em CaCl₂ mais atrativas do que em NaCl.

Entretanto, em sistemas reais (veja Figura IV.11), a influência do contra-íon da proteína em solução têm uma ação importante no sistema e não podem ser negligenciada. O efeito de “screening” na proteína móvel em solução (ovalbumina) pelos cátions é mais relevante do que o efeito de “screening” na proteína imobilizada (lisozima) pelos ânions, especialmente em pH elevado. O efeito de substituir o íon sódio por um íon divalente é o mais pronunciado em valores de pH acima do ponto isoelétrico da ovalbumina, provavelmente devido à possível adsorção dos cations divalentes na superfície da ovalbumina. Os sais com íons divalentes como o íon cálcio tendem a se adsorverem mais do que íons monovalentes como foi visto no Capítulo III desta monografia. Este efeito é consistente com as simulações de colóides opostamente carregados na presença de sais que contêm íons divalentes.

IV.4. Conclusões

Estimando as interações entre proteínas em uma variedade de condições, os resultados das interações lisosima-lisozima mostraram acordo quantitativo entre os valores dos segundos coeficientes do virial com aqueles obtidos experimentalmente pelo espalhamento de luz e acordo qualitativo com aqueles obtidos pelo método cromatográfico, usando a constante de Hamaker (interação de dispersão proteína-proteína) como esperado teoricamente, ao redor de $6k_B T$. Para o sistema de albumina de soro bovino e lisozima, o modelo usado prediz os comportamentos qualitativos, fato que não é verdadeiro para o sistema de lisozima e ovalbumina, uma vez que o modelo negligencia o efeito dos íons sobre a proteína em solução.

Examinado as interações de dispersão cátion-proteína e ânion-proteína, verificou-se que os efeitos de inclusão dos potenciais de dispersão íon-proteína originados das polarizabilidades dos íons e das proteínas oferecem uma explanação apropriada para a série de Hofmeister, sendo estes importantes na descrição dos sistemas colóides.

Conclui-se que o modelo proposto baseado na resolução da equação não-linear de Poisson-Boltzmann pode ser usado para cálculo de tendências de propriedades termodinâmicas de sistemas coloidais. Mesmo que certas simplificações em sua concepção promovam limitações de aplicabilidade, esta metodologia pode ser uma ferramenta útil na inspeção prévia de cenários para determinação de propriedades de proteínas com economia de recursos que, normalmente, são despendidos com a finalidade de determinação de solubilidades de proteínas.

Capitulo V

Conclusões Gerais e

Sugestões para Trabalhos

Futuros

Capítulo V – Conclusões Gerais e Sugestões para Trabalhos Futuros

Embora a teoria clássica DLVO tenha sido um grande avanço no estudo das interações entre partículas de sistemas coloidais ao tratar as interações eletrostáticas e de dispersão entre macro-partículas como interações de mesma magnitude, tal teoria negligenciava as interações não-eletrostáticas (van der Waals) entre íons e macro-partículas. Ratificando estudos recentes, esta monografia indica que as interações de dispersão entre íons e macro-partículas são relevantes em termos de propriedades físico-químicas, de modo que desempenham um papel fundamental na interpretação de propriedades de sistemas biológicos e coloidais e podem fornecer informações fundamentais para o desenvolvimento de processos químicos e bioquímicos.

Neste trabalho, foi visto como a consideração das interações de dispersão originárias das polarizabilidades dos íons e proteínas em solução e da regulação de cargas em uma superfície protéica modifica o potencial de campo médio, afetando as concentrações dos íons nas proximidades da superfície da proteína, assim como, o efeito da variação do pH sobre a distribuição de íons próximos à superfície e sobre o potencial de campo médio. Estudando a dependência do potencial de campo médio com o tipo de sal usado e os efeitos de Hofmeister para precipitação e coagulação de proteínas pôde-se oferecer uma explicação à série de Hofmeister relativa a especificidade iônica do sal da solução.

Ainda levando em consideração as interações de dispersão originárias das polarizabilidades dos íons e proteínas em solução, estudou-se as interações de partículas coloidais em um campo eletrostático, a partir de uma metodologia simplificada para avaliar o segundo coeficiente do virial através do potencial eletrostático obtido pela equação de Poisson-Boltzmann somada do potencial de dispersão. Verificou-se que o modelo proposto, baseado na resolução da equação não-linear de Poisson-Boltzmann, pode ser usado para o cálculo de tendências de propriedades termodinâmicas de sistemas coloidais além de viabilizar investigações sobre a efetividade relativa de vários íons sobre propriedades de soluções protéicas que seguem a seqüência direta ou inversa de Hofmeister de acordo com sua posição relativa entre o pH e o ponto isoelétrico.

Nas sugestões a serem desenvolvidos em trabalhos futuros estão, entre outros: (i) a verificação da variação da tensão superficial de soluções salinas, incluindo os efeitos do tipo de sal e concentração (força iônica do meio), avaliando como o potencial de dispersão entre os íons e a superfície líquido-vapor, o tamanho do íon e a energia de hidratação contribuem para modificar a tensão superficial na interface líquido-vapor; (ii) o aprimoramento da metodologia para estimação do segundo coeficiente do virial, determinando o potencial de campo médio correspondente à

interação entre duas superfícies planares, aproximando para superfícies esféricas segundo a aproximação de Deryaguin; e (iii) a determinação do campo de forças entre duas partículas coloidais esféricas através da equação não-linear de Poisson-Boltzmann em coordenadas biesféricas.

A tensão superficial é energia por unidade de área superficial devido as diferentes interações intermoleculares nas fases que definem a interface. Em soluções salinas, a tensão superficial pode ser afetada tanto pela concentração do sal como pela própria natureza do tipo salino. Cada íon possui um potencial de dispersão iônica e uma energia de solvatação iônica característicos, podendo afetar diferentemente um dado sistema. A energia livre do íon pode ser alterada quando o íon se desloca do seio da solução para a região da interface, uma vez que o perfil de concentração de água se altera neste percurso. A consideração da energia de solvatação dos íons poderia, não apenas, trazer contribuições aos estudos da variação da tensão superficial e do potencial de superfície, como também, auxiliar no esclarecimento dos efeitos de Hofmeister, juntamente com os potenciais de dispersão iônica.

Dada a grande importância e utilidade da determinação do segundo coeficiente do virial para previsão de cenários e projeto de processos, propõe-se a construção de um esquema de resolução numérica para a equação não-linear de Poisson-Boltzmann em coordenadas biesféricas, a fim de determinar o campo de força entre duas partículas coloidais esféricas. Dado a simetria do campo de força quando duas partículas são equivalentes em tamanho e carga, o domínio da resolução seria restrito à apenas um quadrante, em duas dimensões; enquanto que, em casos onde as partículas possuem diferentes tamanhos ou diferentes magnitudes de cargas, o domínio se amplia para dois quadrantes, mas ainda em duas dimensões. Uma alternativa à resolução da equação em coordenadas biesféricas, seria a utilização da aproximação de Deryaguin. Nesta alternativa, a partir do perfil do potencial entre dois corpos, estima-se a pressão entre duas superfícies planas (Israelachvili, 1995) e calcula-se a força entre duas partículas através da integração da pressão osmótica para diferentes distâncias entre as partículas. Em ambos os casos, os efeitos devido as interações de dispersão originárias das polarizabilidades dos íons e macro-partículas sobre os sistemas podem ser avaliados e comparados a resultados experimentais disponíveis na literatura, contribuindo para a elucidação de comportamentos e aprofundamento de discussões teóricas.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Ayres, G.H. *Análisis Químico Cuantitativo*, Harla, 1970, México.
- Behlke, J., Ristau, O. (1999) Analysis of the thermodynamic non-ideality of proteins by sedimentation equilibrium experiments. *Biophysical Chemistry* 76, 13-23
- Bloustone, J., Berejnov, V., Fraden, S. (2003) Measurements of Protein-Protein Interactions by Size Exclusion Chromatography. *Biophys. J.* 85, 2619
- Boström, M., Williams, D.R.M., Ninham, B.W. (2002) Ion Specificity of Micelles Explained by Ionic Dispersion Forces. *Langmuir* 18, 6010
- Boström, M., Williams, D.R.M., Ninham, B.W. (2002) Influence of Hofmeister Effects on Surface pH and Binding of Peptides to Membranes. *Langmuir* 18, 8609
- Boström, M., Craig, V.S.J., Albion, R., Williams, D.R.M., Ninham, B.W. (2003) Hofmeister Effects in pH Measurements: Role of Added Salt and Co-Ions. *J. Phys. Chem. B* 107, 2875
- Boström, M., Williams, D.R.M., Ninham, B.W. (2003) Specific Ion Effects: Why the Properties of Lysozyme in Salt Solutions Follow a Hofmeister Series. *Biophys. J.* 85, 686
- Boström, M., Williams, D. R. M., Ninham, B.W. (2004) Specific ion effects: Role of salt and buffer in protonation of cytochrome c. *Eur. Phys. J. E* 13, 239
- Boström, M., Tavares, F.W., Tardieu, A., Ninham, B.W. (2005) Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI. *Biophys Chem.* 117, 217-224
- Boyce, W.E., Diprima, R.C. *Equações diferenciais elementares e problemas de valores de contorno*, LTC editora, 2002, Rio de Janeiro.
- Bratko, D., Striolo, A., Wu, J.Z., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M. (2002) Orientation-averaged pair potentials between dipolar proteins or colloids. *J. Phys. Chem. B* 106, 2714-2720
- Bratko, D., Curtis, R.A., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M., (2001) Interaction between hydrophobic surfaces with metastable intervening liquid. *J. Chem. Phys.* 115, 3873-3877
- Carbonnaux, C., Ries-Kautt, M., Ducruix, A. (1995) Relative effectiveness of various anions on the solubility of acidic *Hypoderma lineatum* collagenase at pH 7.2. *Protein Sci.* 4, 2123
- Chapman, D.L. (1913) A contribution to the theory of electrocapillarity. *Philos. Mag.* 25, 475
- Chiew, Y.C., Kuehner, D.E., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M. (1995) Molecular Thermodynamics for Salt-Induced Protein Precipitation. *A.I.Ch.E. Journal* 41, 2150
- Conway, K.A., Harper, J.D., Lansbury Jr., P.T. (2000) Fibrils Formed in Vitro from R-Synuclein and Two Mutant Forms Linked to Parkinson's Disease are Typical Amyloid. *Biochemistry* 39, 2552-2563
- Evans, D.F., Mitchell, D.J., Ninham, B.W. (1984) Ion Binding and Dressed Micelles. *J. Phys. Chem.* 88, 6344

- Flecha, F.L.G., Levi, V. (2003) Determination of the Molecular Size of BSA by Fluorescence Anisotropy. *Biochem. Educ.* 31, 319-322
- George, A., Wilson, W.W. (1994) Predicting protein crystallization from a dilute solution property. *Acta Crystallogr. D* 50, 361–365
- Gouy, G. (1910) Sur la constitution de la charge électrique a la surface d'un électrolyte. *J. Phys. Theor. Appl.* 9, 455
- Grant, M.L. (2001) Nonuniform charge effects in protein-protein interactions. *J. Phys. Chem. B* 106, 2858-2863
- Grigsby, J.J., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M. (2001) Cloud-point temperatures for lysozyme in electrolyte solutions: effect of salt type, salt concentration and pH. *Biophys.Chem.* 91, 231-243
- Guo, B., Kao, S., McDonald, H., Asanov, A., Combs, L.L., Wilson, W.W. (1999) Correlation of second virial coefficients and solubilities useful in protein crystal growth. *Journal of Crystal Growth* 196, 424-433
- Haynes, C., Tamura, K., Körfer, H., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M. (1992) Thermodynamics properties of aqueous chymotrypsin solutions from membrane osmometry measurements. *J. Phys. Chem.* 96, 905-912
- Heiser, V., Scherzinger, E., Boeddrich, A., Nordhoff, E., Lurz, R., Schugardt, N., Lehrach, H., Wanker, E.E. (2000) Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: Implications for Huntington's disease therapy. *PNAS* 97, 6739–6744
- Hofmeister, F. (1887) About regularities in the protein precipitating effects of salts and the relation of these effects with physiological behavior of salts. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol* 24, 247–260
- Israelachvili, J. Intermolecular and surface forces, 2nd ed., Academic Press, 1995, London.
- Jafelicci, M.J., Varanda, L.C. (1999) O mundo dos colóides. *Qui. nov. na escola* 9, 9-13
- Koelsch, P., Motschmann, H. (2004) An experimental route to Hofmeister. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 9, 87
- Kotz, J.C., Treichel, P.J. Química e reações químicas, LTC editora, 1998, Rio de Janeiro.
- Kunz, W., Henle, J., Ninham, B.W. (2004) 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 9, 19–37
- Kurata M. Thermodynamics of Polymer Solutions, Vol. 1, Harwood, 1982, New York.
- Lehninger, A.L. Bioquímica, Editora Edgard Blücher, 1976, São Paulo.
- Licínio, P., Delaye, M. (1987) Da catarata aos colóides. *Ciência Hoje* 6, 13

- Lomakin, A., Teplov, D.B., Kirschner, D.A., Benedek, G.B. (1997) Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid β -protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 7942–7947
- McMillan Jr., W.G., Mayer, J.E. (1945) The Statistical Thermodynamics of Multicomponent Systems. *J. Chem. Phys.* 13, 276–305
- Moon, Y.U., Curtis, R.A., Anderson, C.O., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M. (2000) Protein–Protein Interactions in Aqueous Ammonium Sulfate Solutions. Lysozyme and Bovine Serum Albumin (BSA). *Journal of Solution Chemistry* 29, 8
- Moon, Y.U., Anderson, C.O., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M. (2000) Osmotic pressures and second virial coefficients for aqueous saline solutions of lysozyme. *Fluid Phase Equilibria* 168, 229–239
- Muschol, M., Rosenberger, F. (1995) Interactions in undersaturated and supersaturated aggregate formation in lysozyme solutions: static and dynamic light scattering results. *J. Chem. Phys.* 103, 10424
- Neal, B.L., Asthagiri, D., Lenhoff, A.M. (1998) Molecular Origins of Osmotic Second Virial Coefficients of Proteins *Biophys. J.* 75, 2469–2477
- Ninham, B.W. (1999) On progress in forces since the DLVO theory. *Adv. Colloid Interface Sci.* 83, 1–17
- Ninham, B.W., Parsegian, V.A. (1971) Electrostatic potential between surfaces bearing ionizable groups in ionic equilibrium with physiologic saline solution. *J. Theor. Biol.* 31, 405
- Osipow, L.I. Surface chemistry - Theory and Industrial Applications. Reinhold publishing corporation, 1962, New York.
- Parsegian, V.A. (1974) Possible modulation of reactions on the cell surface by changes in electrostatic potential that accompany cell contact. *Ann. NY Acad. Sci.* 238, 362
- Piazza, R. (2000) Interactions and phase transitions in protein solutions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5, 38–43
- Pinto, J.C., Lage, P.L.C. Métodos matemáticos em problemas de engenharia química, E-papers serviços editoriais, 2001, Rio de Janeiro.
- Prausnitz J.M. (2003) Molecular thermodynamics for some applications in biotechnology. *Pure Appl. Chem.* 75, 859–873
- Quagliano, J.V., Vallarino, L.M. Química, Editora Guanabara Dois, 1979, Rio de Janeiro.
- Retailleau, P., Ries-Kautt, M., Ducruix, A. (1997) No salting-in of lysozyme chloride observed at low ionic strength over a large range of pH. *Biophys. J.* 73, 2156–2163
- Ries-Kautt, M., Ducruix, A. (1989) Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. *J. Biol. Chem.* 264, 745–748

- Rocha, W.R. (2001) Interações intermoleculares. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola* 4, 31-36
- Rosenbaum, D.F., Zukoski, C.F. (1996) Protein interactions and crystallization. *Journal of Crystal Growth* 169, 752
- Schaink, H.M., Smit, J.A.M. (2000) Determination of osmotic second virial coefficient and dimerization of beta-lactoglobulin in aqueous solutions with added salt at the isoelectric point. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 1537-1541
- Shaw, D.J. Introdução à Química dos Colóides e de Superfície, Ed. Edgard Blucher Ltda, 1975, São Paulo.
- Stigter, D., Hill, T. (1959) Theory of the Donnan Membrane Equilibrium. II. Calculation of the Osmotic Pressure and of the Salt Distribution in a Donnan System with Highly Charged Colloid Particles. *J. Phys. Chem.* 63, 551-555
- Striolo, A., Bratko, D., Prausnitz, J.M. (2001) Influence of Polymer Structure upon Active-Ingredient Loading: a Monte Carlo Simulation Study for Design of Drug-Delivery Devices. *Fluid Phase Equilibria* 183, 341
- Striolo, A., Bratko, D., Prausnitz, J.M. (2002) Pair-wise additivity for potentials of mean force in dilute polymer solutions. *Polymer* 43, 591-597
- Taratuta, V.G., Holschbach, A., Thurston, G.M., Blankschtein D., Benedek, G.B. (1990) Liquid-liquid phase separation of aqueous lysozyme solutions: Effects of pH and salt identity. *J. Phys. Chem.* 94, 2140-2144
- Tardieu, A., Bonnete, F., Finet, D.S., Vivares, D. (2002) Understanding salt or PEG induced attractive interactions to crystallize biological macromolecules. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 58, 1549-1553
- Tavares, F.W., Sandler, S.I. (1997) Phase Equilibria Determination of the One-Component Mean Force Potential of Globular Protein Solutions. *AIChE Journal* 43, 218
- Tavares, F.W., Prausnitz, J.M. (2004a) Analytic Calculation of Phase Diagrams for Solutions Containing Colloids or Globular Proteins. *Colloid and Polymer Sci.* 282, 620
- Tavares, F.W., D. Bratko, A. Striolo, H.W. Blanch, Prausnitz, J.M. (2004b) Phase Diagrams for Charged Dipolar Colloids in Aqueous Solution with Orientation-Averaged Pair potentials. *Journal of Chemical Physics* 120, 9859
- Tavares, F.W., Bratko, D., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M. (2004c) Ion-Specific Effects in the Colloid-Colloid or Protein-Protein Potential of Mean Force: Role of Salt Macroion van der Waals Interactions. *Journal of Physical Chemistry B* 108, 9228
- Ten Wolde, P.R., Frenkel, D. (1999) Enhanced protein crystallization around the metastable critical point. *Theoret. Chem. Account* 101, 205-208

- Teske, C.A., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M. (2004) Chromatographic measurement of interactions between unlike proteins. *Fluid Phase Equilibria* 219, 139
- Teske, C.A., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M. (2004) Measurement of Lysozyme-Lysozyme interactions with quantitative affinity chromatography. *J. Phys. Chem. B* 108, 7437
- Tessier, P.M., Abraham, M., Lenhoff, A.M., Sandler, S.I. (2002) Rapid Measurement of Protein Osmotic Second Virial Coefficients by Self-Interaction Chromatography. *Biophysical J.* 82, 1620
- Walker, J. (1989) The colors seen in the sky offer lessons in optical scattering. *Scientific American* 1, 84-87
- Wu, J.Z., Bratko, D., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M. (1999) Monte Carlo simulation for the potential of mean force between ionic colloids in solutions of asymmetric salts. *J. Chem. Phys.* 111, 7084-7094
- Wyss, M., Pasamontes, L., Friedlein, A., Rémy R., Tessier, M., Kronenberger, A., Middendorf, A., Lehmann M., Schnoebelen, L., Röthlisberger, U., Kuszniir, E., Wahl, G., Müller, F., Lahm, H.W., Vogel, K., van Loon, A.P.G.M. (1999) Biophysical Characterization of Fungal Phytases (*myo*-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Molecular Size, Glycosylation Pattern, and Engineering of Proteolytic Resistance. *Appl. Envir. Microbiol* 65, 359-366
- Velev, O.D., Kaler, E.W., Lenhoff, A.M. (1998) Protein Interactions in solution characterized by light and neutron scattering: comparison of lysozyme and chymotrypsinogen. *Biophysical J.* 75, 2682-2697
- Verwey, E.J.W., Overbeek, J.T.K. Theory of Stability of Lyophobic Colloids, Elsevier, 1948, New York.
- Voet, D., Voet, J.G. Biochemistry, Second Edition, John Willey & sons, Inc, 2005, USA.
- Vold, R.D., Vold, M.J. Colloid and interface chemistry, Addison-Wesley publishing company, INC, 1983, California.
- Voyutsky, S. Colloid Chemistry, Mir Publishers, 1978, Moscow.
- Zimm, B.H. (1946) Applications of the methods of molecular distribution to solutions of large molecules. *J. Chem. Phys.* 14, 164-179
- Zhou, H.-X., Vijayakumar, M. (1997) Modeling of Protein Conformational Fluctuations in pK_a Predictions. *J. Mol. Biol.* 267, 1002

Apêndice A

Apêndice A

Neste anexo será apresentada a solução analítica da equação de Poisson-Boltzmann na abordagem de Gouy-Chapman para sais simétricos em coordenadas cartesianas e sem a inclusão do potencial de dispersão iônica.

A equação diferencial de Poisson-Boltzmann generalizada:

$$\nabla \cdot (\epsilon \nabla \psi(\mathbf{x})) + e \sum z_i c_{i0} \exp\left[-\frac{z_i e \psi(\mathbf{x})}{k_B T}\right] = 0 \quad (\text{A.1})$$

Ignorando-se todos os tipos de forças, exceto aquelas derivadas de forças de Coulomb, temos que o potencial de um íon em um elemento de volume é o potencial eletrostático ψ :

$$\nabla \cdot (\epsilon \nabla \psi(\mathbf{x})) + e \sum z_i c_{i0} \exp\left[-\frac{z_i e \psi(\mathbf{x})}{k_B T}\right] = 0 \quad (\text{A.2})$$

Em coordenadas cartesianas e para eletrólitos simétricos, o problema unidirecional toma a forma:

$$\frac{d^2 \psi(x)}{dx^2} = -\frac{e}{\epsilon} \left(z_+ c_{+0} \exp\left[-\frac{z_+ e \psi(x)}{k_B T}\right] + z_- c_{-0} \exp\left[-\frac{z_- e \psi(x)}{k_B T}\right] \right) \quad (\text{A.3})$$

$$\frac{d^2 \psi(x)}{dx^2} = \frac{ezc_0}{\epsilon} \left(\exp\left[\frac{ez\psi(x)}{k_B T}\right] - \exp\left[-\frac{ez\psi(x)}{k_B T}\right] \right) \quad (\text{A.4})$$

onde z é a valência do sal simétrico.

Considerando a superfície carregada positivamente e o eletrólito simétrico, as seguintes condições de contorno são compatíveis:

$$\begin{cases} \psi = \psi_0 & \text{quando } x = 0 \\ \psi = 0, \frac{d\psi}{dx} = 0 & \text{quando } x \rightarrow \infty \end{cases}$$

A eq. (x) pode ser reescrita da seguinte forma usando a propriedade trigonométrica seno hiperbólico:

$$\frac{d^2 \psi}{dx^2} = a \sinh(b\psi) \quad (\text{A.5})$$

$$\text{onde } a = \frac{2zen_0}{\epsilon} \text{ e } b = \frac{ze}{kT}$$

Usa-se, então, a propriedade: $[(\psi')^2] = 2\psi'\psi''$,

onde $\psi' = \frac{d\psi}{dx}$ e $\psi'' = \frac{d^2\psi}{dx^2}$.

Primeiramente, multiplica-se a Eq. (5) por $2\psi'$,

$$2\psi'\psi'' = 2a\psi' \sinh(b\psi)$$

$$[(\psi')^2] = 2a\psi' \sinh(b\psi)$$

e integra-se com a condição de contorno $x \rightarrow \infty$:

$$(\psi')^2 = \int 2a\psi' \sinh(b\psi) \frac{dx}{d\psi} d\psi$$

$$(\psi')^2 = \int 2a \sinh(b\psi) d\psi$$

integrando por partes,

$$(\psi')^2 = \int \frac{2a}{b} \sinh(b\psi) d(b\psi)$$

$$(\psi')^2 = \frac{2a}{b} \cosh(b\psi) + c_1$$

quando $x \rightarrow \infty$, $\psi = 0$ e $\psi' = 0$

$$0 = \frac{2a}{b} \cosh 0 + c_1, \text{ logo } c_1 = -\frac{2a}{b}$$

$$(\psi')^2 = \frac{2a}{b} \cosh(b\psi) - \frac{2a}{b}$$

$$(\psi')^2 = \frac{2a}{b} (\cosh(b\psi) - 1)$$

$$\psi' = \pm \sqrt{\frac{2a}{b} (\cosh(b\psi) - 1)}$$

O sinal negativo é usado quando o potencial de superfície é positivo e vice-versa,

$$\psi' = -\sqrt{\frac{2a}{b}} \sqrt{(\cosh(b\psi) - 1)}$$

integrando por separação de variáveis, com a condição de contorno em $x = 0$:

$$\frac{d\psi}{\sqrt{(\cosh(b\psi) - 1)}} = -\sqrt{\frac{2a}{b}} dx$$

A partir da fórmula do ângulo duplo: $\cosh 2\alpha = 1 + 2\sinh^2 \alpha$,

$$-\sqrt{\frac{2a}{b}} x + c_2 = \int \frac{d\psi}{\sqrt{1 + 2\sinh^2\left(\frac{b\psi}{2}\right) - 1}}$$

$$-\sqrt{\frac{2a}{b}} x + c_2 = \frac{1}{\sqrt{2}} \int \frac{d\psi}{\sqrt{\sinh^2\left(\frac{b\psi}{2}\right)}}$$

$$-2x\sqrt{\frac{a}{b}} + c_3 = \int \operatorname{cosech}\left(\frac{b\psi}{2}\right) d\psi$$

A partir da tabela de integrais: $\int \operatorname{cosech}(\beta\alpha) d\alpha = \frac{1}{\beta} \ln \operatorname{tgh}\left(\frac{\beta\alpha}{2}\right) + c$,

$$-2x\sqrt{\frac{a}{b}} + c_3 = \frac{2}{b} \int \operatorname{cosech}\left(\frac{b\psi}{2}\right) d\left(\frac{b\psi}{2}\right)$$

$$-2x\sqrt{\frac{a}{b}} + c_3 = \frac{2}{b} \ln\left(\operatorname{tgh}\left[\frac{b\psi}{4}\right]\right)$$

quando $x = 0, \psi = \psi', \quad c_3 = \frac{2}{b} \ln\left(\operatorname{tgh}\left[\frac{b\psi_o}{4}\right]\right)$

$$-2x\sqrt{\frac{a}{b}} = \frac{2}{b} \ln\left(\operatorname{tgh}\left[\frac{b\psi}{4}\right]\right) - \frac{2}{b} \ln\left(\operatorname{tgh}\left[\frac{b\psi_o}{4}\right]\right)$$

$$-x\sqrt{\frac{a}{b}} = \frac{I}{b} \ln \left(\frac{\operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi}{4} \right]}{\operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi_o}{4} \right]} \right)$$

$$-x = \frac{I}{\sqrt{ab}} \ln \left(\frac{\operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi}{4} \right]}{\operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi_o}{4} \right]} \right)$$

$$\ln \left(\frac{\operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi}{4} \right]}{\operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi_o}{4} \right]} \right) = -\sqrt{ab}x$$

$$\frac{\operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi}{4} \right]}{\operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi_o}{4} \right]} = e^{(-\sqrt{ab}x)}$$

$$\operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi}{4} \right] = \operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi_o}{4} \right] e^{(-\sqrt{ab}x)}$$

$$\frac{b\psi}{4} = \operatorname{arctgh} \left[\operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi_o}{4} \right] e^{(-\sqrt{ab}x)} \right]$$

usando a função hiperbólica inversa: $\operatorname{arctgh} \alpha = \frac{I}{2} \ln \left(\frac{I+\alpha}{I-\alpha} \right)$ para $-I < x < I$,

$$\frac{b\psi}{4} = \frac{I}{2} \ln \left(\frac{I + e^{(-\sqrt{ab}x)} \operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi_o}{4} \right]}{I - e^{(-\sqrt{ab}x)} \operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi_o}{4} \right]} \right)$$

$$\psi = \frac{2}{b} \ln \left(\frac{I + e^{(-\sqrt{ab}x)} \operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi_o}{4} \right]}{I - e^{(-\sqrt{ab}x)} \operatorname{tgh} \left[\frac{b\psi_o}{4} \right]} \right)$$

Recuperando as variáveis iniciais:

$$\sqrt{ab} = \sqrt{\frac{2n_o(z e)^2}{\epsilon k T}} \quad e \quad \frac{2}{b} = \frac{2kT}{ze}$$

$$\psi = \frac{2kT}{ze} \ln \left(\frac{1 + e^{\left(-\sqrt{\frac{2n_o(ze)^2}{\epsilon kT}} x\right)} \operatorname{tgh} \left[\frac{ze\psi_o}{4kT} \right]}{1 - e^{\left(-\sqrt{\frac{2n_o(ze)^2}{\epsilon kT}} x\right)} \operatorname{tgh} \left[\frac{ze\psi_o}{4kT} \right]} \right) \quad \text{como } \kappa^{1/2} = \frac{2n_o(ze)^2}{\epsilon kT},$$

$$\psi = \frac{2kT}{ze} \ln \left(\frac{1 + e^{(-\kappa x)} \operatorname{tgh} \left[\frac{ze\psi_o}{4kT} \right]}{1 - e^{(-\kappa x)} \operatorname{tgh} \left[\frac{ze\psi_o}{4kT} \right]} \right)$$

usando a função hiperbólica: $\operatorname{tgh} \alpha = \frac{e^\alpha - e^{-\alpha}}{e^\alpha + e^{-\alpha}},$

$$\operatorname{tgh} \left(\frac{ze\psi_o}{4kT} \right) = \frac{e^{\left(\frac{ze\psi_o}{4kT}\right)} - e^{-\left(\frac{ze\psi_o}{4kT}\right)}}{e^{\left(\frac{ze\psi_o}{4kT}\right)} + e^{-\left(\frac{ze\psi_o}{4kT}\right)}}$$

$$\operatorname{tgh} \left(\frac{ze\psi_o}{4kT} \right) = \frac{e^{-\left(\frac{ze\psi_o}{4kT}\right)} [e^{\left(\frac{ze\psi_o}{4kT}\right)} - 1]}{e^{-\left(\frac{ze\psi_o}{4kT}\right)} [e^{\left(\frac{ze\psi_o}{4kT}\right)} + 1]}$$

$$\operatorname{tgh} \left(\frac{ze\psi_o}{4kT} \right) = \frac{e^{\left(\frac{ze\psi_o}{4kT}\right)} - 1}{e^{\left(\frac{ze\psi_o}{4kT}\right)} + 1} = \gamma$$

$$\psi = \frac{2kT}{ze} \ln \left(\frac{1 + \gamma e^{(-\kappa x)}}{1 - \gamma e^{(-\kappa x)}} \right)$$

Deste modo, a solução analítica da equação de Poisson-Boltzmann para eletrólitos simétricos, em coordenadas cartesianas, é:

$$\psi = \frac{2kT}{ze} \ln \left(\frac{1 + \gamma \exp(-\kappa x)}{1 - \gamma \exp(-\kappa x)} \right) \quad (\text{A.15})$$

$$\text{em que } \gamma = \frac{\exp\left(\frac{ze\psi_o}{2kT}\right) - 1}{\exp\left(\frac{ze\psi_o}{2kT}\right) + 1} \quad \text{e} \quad \kappa^2 = \left(\frac{2n_o(ze)^2}{\epsilon kT} \right).$$